



00562 11
29/

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS
POR CD43, UNA MOLECULA CO-RECEPTORA DE
CELULAS LINFOIDES**

T E S I S

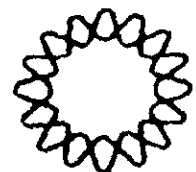
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A :

JOSÉ FABIÁN OCEGUERA YAÑEZ

267647

Cuernavaca, Morelos 1998



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

Dedico este trabajo a los maestros de mi vida, mis padres Nancy, Alfonso y a mi hermano Iván.

Dedico también esta tesis a todos mis amigos y amigas que me han brindado su amistad y apoyo incondicional en todo momento, pero en especial a Symon por haber insistido en dar una vuelta por el IBt hace tres años.

AGRADECIMIENTOS

A Yvonne y Gustavo, mis asesores y amigos, que entre tantas cosas me enseñaron a trabajar.

A la técnico Lily, Selene, Marisa, Mario, Angélica, Homero, Tony y Erika, mis compañeros del laboratorio, por su valiosa ayuda en el laboratorio.

A Paul Gaytán por su ayuda en el desarrollo de la cromatografía de capa fina.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dra. Yvonne Rosenstein

Dr. Federico Sánchez

Dr. Luis Covarrubias

Dr. Leopoldo Santos

y el jurado de exámen por:

Presidente Dra. Yvonne Rosenstein

Secretario Dr. Mario Zurita

Vocal Dr. Alejandro Zentella

Suplente Dra. Estela Sánchez

Suplente Dra. Carmen Beltrán

Este trabajo se realizó con apoyo de los proyectos: DGAPA/IN206394, DGAPA/IN210496, CONACYT/400344-5-5230N y CONACYT/25307-M. Así como con la beca de CONACyT No. 96121.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. LA DIVERSIDAD DE DOMINIOS PROTEICOS: Una forma de reclutamiento de proteínas señalizadoras.	4
1.2. EL RECEPTOR PARA ANTIGENO DE CELULAS T (TcR).	5
1.2.1. Señales intracelulares mediadas por el TcR.	6
1.2.1.1. La vía del Ca ²⁺ .	7
1.2.1.2. La vía de Ras.	7
1.2.1.3. La cascada de las MAPKs.	8
1.2.1.4. Regulación de la expresión genética.	11
1.3. EL CO-RECEPTOR CD43.	12
1.3.1. CD43: La molécula.	12
1.3.2. CD43 regula las interacciones celulares	13
1.3.2.1. Regulación negativa.	13
1.3.2.2. Regulación positiva.	15
1.3.3. Los ligandos de CD43.	17
1.3.4. CD43 genera señales de activación.	19
1.4. CINASAS DE FOSFOINOSITIDOS.	22
1.4.1. Fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K).	23
1.4.2. Fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K).	25
2. OBJETIVOS.	27
2.1. OBJETIVO GENERAL.	27
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.	27

3. MATERIALES Y METODOS	28
3.1. Anticuerpos y reactivos.	28
3.2. Obtención de linfocitos T.	29
3.3. Activación celular e inmunoprecipitación.	30
3.4. Separación de proteínas por SDS-PAGE e inmuno-blot.	31
3.5. Ensayo de fosfatidilinositol cinasa.	32
4. RESULTADOS.	34
4.1. La subunidad reguladora así como la subunidad catalítica de PI3K se encuentran asociadas constitutivamente con CD43.	34
4.2. La asociación PI3K-CD43 se puede competir con péptidos ricos en prolina.	36
4.3. Existe un complejo enzimático de PIK asociado a CD43.	38
4.4. La actividad de PIK asociada a CD43 disminuye en respuesta a la activación a través de CD43, mientras que la actividad de PI3K no asociada a CD43 aumenta.	40
4.5. La subunidad reguladora de PI3K, p85 se une específicamente a la región intracitoplásmica de CD43 y esto correlaciona con actividad de cinasa.	43
4.6. Existe una fosfatidilinositol cinasa de tipo II en el complejo de CD43.	45
5. DISCUSION.	47
6. CONCLUSIONES.	55
7. BIBLIOGRAFIA.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

aas	Aminoácidos
APC	Células presentadoras de antígeno
ATCC	American Type Culture Collection
bcr	<i>Gene break cluster region</i>
BCS	Suero de ternera recién nacido
c. eqs.	Equivalentes celulares
CRE	Elemento de respuesta a AMPc
CSFR-1	Receptor para el factor de estimulación de colonias- 1
DG	Diacilglicerol
EGFR	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico
FCS	Suero fetal de ternera
GalNAc	N- acetil galactosamina
GAP	Proteína activadora de GTPasa
GST	Glutación S-transferasa
GST-CD43	Glutación S-transferasa-CD43
ICAM-1	Molécula de adhesión inter-celular - 1
IFN γ	Interferón γ
IL-2	Interleucina-2
IP	Inmunoprecipitado
IP ₃	Inositol trifosfato
IRS-1	Sustrato-1 del receptor para insulina
ITAM	Motivo de activación inducido basado en la fosforilación de tirosinas
JNK	Cinasa del extremo N- terminal de Jun
KDa	Kilodalton
mAb	Anticuerpo monoclonal
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MAPKK	Cinasa de la proteína cinasa activada por mitógenos
MEK1/2	Cinasa de MAPK- ERK 1/2
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MTAg-p60 ^{c-src}	Complejo del antígeno Middle T- p60 ^{c-src}
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PH	Dominio con homología a pleckstrina
PI	Fosfatidilinositol
PIK	Cinasa de fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol 3- cinasa
PI4K	Fosfatidilinositol 4- cinasa
PI 4-P	Fosfatidilinositol 4- fosfato
PI 4,5-P ₂	Fosfatidilinositol 4, 5- bifosfato
PI 3,4,5-P ₃	Fosfatidilinositol 3, 4, 5- trifosfato
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLC γ 1	Fosfolipasa C γ 1
Prot A-S4B	Proteína A- sefarosa 4- B
PTB	Dominio de unión a fosfotirosina
PY	Fosfotirosina
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida- SDS
Ser	Serina
SH2	Dominio con homología a Src 2
SH3	Dominio con homología a Src 3
SIE	Elemento inducido por factores cis
SRE	Elemento de respuesta a suero
TcR	Receptor para el antígeno de células T
Thr	Treonina
TRE	Elemento de respuesta a TPA
Tyr	Tirosina
VCAM-1	Molecula de adhesión celular vascular - 1
VIA	Virus de la influenza tipo A

RESUMEN

CD43 es una glicoproteína abundante de la superficie de células linfoides (5×10^5 moléculas por célula), cuyo dominio intracitoplásmico se encuentra muy conservado entre diferentes especies (humano, rata y ratón), sugiriendo una función co-receptora de esta molécula. La activación de linfocitos T a través de CD43 induce la producción de IL-2, proliferación celular, apoptosis, así como la generación de segundos mensajeros tales como fosfoinosítidos y diacilglicerol. Sin embargo, se conoce poco acerca de la vía de transducción de señales de CD43. Recientemente, resultados obtenidos en el laboratorio han demostrado que el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular de linfocitos T humanos aislados de sangre periférica de donadores sanos, induce la asociación del dominio intracitoplásmico de CD43 con el dominio SH3 de la cinasa Fyn así como la fosforilación en tirosina de Fyn, y la formación de un complejo macromolecular que comprende a Shc, Grb2, Vav y SLP76 (Pedraza- Alva et al., 1996; 1998).

En este trabajo presentamos evidencia de que CD43 se asocia con p85, la subunidad reguladora de PI3K, en linfocitos T en reposo y activados a través de CD43. Esta asociación también ocurre al incubar lisados celulares con una proteína de fusión que contiene el dominio intracitoplásmico de CD43. La interacción entre CD43 y p85 se inhibe con péptidos ricos en prolina, sugiriendo que podría estar mediada por dominios SH3. También demostramos actividad de una PI4K de tipo II que co-precipita con CD43. La actividad de PI3K y de PI4K asociadas a CD43 decrece en función del tiempo en respuesta a la estimulación a través de CD43. Es posible que la asociación entre PI3K y/o PI4K con el dominio intracitoplásmico de CD43 genere señales que inducen cambios en el citoesqueleto.

1. INTRODUCCION

Uno de los retos más grandes en la biología ha sido el entender cómo las células pueden efectuar respuestas específicas a una extraordinariamente grande y diversa gama de estímulos. La investigación de las vías de señalización intracelulares ha revelado la complejidad y diversidad de los mecanismos empleados por las células para regular su metabolismo, morfología y expresión genética. El objetivo principal de este trabajo es identificar algunos de los componentes de la vía de señalización de linfocitos T a través de la molécula de superficie CD43.

1.1. LA DIVERSIDAD DE DOMINIOS PROTEICOS: Una forma de reclutamiento de proteínas señalizadoras.

La transducción de señales mediada por receptores de membrana induce el ensamble de complejos multimoleculares con el dominio intracitoplásmico de los receptores. Estos complejos están constituidos por una variedad de moléculas señalizadoras. Las proteínas de señalización a menudo contienen secuencias conservadas, con una longitud de 50 a 100 aminoácidos, que pueden plegarse en módulos compactos y funcionales de forma independiente de la secuencia que las rodea y que desempeñan funciones específicas.

Ejemplos de estos módulos funcionales son los dominios homólogos a Src-2 (SH2), homólogos a Src-3 (SH3), dominios de unión a tirosinas fosforiladas (PTB) o dominios con homología a pleckstrina (PH). Los dominios SH2 reconocen pequeños motivos peptídicos que exponen fosfotirosinas (PY); los dominios PTB son funcionalmente equivalentes a los dominios SH2, sin embargo reconocen secuencias distintas en el polipéptido provistas por los aminoácidos localizados en el extremo amino terminal de la

tirosina fosforilada, mientras que los dominios SH3 se unen a uno ó más residuos de prolina.

Los dominios SH2 y PTB estan involucrados en las vías de señalización de cinasas de tirosina. Los dominios PH se han descrito en un amplia variedad de proteínas incluyendo cinasas de Ser/Thr o de Tyr, sustratos para estas cinasas, reguladores de pequeñas GTPasas y proteínas de citoesqueleto; tienen la capacidad de unir fosfolípidos, en particular fosfatidilinositol 4,5- bifosfato (PI 4, 5-P₂). También pueden unirse a las subunidades β/γ de las proteínas G, así como a proteina cinasa C (PKC). Estos datos sugieren que los dominios PH pueden acarrear proteínas de señalización a las membranas. Combinaciones de dominios SH2, PTB, SH3 y PH se encuentran frecuentemente en un mismo polipéptido y contribuyen a la formación de complejos multimoleculares de señalización (revisado por Pawson 1995).

1.2. EL RECEPTOR PARA ANTIGENO DE CELULAS T (TcR).

El reconocimiento específico del antígeno genera una serie de respuestas que modulan la inmunidad de un individuo. La activación de linfocitos T requiere la formación de contactos íntimos entre células T y células presentadoras de antígeno (APC). Este proceso de unión consta de varios eventos: el primero de ellos consiste en una adhesión de baja afinidad mediada por moléculas de la superficie celular que reconocen en la membrana de las APC a sus ligandos, independientemente del reconocimiento específico del antígeno por el receptor para el antígeno de células T (TcR). Estas interacciones facilitan la unión del TcR con el complejo MHC-antígeno presentado por las APC. La unión del TcR a su antígeno específico induce señales intracelulares que a su vez repercuten en la avidez con la que las moléculas de adhesión interaccionan con sus ligandos, estabilizando y fortaleciendo la unión entre las células blanco y las células T (Stöckl et al., 1996).

Finalmente, las señales del TcR aunadas a las señales de las distintas moléculas co-receptoras involucradas se integran para generar una respuesta celular coordinada.

El receptor para el antígeno es un complejo macromolecular constituido por un heterodímero de las subunidades polimórficas α y β ó γ y δ , unidas de forma no covalente con dos dímeros de las cadenas invariantes γ , δ y ϵ y un dímero de las cadenas ζ del complejo CD3 [($\alpha\beta$) ó ($\gamma\delta$), $\gamma\delta$, $\gamma\epsilon$, $\zeta\zeta$]. El alto grado de polimorfismo de las glicoproteínas que constituyen el TcR se genera por un proceso semejante al de las inmunoglobinas. Las cadenas no polimórficas del complejo CD3 son necesarias para el ensamble del receptor, su expresión en la superficie celular y la señalización intracelular (Wange and Samelson 1996). En los dominios intracitoplásmicos de las cadenas ζ , γ , δ y ϵ del complejo CD3 se han descrito los llamados motivos de activación basados en tirosina del inmunoreceptor (ITAM). Estos motivos comparten una secuencia conservada crucial para la señalización: D/EX₇D/EX₂YX₂L/IX₇YX₂L/I (en donde X puede ser cualquier aminoácido). Después del reconocimiento del antígeno por el TcR, los ITAMs de las cadenas polipeptídicas del complejo TcR/CD3 son fosforilados en tirosinas por las cinasas de tirosina Lck o Fyn. Estos residuos fosforilados actúan como sitios de unión a proteínas que contienen dominios SH2 (Zenner et al., 1995).

1.2.1. Señales intracelulares mediadas por el TcR.

Se han descrito dos grandes vías de señalización en las células linfoides: la vía del calcio y la vía de Ras. Dependiendo de los co-receptores que participen y de la intensidad de las señales generadas por estos, se activa una u otra vía, reclutando algunas veces las mismas moléculas señalizadoras, y otras veces, moléculas distintas pero que en un momento dado pueden convergir en una misma vía. El tipo de respuesta y la amplitud de esta será la resultante de la integración de las señales intracelulares generadas por las diversas moléculas co-receptoras.

1.2.1.1. La vía del Ca^{2+} .

La asociación de la cinasa de tirosinas Zap-70 con los ITAMs del complejo TcR/CD3 conlleva a la fosforilación de varias proteínas: la fosfolipasa $\text{C}\gamma 1$ ($\text{PLC}\gamma 1$), quién al ser fosforilada en tirosinas es activada e hidroliza el $\text{PI } 4,5\text{-P}_2$ en diacilglicerol (DG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). A su vez, el DG es un activador de la familia de las PKCs que son Ser/Thr cinasas. El IP_3 , gracias a su naturaleza hidrofílica puede difundir por el citoplasma e interactuar con el receptor de inositol en el retículo endoplásmico, induciendo la liberación de calcio intracelular (Weiss et al., 1991). Este regula la activación de diversas proteínas, entre las que se encuentran las proteínas calmodulina y calcineurina. La fosfatasa de Ser/Thr calcineurina defosforila al factor nuclear de células T activadas (NFAT) ocasionando su translocación al núcleo (Crabtree and Clipstone 1994). La participación de PKC es importante para el reclutamiento de otros factores transcripcionales (i.e. Fos, Jun y $\text{NF}\kappa\text{B}$) que intervienen en la regulación de la expresión genética de numerosos genes, entre los cuales se encuentran los de citocinas y de sus receptores.

1.2.1.2. La vía de Ras.

Otra de las vías estimuladas por la activación del TcR es la de Ras. Se ha sugerido que la pequeña GTPasa Ras es activada luego de la fosforilación en tirosinas de Shc, una proteína adaptadora con dominios PTB, SH2 y SH3. Shc recluta a su vez a Grb2, otra proteína adaptadora con dominios SH2 y SH3 y a Sos, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina que permite el recambio de GDP por GTP en Ras, devolviéndole su actividad (Ravichandran et al., 1993). Así mismo, en leucocitos otra proteína adaptadora, SLP76 facilita la activación de Ras; esta proteína contiene dominios SH2 y tiene un peso molecular de 76 kDa. SLP76 interactúa con el producto del protooncogene *Vav* después de haber sido fosforilados ambos en tirosina en respuesta a la activación por el TcR (Raab et al., 1997). El papel de Vav como factor intercambiador de GTP sugiere

una vía de activación de GTPasas exclusivo de células hematopoyéticas debido a la expresión restringida de esta proteína en este tipo de células.

La actividad de Ras también es controlada por proteínas activadoras de GTPasas (GAP) tales como GAP-p120 y neurofibromina. Las GAP de Ras son reguladas por PKC en respuesta a la estimulación del TcR (Cantrell 1996).

1.2.1.3. La cascada de las MAPKs.

La activación de PKC y de Ras induce la estimulación de la cascada de las MAP cinasas (MAPK). Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) son un grupo de Ser/Thr cinasas que se activan en respuesta a diversos estímulos, siendo estos distintos para cada una de ellas. Su fosforilación en residuos conservados de serina y tirosina es necesaria para su activación total (Su and Karin 1996). Las MAP cinasas mejor caracterizadas son Erk-1, Erk-2, JNK-1 y p38 (figura 1.1).

La cascada de las MAPK comienza con la unión de Ras a GTP; el complejo Ras-GTP interactúa directamente con el dominio N-terminal de Raf-1, activándola y reclutándola de forma activa a la membrana. Raf-1 es la cinasa de la cinasa de MAP cinasa (MAPKKK) (Egan and Weinberg 1993). Además de Raf-1, se han estudiado otras dos MAPKKKs: c-Mos y MEKK-1, cuyo papel en la activación de las MAP cinasas ERK-1 y ERK-2 parece ser más complejo (Lange-Carter et al., 1993).

En respuesta a la activación del TcR, Raf-1, c-Mos y MEKK-1 fosforilan y activan a las proteínas cinasas específicas MAPKK, también llamadas MAPK/ERK cinasas (MEK1/2) (Su and Karin 1996). A su vez, las MAPKK, MEK1/2 activan a las MAP cinasas ERK1 y ERK2 (Zheng and Guan 1993).

La MAPKKK, MEKK1 también participa en la activación de otra vía de MAPK, las cinasas del extremo amino terminal de c-Jun (JNK). MEKK1 fosforila y activa a JNKK1. Sin embargo, son necesarios otros estímulos para la activación total de JNKK1. La

MAPKK responsable del incremento de la actividad de las JNKs es JNKK1 (Lin et al., 1995).

Las JNK pertenecen a la familia de las MAPKs y son las responsables de la fosforilación del extremo amino terminal de c-Jun, un componente del factor transcripcional AP-1. Las JNK fosforilan residuos de Ser en c-Jun aumentando su capacidad de activar la transcripción (Su and Karin 1996). En linfocitos T, además de la estimulación por el TcR, también se requiere de la co-estimulación a través de CD28 para la activación total de JNK. p38 es también una MAPK que presenta alta homología con Hog-1, una MAPK de levaduras que es activada por estrés osmótico (Brewster et al., 1993). Al igual que JNK, p38 es activada en respuesta a estímulos de estrés y por algunos agonistas que activan a las JNKs y comparte la vía de activación mediada por JNKK1 (Su and Karin 1996). Los sustratos de las MAPKs se encuentran en el núcleo, por lo que una vez activas, estas cinasas se translocan a este.

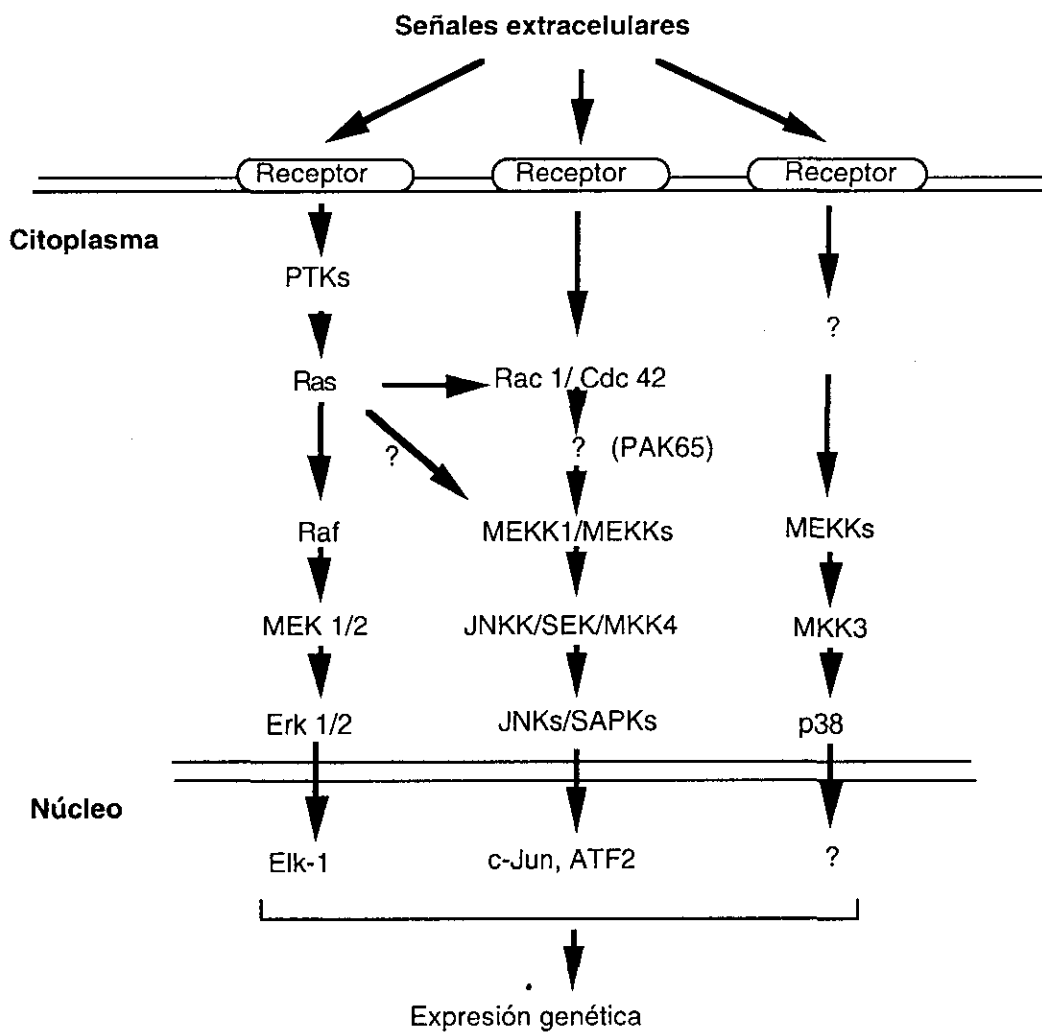


Figura 1.1 Cascada de las MAPK
(Tomado de Su and Karin, 1996).

1.2.1.4. Regulación de la expresión genética.

En respuesta a la interacción del TcR con su antígeno específico, así como de las moléculas co-receptoras por sus respectivos ligandos, los linfocitos T inician la transcripción de una gran variedad de genes cuyos productos son esenciales para una activación funcional de éstas células (Abbas et al., 1997). La cascada de señalización mediada por las MAP cinasas aunada a la activación de otras cinasas concluye en la inducción del grupo de genes inmediatos/tempranos tales como *c-jun*, *c-fos*, *c-myc*, algunas interleucinas (IL-2, IFN γ , etc.) así como de sus receptores, entre otros. Los productos de estos genes regulan la expresión de otros genes en períodos posteriores del ciclo celular (Cantrell, 1996).

Existen distintos elementos reguladores cis y trans que controlan la transcripción de estos genes. Se conocen tres elementos cis distintos que controlan la transcripción de *c-fos*: el elemento de respuesta a AMPc (*CRE*), el elemento de respuesta a suero (*SRE*) y el elemento de respuesta-sis (*SIE*). La transcripción del gene de *c-fos* es regulada por complejos multiproteicos trans, que se unen a estas regiones cis (Su and Karin 1996). La inducción de la transcripción de *c-jun* es controlada por el elemento de respuesta a TPA (*TRE*) mediante la unión del heterodímero *c-Jun/ATF2*. La proteína ATF2 se expresa constitutivamente mientras que *c-Jun* es regulada por distintos estímulos. Al dimerizarse las proteínas *c-Jun* y *c-Fos* forman el heterodímero AP-1 cuya actividad como factor transcripcional es aumentada por JNK y por la cinasa reguladora de *c-Fos* (FRK) (Su and Karin 1996).

1.3. EL CO-RECEPTOR CD43.

1.3.1 CD43: la molécula.

CD43 es una proteína integral de membrana que se expresa abundantemente (5×10^5 moléculas/célula) en todas las células hematopoyéticas circulantes incluyendo timocitos, células T, células B, monocitos, granulocitos y plaquetas, más no en eritrocitos. Se expresa desde etapas tempranas de la ontogenia de las células linfoides en la médula osea y se ha propuesto que CD43 podría tener un papel importante durante la maduración de estas células (Rosenstein et al., 1993). El hecho que CD43 se exprese desde temprano durante la ontogenia de células linfoides así como el alto grado de homología entre distintas especies sugieren que CD43 es una proteína que desempeña funciones fisiológicas importantes (Shelley et al. 1989).

CD43 humano esta conformada por un péptido líder de 19 aminoácidos (aas.), un dominio extracelular de 235 aas., un dominio transmembranal de 23 aas. y un dominio intracitoplásmico de 123 aas. Las regiones extracelular, transmembranal e intracelular del polipéptido son codificadas por un sólo exón (Pallant et al., 1989). El análisis de la secuencia de aminoácidos de CD43 demostró que esta molécula es altamente conservada en humano, rata y ratón y que el grado de homología es aún mayor (>90 %) en las regiones transmembranal e intracitoplásmica. Entre los aminoácidos de la región intracitoplásmica de CD43 destacan seis residuos de treonina y once residuos de serina que representan sitios potenciales de fosforilación y que podrían participar en la transmisión de las señales de activación generadas por CD43 (Pallant et al., 1989).

El dominio extracelular de CD43 adopta una estructura alargada que se extiende a una longitud de hasta 45 nm hacia el medio extracelular debido a la gran cantidad de azúcares presentes en la molécula y a las interacciones estéricas entre la GalNAc con los aminoácidos adyacentes (Cyster et al., 1991). CD43 es una glicoproteína con alto contenido de ácido siálico (aproximadamente el 60% de su peso está constituido por

carbohidratos) y su peso molecular varía de 115 kDa a 135 kDa en función de su estado de glicosilación (Remold-O'Donnell et al., 1986).

Debido a la composición de aminoácidos de la porción extracelular y a la alta glicosilación de estos, se considera a CD43 como una mucina. Las mucinas se caracterizan por tener una secuencia repetida rica en prolina, serina y/o treonina, encontrándose estos últimos abundantemente O-glicosilados. Debido a su forma extendida y a su carga negativa conferida por los carbohidratos que las constituyen, se ha propuesto que las mucinas tienen un efecto repulsivo; sin embargo, esta característica más que ser una desventaja, en muchos casos les permite a las mucinas interactuar con receptores específicos de carbohidratos (Baeckstrom 1997).

1.3.2. CD43 regula las interacciones celulares

1.3.2.1. Regulación negativa.

A consecuencia de la estructura alargada y rígida que adopta, así como de su carga altamente negativa, se ha sugerido que CD43 podría regular negativamente la adhesión de linfocitos T con células blanco o células presentadoras de antígeno. La adhesión entre linfocitos T y células HeLa transfectadas con el cDNA de CD43 humano disminuye, en comparación a la obtenida con células HeLa control. Así mismo, células CEM que carecen del gene de CD43 por recombinación homóloga forman más agregados que las mismas células, en las cuales se re-introdujo el cDNA de CD43, atribuyéndose este efecto repulsivo a la gran cantidad de ácido siálico presente en las moléculas de CD43 (Manjunath et al., 1993).

Al probar la capacidad de proliferación de distintas células linfoides de ratones CD43^{-/-} se encontró que ésta aumenta en respuesta a distintos estímulos (concanavalina A, anticuerpos monoclonales anti-CD3, etc.), a diferencia de las células de ratones normales (Manjunath et al., 1995). Los autores interpretaron estos resultados como que CD43 no

tiene una función biológica importante o mas aún, que su ausencia facilita los contactos celulares; sin embargo, también es probable que en una célula existan otras moléculas co-receptoras que suplan la función de CD43.

Con la finalidad de lograr un mejor entendimiento del papel fisiológico de CD43 en el linaje de células B, se diseñó un modelo *in vivo*. Se utilizó el *enhancer* de la cadena pesada de las Ig para favorecer la expresión de CD43 en células B maduras y se generaron ratones transgénicos. Normalmente, CD43 se expresa en células pre- B así como en células plasmáticas; sólo el 25-30% de las células B de sangre periférica expresan CD43, aumentando su expresión en respuesta a la activación celular. Los ratones transgénicos que expresan CD43 durante todas las etapas del desarrollo de linfocitos B, presentan bazo agrandados debido al incremento en el número de células B. Además, disminuye la susceptibilidad de estas células por entrar en apoptosis. Así mismo, se observó en estos animales una alta inmunodeficiencia humoral: las células B de los ratones transgénicos perdieron la capacidad de presentar antígenos a células T y de agregarse homotípicamente. Estos datos sugieren que la expresión de CD43 en células B podría contribuir a la inmunodeficiencia observada interfiriendo con las interacciones de células T-B *in vivo*, necesarias para una respuesta humoral adecuada. Debido a que una gran variedad de células hematopoyéticas expresan CD43, la expresión regulada de esta molécula podría a la vez regular las interacciones de estas células y protegerlas de señales que guíen a una activación inapropiada (Dragone et al., 1995; Ostberg et al., 1996).

Apoyando la teoría de que CD43 puede regular las interacciones celulares, interfiriendo con la unión de moléculas de adhesión leucocitarias con sus ligandos, se encontró que en neutrófilos, CD43 es sensible a bajos niveles de elastasa contenida en los gránulos de estas células. Esto es sorprendente, ya que CD43 es resistente a varias proteasas con distinta especificidad: tales como tripsina, elastasa pancreática y proteasa-V8. En humanos, durante el proceso de inflamación, se han cuantificado niveles suficientes de elastasa para

cortar a CD43. La elastasa de gránulos de neutrófilos corta de forma específica a CD43 ya que a la concentración en que el 90% de CD43 es cortado [25 $\mu\text{g/ml}$], ninguna otra proteína de la superficie celular de células linfoides es cortada. La elastasa de neutrófilos también actúa sobre otros sustratos ácidos como proteoglicanos y mucinas unidas a las células epiteliales de la tráquea. El hecho que distintas proteínas glicosiladas sean digeridas por la elastasa incrementa la posibilidad de que CD43 sea digerida *in vivo* por esta enzima, aunque no se ha descrito a la fecha cuales son realmente las consecuencias a nivel de la célula y de la respuesta inmune del proceso de degradación de CD43 (Remold-O'Donnell and Parent 1995).

1.3.2.2. Regulación positiva.

Sin embargo, numerosos datos experimentales apoyan la teoría de que CD43 podría también participar de modo mas activo en la regulación de las interacciones celulares. En estudios con células Jurkat se observó que la oligomerización de CD43 con anticuerpos específicos en contra de CD43 incrementa la adhesión celular a fragmentos de fibronectina así como a otras moléculas de la superficie de células endoteliales como son las moléculas de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y las moléculas de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), mediada por las integrinas $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha_L\beta 2$ respectivamente. Sin embargo, en linfoblastos generados a partir de linfocitos T aislados de sangre periférica es necesaria la co-estimulación con anticuerpos anti-CD3 a dosis subóptimas además de anticuerpos anti-CD43 para inducir el mismo incremento en la adhesión celular. La oligomerización de CD43 en la superficie celular induce la redistribución de CD43 hacia una proyección citoplásmica bien definida llamada urópodo, mientras que las integrinas $\beta 1$ o $\beta 2$ permanecen distribuidas uniformemente a lo largo del área de contacto con el sustrato. Este cambio no requiere de la co-estimulación y se puede inducir directamente en linfoblastos de células T. Al agregar butanediona monoxima, una droga que produce la depolimerización de las fibras de miosina, se inhibe la redistribución de CD43 inducida

por mAbs, mientras que la estimulación de la adhesión celular inducida por mAbs anti-CD43 se mantiene en presencia de esta droga. La colchicina, un inhibidor de la polimerización de microtúbulos, no afecta la polarización o el incremento en la adhesión celular inducida por la estimulación de CD43. Sin embargo, la citocalasina D, un inhibidor de la polimerización de las fibras de actina, inhibe completamente la adhesión celular al sustrato. Estos resultados sugieren que se trata de fenómenos independientes, ya que la redistribución de CD43 requiere del motor de miosina, mientras que el incremento en la avidéz de las integrinas es dependiente de la polimerización de actina. El mecanismo por el cual CD43 estimula la adhesión celular podría estar relacionado con la activación de la avidéz por integrinas y no por una reducción de la repulsión en la membrana libre de CD43 ocasionada por la redistribución del receptor (Sánchez-Mateos et al., 1995).

Durante los procesos de desarrollo y selección de los timocitos, además de las señales generadas por el TcR, son necesarias otras señales inducidas por las interacciones entre los co-receptores de los timocitos y sus contra-receptores localizados en la superficie de las células del estroma tímico. Se ha demostrado que las células epiteliales del timo interactúan con timocitos a través del par de moléculas CD11/CD18 / ICAM-1 y, de otras moléculas como CD2 en las células T y CD58 en las células endoteliales. Las interacciones entre receptores y contra-receptores podrían proveer de señales de activación que incrementarían la fuerza de unión de otras moléculas por sus ligandos, como ha sido descrito en el caso de CD2 (Hahn et al., 1992). En este sentido, es posible pensar que al unirse CD43 con sus distintos ligandos podría generar señales que aumentarían la avidéz con que otros receptores u otras proteínas de la superficie celular interactúan con sus respectivos ligandos.

CD43 es entonces una molécula que regula, posiblemente a través de su interacción con ICAM-1 y/o de otros posibles ligandos, la adhesión de linfocitos T a células blanco así como la (s) vía (s) de activación que seguirán dichos linfocitos.

1.3.3. Los ligandos de CD43.

Se han descrito varios ligandos para CD43: ICAM-1, MHC-1, galectina-1 y el virus de la influenza A.

Se ha identificado a ICAM-1 como un ligando para CD43. ICAM-1 es también uno de los ligandos de CD11/CD18 (LFA-1), una integrina leucocitaria que, al unirse con sus ligandos (ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3), regula una de las vías principales por medio de las cuales los linfocitos establecen y controlan sus contactos adhesivos con otras células (Springer et al., 1987). Al expresar el cDNA de CD43 humano en un hibridoma murino de células T, específico para HLA-DR, se aumentó la respuesta antígeno-específica inducida por la estimulación con la línea celular Daudi, sugiriendo que la interacción específica de CD43-con su ligando en la superficie de las células Daudi podría contribuir en la activación de las células T (Park et al., 1991). Posteriormente, los mismos autores demostraron que las células Daudi se unen específicamente a CD43 purificado e inmobilizado a placas de plástico y que esta interacción es mediada a través de ICAM-1 ya que al agregar anticuerpos anti-ICAM-1 se abolió dicha interacción. Así mismo, al añadir anticuerpos en contra de CD43 se abatió la unión (Rosenstein et al., 1991).

CD43 humano también interactúa con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-1) humanas, lo que sugiere que las interacciones específicas de CD43 con su (s) ligandos juegan un papel importante en el proceso de adhesión selectiva a las células presentadoras de antígeno (APC). La interacción MHC-1-CD43 se inhibe con fragmentos Fab de anticuerpos anti-CD43, anti-MHC-I o anti- β_2 microglobulinas. Sin embargo, el entrecruzamiento de CD43 con anticuerpos intactos anti-CD43 incrementa la unión de células T a APC's. Esto, además de indicar que los fragmentos Fab reconocen un epítopo de unión a un ligando, también sugiere que al entrecruzar con el mismo anticuerpo pero intacto, se semeja la unión del ligando a CD43 emitiéndose una cascada de señalización que aumenta la adhesión de las células T. Por

otro lado, al evaluar la influencia de la unión de CD43 en la función de CD2 se encontró que el entrecruzamiento de CD43 aumenta significativamente la adhesión de CD2 por su ligando CD58. Así mismo, la activación mediada a través de la interacción de CD2 con CD58 incrementa la avidéz de unión de CD43 hacia MHC-1. Por lo tanto, el estado de adhesión de CD2 parece estar bajo la regulación de CD43 y viceversa (Stöckl et al., 1996). Además de ICAM-1 y MHC-I, se ha descrito a la galectina-1 como un ligando de CD43 (Baum et al., 1995). La galectina-1 reconoce, además de CD43, a otra molécula de la superficie de linfocitos T, CD45. La galectina-1 es una lectina de aproximadamente 28 kDa, constituida por dos cadenas de 14 kDa cada una. Aunque no se conoce la función precisa de esta molécula en la superficie de las células, se sabe que participa en fenómenos de reconocimiento y adhesión, probablemente generando puentes glicosídicos entre dos membranas opuestas.

El virus de la influenza A (VIA) se une específicamente a CD43 en leucocitos polimorfonucleares y esta interacción inhibe el funcionamiento de estas células. Al coestimular leucocitos polimorfonucleares con el VIA o con mAbs anti-CD43 y posteriormente con una partícula secundaria o un estímulo soluble (PMA), se observa una disminución significativa de la respuesta de estas células. Sin embargo, al incubar las células con el anticuerpo anti-CD43 seguido del entrecruzamiento con un segundo anticuerpo o al exponer las células con agregados de VIA, no se inhibe "la explosión respiratoria". Esto sugiere que el sitio en el receptor CD43 al que se une el VIA o el anticuerpo es un sitio crítico de activación de la vía de transducción de CD43 y donde la disfunción ocasionada por VIA ocurre (Abramson and Hudnor 1995).

1.3.4. CD43 genera señales de activación.

CD43 es también una molécula de activación y las señales generadas a través de CD43 parecen regular estrechamente la activación de linfocitos T (figura 1.2).

Distintos anticuerpos monoclonales (mAbs L10, 11B11, MEM-59) dirigidos en contra de diferentes epítomos de la molécula CD43 son capaces de inducir la activación de linfocitos T cuando éstos son estimulados por dichos mAbs solos o en conjunción con otros estímulos (PMA, anti-TcR, monocitos). Estos estímulos inducen la producción de IL-2, aumentan la proliferación celular, etc. (Mentzer et al., 1987, Axelsson et al., 1988; Alvarado et al., 1995).

CD43 se encuentra fosforilado de forma constitutiva en el residuo Ser 332 y se hiperfosforila en respuesta al tratamiento con ésteres de forbol (TPA). Así mismo, inhibidores de PKC como staurosporina evitan el aumento en la fosforilación, sugiriendo que PKC es la enzima responsable de esta modificación (Piller et al., 1989).

Al transfectar un hibridoma de células T murinas con el cDNA que codifica para la proteína CD43 humana, se encontró que cuando se activan las clonas que contienen la forma silvestre de CD43 simultáneamente a través del TcR y de CD43 se estimula la producción de IL-2, en contraposición con las células que fueron transfectadas con el cDNA que codifica para formas de CD43 que carecen de la porción intracitoplásmica de la molécula. La incapacidad de una forma trunca de CD43 de generar señales de activación sugiere que el dominio intracitoplásmico de CD43 es necesario para su función como molécula co-estimuladora (Park et al., 1991).

Recientemente en el laboratorio se demostró que al activar linfocitos T aislados a partir de sangre periférica o células Jurkat mediante el entrecruzamiento homotípico de CD43 con el anticuerpo monoclonal anti-CD43 L10 se induce la asociación de la tirosina cinasa Fyn a CD43. Se identificó en la región intracitoplásmica de CD43 una región rica en prolina (GAVDAPAPDEPEGGDG), a través de la cual CD43 podría interactuar con proteínas

que tienen dominios SH3. La asociación entre CD43 y Fyn es dependiente de tiempo, alcanzando un máximo entre dos y cinco min después de la activación a 37° C. La interacción entre CD43 y el dominio SH3 de Fyn es específica ya que se puede competir con un péptido rico en prolina, derivado del segundo dominio rico en prolina de la subunidad p85 de la fosfatidil inositol 3- cinasa (PI3K) y que interacciona con dominios SH3. La activación celular a través de CD43 induce la fosforilación de Fyn en una forma dependiente de tiempo, más no la de Lck, otra tirosina cinasa específica de linfocitos T. La activación de linfocitos T a través del TcR, concomitante con la activación a través de CD43 cancela la asociación de CD43 a Fyn. Por tanto, CD43 podría, además de transmitir señales de activación propias al interactuar con alguno de sus ligandos, generar señales reguladoras de aquellas producidas por el TcR (Pedraza-Alva et al., 1996).

La activación de linfocitos T con el mAb anti-CD43 L10, induce la fosforilación en tirosina de la proteína adaptadora Shc y del factor intercambiador de nucleótidos Vav así como la formación de un complejo macromolecular que comprende Shc, Grb2 y Vav. En respuesta a la unión de CD43 se aumenta la unión de Vav a SLP-76, se induce la activación de Erk2 y su translocación al núcleo (Pedraza- Alva et al., 1998)

También se encontró que el entrecruzamiento de CD43 en linfocitos T humanos normales induce la expresión del gene de IL-2. Esta inducción es inhibida parcialmente por ciclosporina y staurosporina sugiriendo la participación de las vías de Ca^{2+} y de PKC en la señalización de CD43. Las señales generadas a través de la molécula CD43 activan a los factores de transcripción AP-1 y $NF\kappa B$ así como la unión de NF-AT de forma dependiente de AP-1. La translocación de NF-AT al núcleo fué observada solamente cuando las células fueron tratadas simultáneamente con dos mAbs anti-CD43 que reconocen distintos epítomos o cuando fueron co-estimulados a través del TcR. De esta forma se demostró que las señales generadas por CD43 pueden regular la expresión del gene de IL-2 y probablemente la expresión de otros genes con sitios de reconocimiento por los factores

transcripcionales AP-1, NF-AT y NFκB en sus regiones reguladoras (Santana et al., sometido).

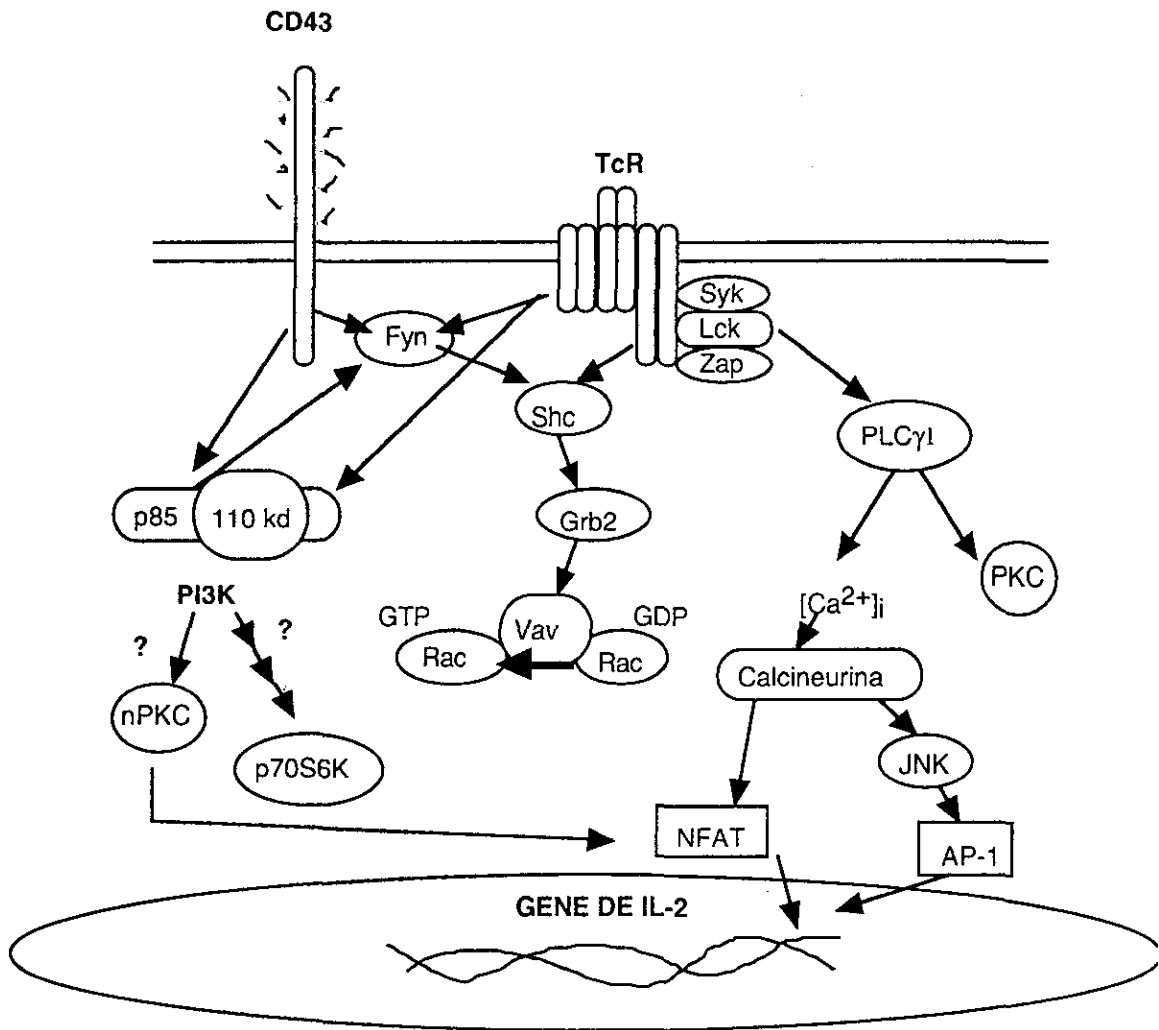


Figura 1.2. Modelo propuesto de la señalización de CD43.

1.4. CINASAS DE FOSFOINOSÍTIDOS.

Los datos preliminares obtenidos en el laboratorio indicaban que entre las moléculas reclutadas a través de las señales generadas por CD43 se encontraba una molécula de 85 kDa. Estos datos sugerían fuertemente que esta molécula es la subunidad reguladora de PI3K, p85.

Las fosfatidilinositol cinasas (PIK) son enzimas que fosforilan el fosfatidilinositol en las posiciones D-3, D-4 ó D-5 del anillo de myo-inositol del fosfatidil inositol (PI) (figura 1.3), generando fosfoinosítidos que forman parte de las bicapas lipídicas de las membranas celulares. Además de su función estructural, los lípidos fosforilados también actúan como segundos mensajeros. Los niveles de estos fosfolípidos son controlados por hormonas y/o factores de crecimiento que regulan las cinasas, fosfatasas y lipasas involucradas en la señalización de estos. El fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI 4,5-P₂) es el precursor de tres segundos mensajeros: PI 3,4,5-P₃, mediante su fosforilación por la PI3K; inositol 1,4,5-P₃ y diacilglicerol, mediante su hidrólisis por la PLC γ 1 (Dove et al., 1997).

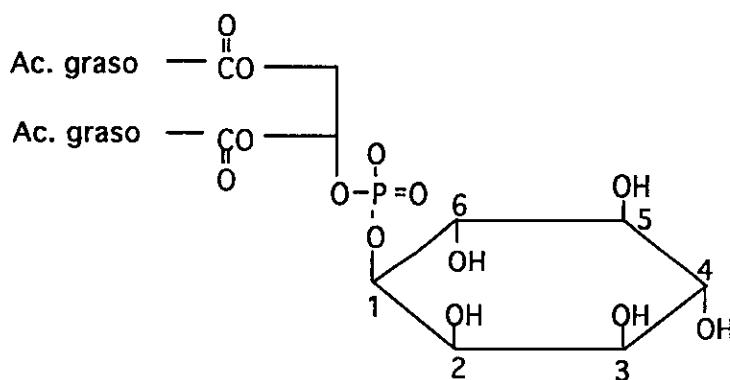


Figura 1.3 Fosfatidilinositol

Se han caracterizado dos actividades distintas de PIK denominadas de tipo I y de tipo II. La actividad de tipo I es sensible a detergentes no-iónicos. La actividad de tipo II es activada por detergentes no-iónicos y se inhibe por AMP, ADP y adenosina. La actividad de PIK de tipo I es regulada por agentes que afectan el crecimiento, proliferación y transformación celular, mientras que la actividad de tipo II podría ser regulada por la proporción de ATP/ADP en la célula (Whitman et al., 1987).

1.4.1. Fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K).

La fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) es una PIK de tipo I que fosforila la posición D-3 del anillo de myo-inositol del fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol 4-fosfato (PI 4-P) y fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PI 4,5-P₂), generando PI 3-P, PI 3,4-P₂ ó PI 3,4,5-P₃ respectivamente (Whitman et al., 1988).

En mamíferos, PI3K es un heterodímero compuesto por una subunidad adaptadora con un peso de 85 kDa (p85) (figura 1.4), unida a la subunidad catalítica de 110 kDa (p110) (Revisado por Carpenter and Cantley 1996; Toker and Cantley 1997).

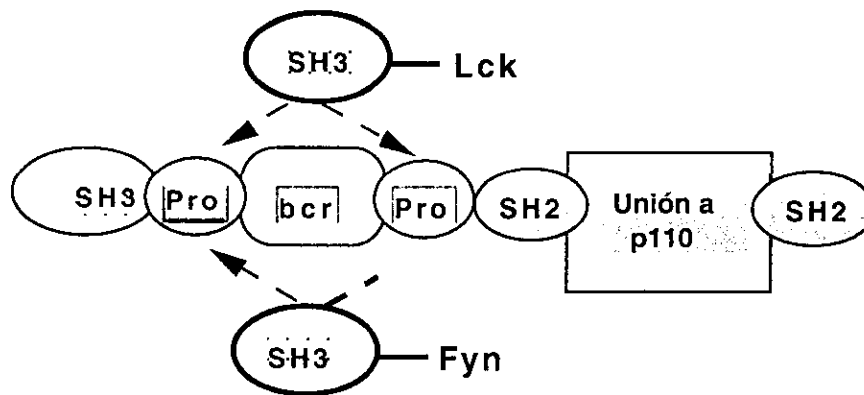


Figura 1.4 Esquematación de PI3K (p85) y sus interacciones con Lck y Fyn.

Se han descrito dos isoformas de p85 (p85 α y β) unidas al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y al complejo del antígeno *middle-T* con p60^{c-src} (MTAg-p60^{c-src}), (Escobedo et al., 1991, Skolnik et al., 1991; Otsu et al., 1991). p85 fué caracterizada en varios tejidos y las distintas p85 clonadas son codificadas por genes diferentes, con alto grado de similaridad en la secuencia de aminoácidos. Los denominadores comunes de estas moléculas son: contienen un dominio SH3 en el extremo N-terminal capaz de unir regiones ricas en prolina presentes en otras proteínas, dos dominios SH2 con la capacidad de interactuar con tirosinas fosforiladas, uno de ellos localizado en el extremo C-terminal, un dominio con homología al producto del gene *ber*, cuya función es desconocida y una región inter-SH2 que actúa como el sitio de unión a p110 (Hu et al., 1993). El análisis de la secuencia de p85 no muestra dominio alguno con homología a cinasas de tirosina o Ser/Thr o una región de unión a ATP. La conjunción de estos datos sugieren que p85 funciona como una proteína adaptadora que regula la unión de PI3K con distintos receptores o moléculas señalizadoras (figura 1.4) (Skolnik et al., 1991).

El hecho que los anticuerpos anti-p85 que inmunoprecipitan actividad de PI3K también co-inmunoprecipitan a p110, sugirió que p110 podría ser la proteína responsable de la actividad de PI3K (Hu et al., 1993). La secuencia de aminoácidos de p110 presenta alta homología con Vps34, una proteína de 100 kDa presente en *Sacharomyces cerevisiae* relacionada con el tráfico de vesículas a la vacuola así como con la morfogénesis de la vacuola durante la gemación (Herman and Emr 1990). La subunidad p110 contiene una región con homología a regiones consenso de los sitios activos de cinasas y de proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA). p110 posee actividad de PI3K *per se* en células de insecto (Sf9) transfectadas con el cDNA de p110, no así en células COS-1 donde es necesaria la co-expresión de p85 para la función de PI3K. Adicionalmente, se encontraron dos sitios consenso de fosforilación por PKC en el extremo C-terminal de p110 los cuales

sugieren una forma de regulación de la actividad de esta enzima (Hiles et al., 1992; Hu et al., 1993).

PI3K se asocia a varios receptores con actividad de cinasa de tirosina en respuesta a la estimulación con sus factores respectivos. Se asocia con el receptor para el factor estimulante de colonias 1 (CSFR-1) (Varticovski et al., 1989), con el receptor de PDGF (Auger et al., 1989), con el receptor de insulina (Ruderman et al., 1990) y con el sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) (Backer et al., 1992), entre otros.

En células hematopoyéticas los niveles de los fosfolípidos generados por la PI3K son regulados en función de las señales mediadas por moléculas co-receptoras involucradas en la activación y proliferación celular como CD2 (Shimizu et al., 1995), CD28 (Pagès et al., 1996), el receptor de IL-2 (Remillard et al 1991) y el TcR (Exley et al., 1994), entre otros. El hecho que la concentración de los productos de PI3K (PI 3-P, PI 3,4-P₂ ó PI 3,4,5-P₃) aumente después de la estimulación con diferentes agonistas y que éstos no sean sustratos de fosfolipasas, sugiere que actúan como segundos mensajeros, originando gran interés en la identificación de los blancos directos de la PI3K. Los fosfoinosítidos generados por la PI3K participan en la regulación de la actividad de algunas isoformas de PKC, en el reclutamiento a la membrana o modulación de proteínas de citoesqueleto (revisado por Carpenter and Cantley 1996; Toker and Cantley 1997).

1.4.2. Fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K).

La enzima fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K) fosforila la posición 4 del anillo de mioinositol. Se han caracterizado múltiples formas de PI4K en levaduras y mamíferos, las cuales han sido clasificadas en dos categorías en base a su sensibilidad a adenosina y a detergentes no-iónicos: PIKs de tipo II y de tipo III. La PI4K de tipo II ha sido purificada a partir de varios tejidos, y se ha reportado que es una proteína de 55 kDa asociada a membrana, cuya actividad es estimulada por tritón e inhibida por adenosina (Whitman et

al., 1988). La PI4K de tipo III ha sido descrita en cerebro de rata y es menos sensible a la inhibición por adenosina y/o activación por detergente, diferenciando así de la de tipo II. La actividad de la PI4K de tipo II se ha observado en diversas estructuras membranales, incluyendo el aparato de Golgi, lisosomas, retículo endoplásmico y membrana nuclear. Esta enzima también ha sido relacionada con el transporte de vesículas y de organelos especializados (Wong et al., 1997). Es probable que distintos miembros de esta familia de enzimas sean transportados a distintos compartimentos subcelulares donde realizan distintas funciones fisiológicas (Wong et al., 1997). Se sabe poco acerca de la regulación de estas enzimas, sin embargo, se han podido co-precipitar con el EGFR y con CD4 (Kauffmann-Zeh et al., 1994 y Prasad et al., 1993).

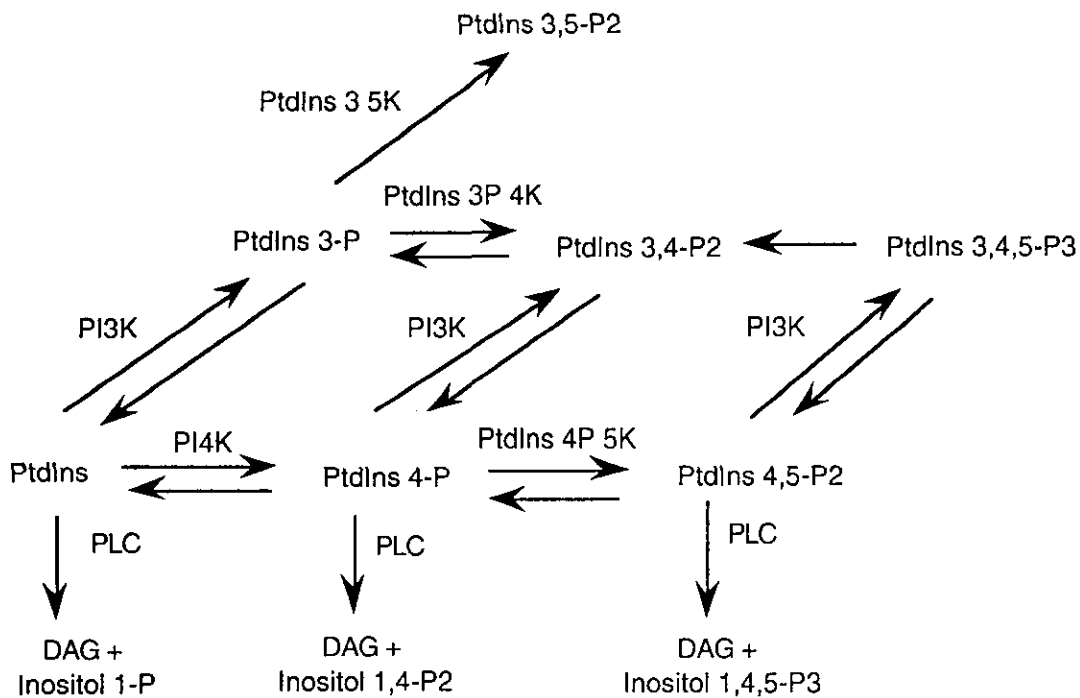


Figura 1.5 Metabolismo de fosfoinosítidos

2. OBJETIVOS.

2.1. OBJETIVO GENERAL.

Identificar algunos de los componentes de la (s) vía (s) de señalización de CD43. El conocer los elementos de las vías de transducción de señales mediadas por la molécula co-receptora CD43 permitirá ampliar el entendimiento de la regulación y modulación de la respuesta inmune y con estas bases se favorecerá el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Demostrar si la activación de linfocitos T a través de CD43 (utilizando distintos anticuerpos monoclonales anti-CD43) induce la activación de PI3K.
2. Identificar otras moléculas intracelulares que interactúen con la región intracitoplásmica de CD43.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Anticuerpos y reactivos.

L10 es un anticuerpo monoclonal (IgG1) que reconoce un epítoto peptídico en CD43 y fue utilizado como líquido de ascitis (Remold-O'Donnel et al. , 1987). MEM-59 es un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítoto glicosídico en CD43 (Stefanova et al., 1988). RamIg es un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de ratón que fué usado como anticuerpo secundario para aumentar el grado de polimerización de CD43, TcR ó CD28 en la superficie celular. 3D6 es un anticuerpo monoclonal que reconoce a VP7, una proteína de la envoltura proteica de rotavirus humano (Padilla et al., 1993), se utilizó como control negativo en todos los experimentos y fué donado por el Dr. Luis Padilla. OKT3 es un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (IgG2a) obtenido del American Type Culture Collection (ATCC). El anticuerpo monoclonal 9.3, reconoce a CD28 humano (IgG2a), y fué donado por Bristol-Meyers Squibb.

Se produjeron anticuerpos policlonales de conejo anti-p85 utilizando proteínas de fusión que contienen el dominio SH3 de p85 unido a glutatión S-transferasa (GST). También se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo anti-p85 α y anti-p110 β obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Los péptidos de la región intracitoplásmica de CD43: CD43/363-378 (³⁶³GAVDAPAPDEPEGGDG³⁷⁸) y el péptido de la misma región pero mutado en una prolina por alanina CD43/P->A (³⁶³GAVDAPAAADEPEGGDG³⁷⁸) fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología, UNAM.

Los péptidos de las dos regiones ricas en prolina de p85: p85/82-96 (⁸²SPPTPKPRPPRPLP⁹⁶) y p85/300-314 (³⁰⁰ERQPAPALPPKPPK³¹⁴) fueron amablemente proporcionados por Roxana Kappeler (Kappeler et al., 1994).

3.2. Obtención de linfocitos T.

Las células mononucleares se aislaron a partir de concentrados leucocitarios obtenidos del Centro Nacional de Transfusión Sanguínea del D.F. por el método de Ficoll-Hypaque (Coligan et al., 1994). Los concentrados leucocitarios fueron diluidos en dos volúmenes de PBS y se depositaron sobre un colchón de Ficoll-Hypaque en una relación 3:1. Después de centrifugar durante 20 min a 350 x g a temperatura ambiente se obtuvieron las células linfoides que se depositaron en la interfase entre el medio acuoso y el colchón de Ficoll. Las células linfoides obtenidas fueron lavadas por centrifugación en PBS y los linfocitos fueron seleccionados por su incapacidad de adherirse a cajas petri de poliestireno (grado cultivo), después de incubar las células por lo menos 2 h a 37 °C con 5% de CO₂. Las células B fueron separadas de las células T en columnas de lana de nylon preequilibradas con RPMI 1640 completo (suero fetal de ternera (FCS) 5%, suero de becerro recién nacido (BCS) 5%, L-glutamina 2 mM, penicilina 50 u/ml, estreptomicina 50 µg/ml y β-mercaptoetanol 50 µM). Después de incubar las columnas con las células linfoides durante 60 min a 37 °C con 5% de atmósfera de CO₂, los linfocitos B, células NK y algunos monocitos quedaron adheridos y las células T fueron eluidas con RPMI completo a 37 °C.

Con la finalidad de mantener en niveles basales o constitutivos la expresión o fosforilación de proteínas activables por mitógenos, las células T aisladas fueron arrestadas en su ciclo celular manteniéndolas en cultivo durante 24 h a 37 °C, con atmósfera de CO₂ controlada a 5% y en condiciones limitantes de suero fetal (RPMI 1640-2 % FCS, L-glutamina 2 mM, penicilina 50 u/ml, estreptomicina 50 µg/ml y β-mercaptoetanol 50 µM).

El grado de pureza de los linfocitos T fué determinado por citometría de flujo utilizando el programa CellQuest (Becton Dickinson), tiñendo las células con los anticuerpos monoclonales OKT3 y L10. Las células purificadas fueron 80-90% OKT3⁺ y >95% L10⁺.

3.3. Activación celular e inmunoprecipitación.

2×10^7 linfocitos T fueron resuspendidos en 500 μ l de RPMI sin suero a 4 °C e incubados o no con mAbs en contra de CD43 (L10: 1 μ l de ascitis; MEM-59: 1 μ g/ml) o de otras moléculas como el complejo TcR/CD3 (5 μ g/ml) y CD28 (10 μ g/ml) durante 15 min a 4 °C, seguido de la adición e incubación por 15 min a 4 °C con el anticuerpo secundario (RamIg) en una proporción 1:1 con respecto al anticuerpo activante. Dependiendo de los experimentos, las células fueron activadas o no por distintos tiempos a 37 °C. Previamente a la lisis celular, las células fueron lavadas con PBS a 4 °C centrifugándolas a 10,000 x g durante 10 seg, con la finalidad de eliminar los anticuerpos no unidos en la membrana celular. Las células lavadas fueron lisadas en 100 μ l de solución amortiguadora de lisis (Hepes 25 mM pH 7.5, tritón X-100 0.5%, MgCl₂ 1.5 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.2 mM, ditioneol 0.5 mM e inhibidores de fosfatasa: fluoruro de fenilmetilsulfonil 4 mM, β -glicerofosfato 20 mM, NaF 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, y de proteasas: leupeptina 1 μ g/ml, aprotinina 1 μ g/ml) durante 40 min a 4°C y en agitación constante. El material insoluble en detergente fue removido centrifugando a 14,000 x g durante 15 min a 4 °C. De los lisados celulares (fracción soluble en detergente) se tomó el equivalente proteico de 2×10^6 células, se resuspendió en solución amortiguadora de muestra (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 15%, azul de bromofenol 0.001% y β -mercaptoetanol 5%), se dejaron hervir durante 5 min y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

Los complejos inmunes de los lisados celulares fueron aislados con proteína A-sefarosa 4-B (prot A-S4B) durante 1 h a 4 °C en agitación constante. A los lisados celulares libres de complejos inmunes (lisados preclarificados) se les agregaron anticuerpos en contra de las proteínas de interés a una concentración de 1 μ g/ml y se incubaron por 1 h en agitación constante a 4 °C. Los complejos inmunes formados por IgG's de ratón fueron capturados con prot A-S4B/RamIg incubándose por 1 h a 4 °C en agitación constante (Harlow and

Lane 1988). En el caso en que el anticuerpo usado fuera una IgG de conejo se utilizó únicamente prot A-S4B.

Los inmunoprecipitados fueron lavados una vez con solución amortiguadora TNE-T (Tris 50 mM, NaCl 140 mM, EDTA 5 mM y tritón X-100 1%), dos veces con TNE (misma solución amortiguadora sin tritón X-100) y una vez con H₂O destilada. A estos inmunoprecipitados se les agregó solución amortiguadora de muestra, se dejaron hervir durante 5 min y se guardaron a -20 °C hasta su uso.

3.4. Separación de proteínas por SDS-PAGE e inmuno-blot.

Los inmunoprecipitados así como los equivalentes celulares fueron resueltos en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, U., 1970) y las proteínas separadas por su peso molecular fueron transferidas a membranas (Towbin et al., 1979) de polyvinylidene difluoruro (Immobilon-P; Millipore, Medford, MA) con poro de 0.45 µm o a membranas de nitrocelulosa con poro de 0.2 µm (BioBlot-NC, Costar) en una cámara de transferencia semiseca (TransBlot SemiDry Transfer cell, Bio-Rad) durante 1 h a 100 mAmps. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada 5% (Carnation) disuelta en TBS-T (Tris-HCl 200 mM pH 7.5, NaCl 1.5 M y tween 20 al 0.05%) durante 1 h en agitación, a temperatura ambiente. Se agregó el primer anticuerpo diluido en leche descremada 5% -TBS-T y se dejó incubar por 1 h en agitación constante a temperatura ambiente. Se lavó la membrana por cinco periodos de cinco min con TBS-T y se agregó el anticuerpo secundario apropiado unido a peroxidasa de rábano (Amersham), manteniéndose en agitación constante durante 1 h. Nuevamente, la membrana fué lavada cinco veces por periodos de cinco min cada uno con TBS-T y se reveló por el método de quimioluminiscencia (ECL- Amersham).

3.5. Ensayo de fosfatidilinositol cinasa.

La activación, lisis celular e inmunoprecipitación se llevaron a cabo como se describió anteriormente excepto por el procedimiento de lavado que consistió en lo siguiente: los inmunoprecipitados obtenidos de células T activadas bajo distintas condiciones fueron lavados dos veces con PBS, dos veces con Tris 0.1 M pH 6.8, LiCl 0.5 M y dos veces con Tris 10 mM pH 7.5, NaCl 0.1 M y EDTA 1 mM. Se hizo una preparación fresca de 100 µg de fosfatidilinositol (Sigma) previamente disuelto en cloroformo. Después de evaporar el cloroformo con N₂, el fosfatidilinositol (PI) se resuspendió en 100 µl de Hepes 20 mM pH 7.4, se agitó en vortex y se sonicó de 20 a 30 min en un sonicador de baño. A cada inmunoprecipitado se le agregaron 10 µl de la solución de PI y se dejaron incubar durante 10 min a 4 °C. Los tubos se pre-equilibraron por 2 min a 30 °C y a cada inmunoprecipitado se le agregaron 40 µl de solución amortiguadora para cinasa [Hepes 100 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, 10 µCi [³²P] ATP (NEN, Dupont-easytide) y 10 µM ATP], se dejó incubar por 10 min a 30 °C. La reacción se detuvo agregando 0.4 ml de HCl 1 N y 0.4 ml de cloroformo/metanol (1:1). Después de centrifugar, se eliminó la fase acuosa y se agregaron 0.32 ml de HCl 1 N/ metanol (1:1) a cada tubo, volviéndose a descartar la fase acuosa. Los lípidos fosforilados fueron extraídos evaporando la fase orgánica con N₂ y fueron almacenados a -20 °C hasta su separación en placas de cromatografía de capa fina.

Las placas de silica gel 60 F₂₅₄ con refuerzo de aluminio (Merck) fueron pretratadas con oxalato de potasio 1%, EDTA 2 mM, 50% etanol con la finalidad de remover las impurezas y de mejorar la definición de los lípidos. Después de pretratarlas y previamente a su uso, las placas fueron activadas a 110 °C durante 30 min. Los lípidos marcados radioactivamente fueron resuspendidos en 30 µl de cloroformo/metanol (1:1) y se aplicaron 15 µl de cada muestra sobre las placas de silica gel pretratadas. Los cromatogramas se desarrollaron unidimensionalmente con 1-propanol/ácido acético 2 N (65:35) hasta llegar a casi 2 cm del borde de la placa y se dejaron secar a temperatura

ambiente. Los fosfolípidos marcados se detectaron por autorradiografía (Películas Hyperfilm-MP, Amersham) exponiendo las placas durante 24 a 48 h a -70°C . Los lípidos se visualizaron con vapor de yodo o con luz ultravioleta utilizando estándares de PI, PIP y PIP₂ (Sigma). Se utilizó el Phosphorimager (Molecular Dynamics) para cuantificar la radioactividad incorporada al fosfatidilinositol.

4. RESULTADOS

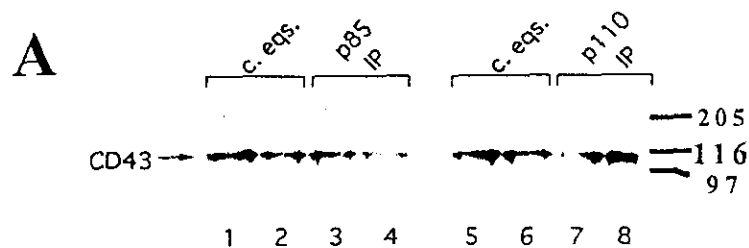
4.1. La subunidad reguladora así como la subunidad catalítica de PI3K se encuentran asociadas constitutivamente con CD43.

Se ha descrito que la activación de células linfoides a través de CD43 aumenta la avidéz con que la integrina linfocitaria CD11/CD18 (LFA-1) se une a su ligando ICAM-1 (Sánchez-Mateos et al., 1995). Por otra parte, la enzima PI3K ha sido relacionada con procesos de proliferación celular, cambios en la morfología del citoesqueleto, tráfico vesicular, incremento de la afinidad de moléculas co-receptoras por sus ligandos, entre otros (Shimizu et al., 1995, Shaw et al., 1997; Keely et al., 1997).

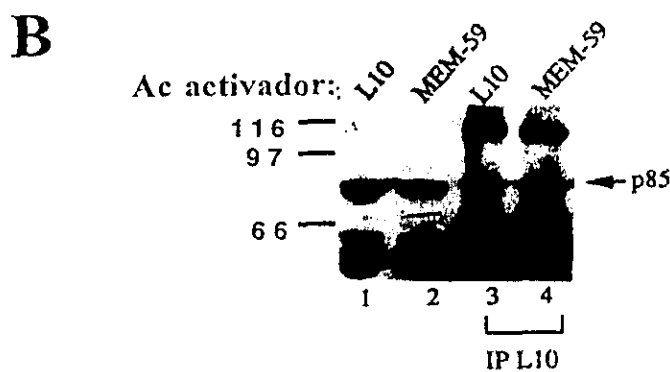
En este trabajo, nos preguntamos si la PI3K forma parte de la ruta de señalización de CD43 y la primera pregunta que nos hicimos fué si CD43 y PI3K interaccionaban entre si. Para ello, realizamos inmunoprecipitados (IP) de las subunidades de PI3K, p85 y p110 a partir de células T no estimuladas y buscamos a CD43 por inmunoblot con el anticuerpo anti-CD43, L10. En la figura 4.1 A se muestra un blot anti-CD43 donde se observa a CD43 en los inmunoprecipitados de p85 (carriles 3 y 4) así como en los inmunoprecipitados de p110 (carriles 7 y 8). La molécula co-precipitada con p85 o p110 tiene el mismo peso molecular que la molécula CD43, identificada en los carriles en los que se corrieron lisados celulares equivalentes a 2×10^6 células (c. eqs.) (carriles 1, 2, 5 y 6).

En función de la asociación de PI3K con CD43 en linfocitos T en reposo, nos preguntamos si esta asociación se mantiene en células T activadas. En la figura 4.1 B se muestra un inmunoblot anti-p85 de inmunoprecipitados de CD43 de linfocitos T estimulados durante 1 min con distintos anticuerpos monoclonales anti-CD43. Se encontró que la subunidad adaptadora de PI3K, p85 se encuentra asociada a CD43 en células T activadas con L10 (carril 3) y con MEM-59 (carril 4); de igual manera se observó a p85 en equivalentes celulares de células activadas con L10 (carril 1) y con MEM-59 (carril 2). Esto indica que

las dos subunidades de PI3K se encuentran unidas a CD43 de forma constitutiva, ya que no es necesaria la estimulación de linfocitos T a través de CD43 para la unión de estas proteínas y que aún después de 1 min de activación a través de CD43 la asociación entre CD43 y p85 se mantiene. Así mismo, en linfocitos T no estimulados, p110 se encuentra unida a CD43 (figura 4.1 A). A pesar de que no se muestra la asociación de p110 con CD43 en células estimuladas, ésta se puede deducir de las gráficas de actividad de PI3K en inmunoprecipitados de CD43 de células T activadas (figura 4.3, 4.4 A).



Blot: Anti-CD43



Blot: Anti-p85

Figura 4.1. PI3K se asocia a CD43 de forma constitutiva. A. 2×10^7 células T no activadas fueron lisadas y la cantidad equivalente de proteínas de 2×10^6 células (carriles 1, 2, 5 y 6), así como inmunoprecipitados de p85 (carriles 3 y 4) y de p110 (carriles 7 y 8) de 2×10^7 linfocitos T no estimulados fueron separados por SDS-PAGE, transferidos a inmobilón y la membrana fue inmunoblotada con el anticuerpo anti-CD43, L10. B. Células T (2×10^7) fueron estimuladas con dos anticuerpos anti-CD43 diferentes: mAb L10 (carriles 1 y 3) o mAb MEM-59 (carriles 2 y 4) por 1 min a 37 °C seguido de la inmunoprecipitación de CD43 con el anticuerpo L10. Los equivalentes celulares correspondientes a 2×10^6 células (carriles 1 y 2) así como los complejos inmunes (carriles 3 y 4) fueron resueltos por SDS-PAGE, transferidos a nitrocelulosa, incubados con anti-p85 y revelados por ECL. Se indican con flechas las proteínas correspondientes al peso molecular según marcadores de peso molecular. (Resultados similares fueron obtenidos en dos experimentos independientes).

4.2. La asociación PI3K-CD43 se puede competir con péptidos ricos en prolina.

La porción intracitoplásmica de CD43 contiene una región rica en prolina que presenta homología a secuencias consenso capaces de unir dominios SH3 (Pedraza-Alva et al., 1996). Debido a que la subunidad reguladora p85 contiene un dominio SH3 capaz de unir regiones ricas en prolina de distintas proteínas, nos preguntamos si la asociación de PI3K con CD43 es mediada directamente por estos dominios y si es posible inhibir esta interacción utilizando péptidos ricos en prolina.

Se sintetizaron dos péptidos de la región intracitoplásmica de CD43: CD43/363-378 ($^{363}\text{GAVDAPAPDEPEGGDG}^{378}$) y otro péptido de la misma región en el que la prolina central se mutó por alanina CD43/P-A ($^{363}\text{GAVDAPAADEPEGGDG}^{378}$). Además, se usaron péptidos de las dos regiones ricas en prolina de p85 capaces de unir dominios SH3 de distintas proteínas: p85/82-96 ($^{82}\text{SPPTPKPRPPRPLP}^{96}$) y p85/300-314 ($^{300}\text{ERQPAPALPPKPPKP}^{314}$) (Kapeller et al., 1994). A lisados celulares de células T no estimuladas se les agregaron los distintos péptidos ricos en prolina dejando incubar durante 20 min a 4°C; se hicieron inmunoprecipitados de p110 y las muestras resueltas por SDS-PAGE fueron transferidas a inmóvilón. La presencia de CD43 fue evaluada incubando las membranas con el anticuerpo anti-CD43, L10. En la figura 4.2, se observa que cuando no se adicionó péptido (carriles 1, 3, 5 y 7), PI3K se encuentra unida a CD43 de forma constitutiva, corroborando los resultados de la figura 4.1A, donde CD43 co-precipita con p110 en células T no estimuladas. Al adicionar el péptido CD43/363-378 (carril 2) o el péptido p85/300-314 (carril 8) a una concentración de 50 μM se inhibió la interacción PI3K-CD43, a diferencia del péptido CD43/P-A (carril 4) o del péptido p85/82-96 (carril 6). Estos resultados indican que la interacción de PI3K con CD43 puede estar mediada por dominios SH3 y regiones ricas en prolina respectivamente.

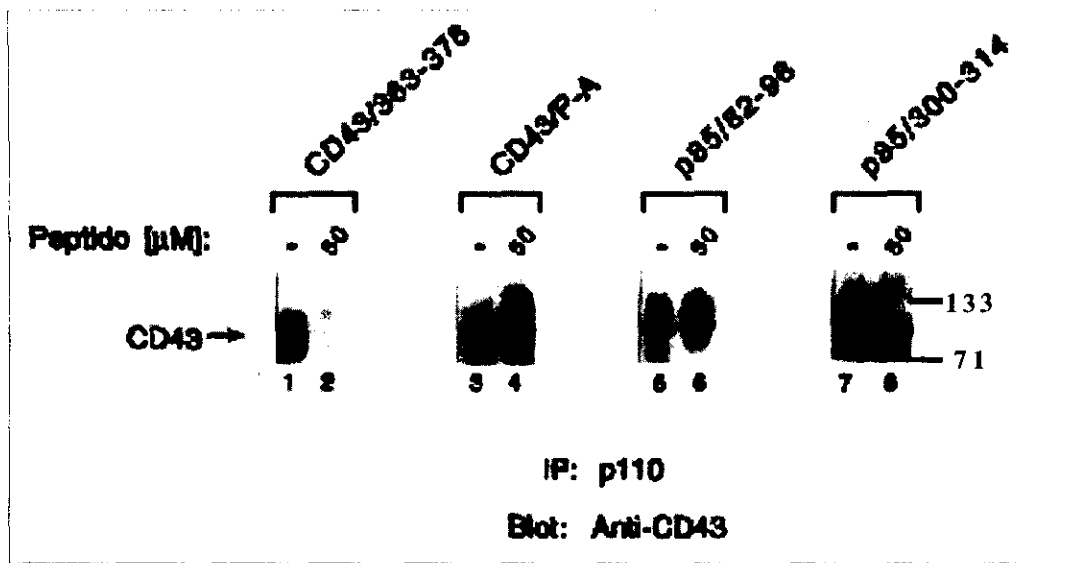


Figura 4.2. Péptidos ricos en prolina inhiben la unión CD43-PI3K. Los lisados celulares de 2×10^7 linfocitos T (carriles 1, 3, 5 y 7) fueron incubados por 20 min a 4°C con diferentes péptidos ricos en prolina: CD43/363-378 (carril 2), CD43/P-A (carril 4), p85/82-96 (carril 6) o p85/300-314 (carril 8), antes de hacer inmunoprecipitados de p110. Los complejos inmunes fueron resueltos por SDS-PAGE, transferidos a inmobilón, incubados con el anticuerpo anti-CD43 L10 y revelados por ECL. La flecha indica la presencia de CD43 según marcadores de peso molecular. (Experimento representativo de dos independientes).

4.3. Existe un complejo enzimático de PIK asociado a CD43.

Con la finalidad de indagar la implicación biológica de la asociación de p85 y de p110 con CD43, se evaluó la actividad de fosfatidilinositol cinasa en inmunoprecipitados de CD43 de células T no estimuladas, estimuladas con el anticuerpo anti-CD43, L10 o con un anticuerpo irrelevante, 3D6. En la figura 4.3 se puede observar que en los inmunoprecipitados de CD43 de las células T no estimuladas existe una actividad de PIK basal (referida como el 100%), ligeramente superior a la encontrada en los inmunoprecipitados de células T estimuladas a través de CD43 (75%). En las células incubadas con el anticuerpo irrelevante no se encontró un cambio significativo de la actividad de PIK que co-precipita con CD43 (95%), en comparación con la actividad de PIK encontrada en las células no activadas.

Los resultados anteriores indican que existe actividad de PIK asociada a CD43. Nos preguntamos entonces si esta actividad enzimática era llevada a cabo por la PI3K y para ello utilizamos un inhibidor específico de esta. La wortmanina es un metabolito fúngico con fuerte actividad anti-inflamatoria. En pequeñas concentraciones (orden nM) bloquea la actividad de PI3K estimulada por fMLP *in vitro* y la síntesis de PIP₃ en neutrófilos (Arcaro, A. and Wymann, P. 1993). Sin embargo, en un experimento preliminar no encontramos una inhibición significativa de la actividad de PI3K asociada a CD43 ocasionada por la wortmanina (datos no mostrados).

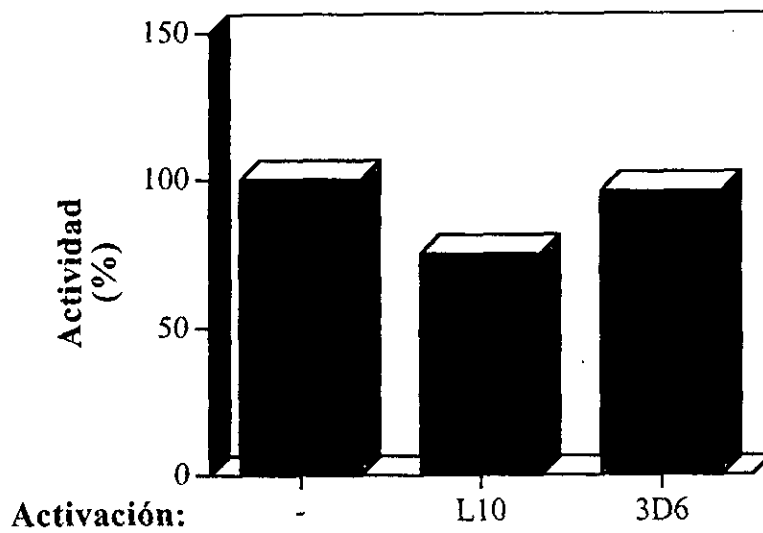


Figura 4.3. La PIK asociada a CD43 es activa. Linfocitos T (2×10^7) fueron activados o no por entrecruzamiento a 37 °C con anticuerpos anti-CD43 (L10: 1 μ l de ascitis/ 0.5 ml) durante 2 min o con el anticuerpo irrelevante 3D6 (1 μ l de ascitis/ 0.5 ml) durante 2 min a 37 °C, después de lo cual se hicieron inmunoprecipitados de CD43. Se evaluó la actividad de cinasa unida a los complejos inmunes con un Phosphorimager (Molecular Dynamics). (Se muestra un experimento representativo de tres independientes).

4.4. La actividad de PIK asociada a CD43 disminuye en respuesta a la activación a través de CD43, mientras que la actividad de PI3K no asociada a CD43 aumenta.

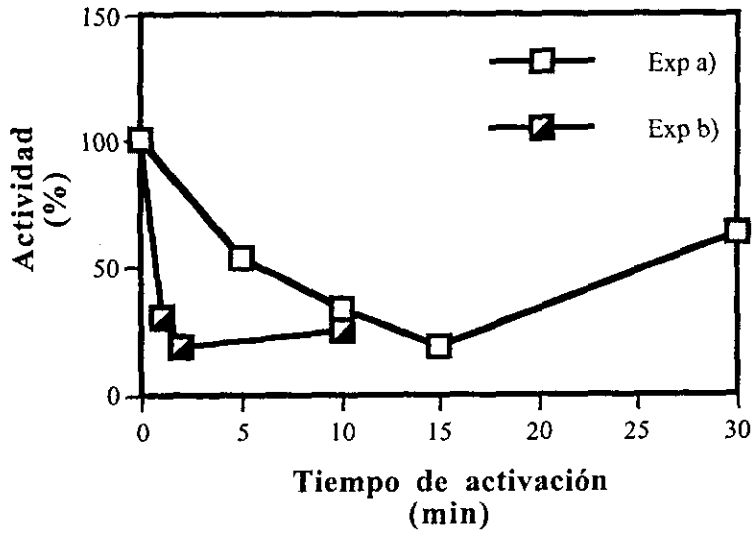
A fin de determinar la actividad de cinasa de fosfoinosítidos asociada a CD43 en respuesta a la estimulación de linfocitos T a través de CD43, se realizaron cinéticas de activación de células T. Se hicieron inmunoprecipitados de CD43 y se cuantificó la actividad de PIK con estos. En la figura 4.4 A se muestran dos cinéticas obtenidas a partir de experimentos diferentes. Los valores obtenidos fueron estandarizados a valores relativos para su comparación. En ambos casos el comportamiento de la actividad de PIK en respuesta a la activación de linfocitos T a través de CD43 decrece. En la figura 4.4 A, a) la actividad de cinasa disminuye dentro de los primeros 5 min de estimulación (50%) y continúa decreciendo hasta los 15 min donde llega al mínimo (20%). A partir de este tiempo la actividad enzimática comienza a aumentar, alcanzando hasta un 70% de la actividad basal después de 30 min de activación celular. En la misma figura, se muestra otra cinética de activación celular a tiempos menores (b). Se aprecia un patrón similar de disminución de la actividad de cinasa a partir de la estimulación celular a 37 °C de forma CD43- dependiente: después de 1 min de estimulación la actividad decrece (30%) y continúa disminuyendo a los 2 min (20%), aumentando ligeramente a partir de los 10 min. Esta disminución de la actividad de PIK asociada a CD43 correlaciona con los resultados de la figura 4.3, donde dicha actividad disminuye en respuesta a la estimulación a través de CD43. El que los tiempos a los que alcanza el mínimo y máximo de activación en cada uno de los experimentos difieran puede deberse al hecho que cada individuo responde de manera ligeramente distinta, dependiendo de muchas variables sobre las cuales no tenemos control.

En otra cinética de activación de linfocitos T a través de CD43, y después de preclarificar los complejos inmunes formados por el anticuerpo activante L10, se hicieron inmunoprecipitados de p85 a partir de los cuales se cuantificó la actividad de PI3K (figura

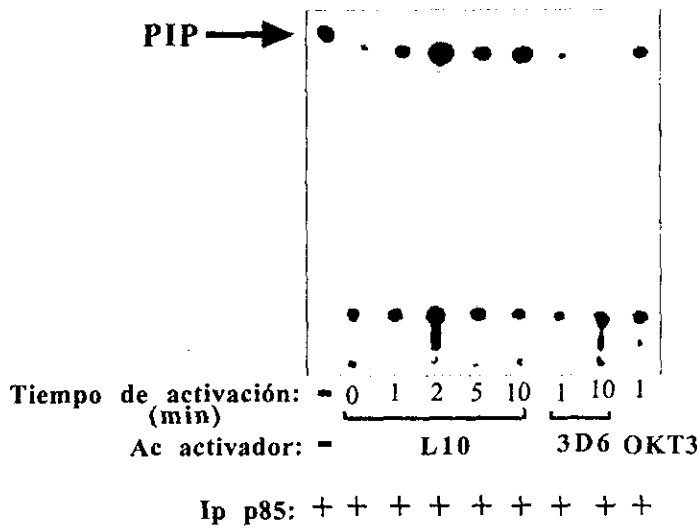
4.4 B y C). Se encontró que la actividad de PI3K no asociada a CD43 aumenta en respuesta a la estimulación con anti-CD43 en función del tiempo. Así, después de 1 min de activación, se incrementa la actividad de PI3K libre, llegando a un máximo a los 2 min de activación, y disminuye nuevamente a los 5 min, para alcanzar niveles similares a los encontrados después de 1 min de estimulación. En los inmunoprecipitados de p85 de células estimuladas durante 1 o 10 min con el anticuerpo irrelevante 3D6 no se observaron cambios significativos en la actividad de cinasa. En las células no estimuladas se encontró una actividad de cinasa dos veces mayor en comparación con la encontrada en las células estimuladas con los anticuerpos L10, 3D6 u OKT3.

De tal modo que encontramos que a los tiempos a los que decrece la actividad de PI3K asociada a CD43 hay un incremento en la actividad de la misma enzima en los inmunoprecipitados de p85.

A



B



C

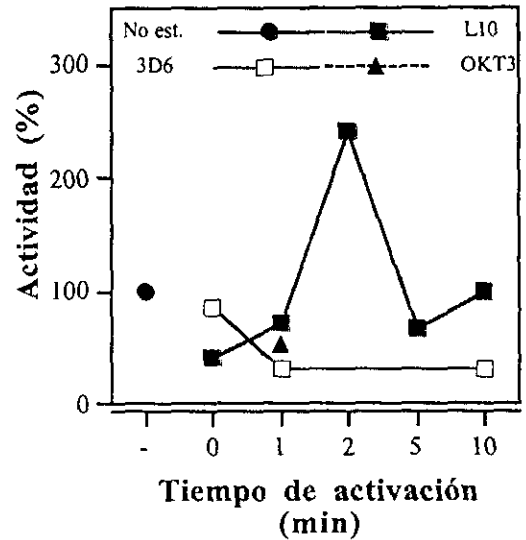


Figura 4.4. La actividad de PIK asociada a CD43 disminuye en respuesta a la estimulación a través de CD43 a diferencia de la PI3K no asociada a CD43. **A.** 2×10^7 células T fueron activadas con L10 a 37 °C durante los tiempos indicados. Se precipitaron los complejos inmunes con proteína A-S4B y se cuantificó la actividad de cinasa asociada a CD43. **B.** 2×10^7 linfocitos T fueron tratados o no con L10, OKT3 o 3D6 durante los tiempos indicados a 37 °C. Se inmunoprecipitó p85 de los lisados celulares preclarificados y se determinó la actividad de PI3K. En B se muestra la autoradiografía de las muestras desarrolladas por cromatografía de capa fina. En C se puede observar el comportamiento de la actividad de PI3K durante el tiempo en respuesta a la estimulación a través de CD43. [Resultados similares fueron obtenidos en tres (A) o dos (B; C) experimentos independientes].

4.5. La subunidad reguladora de PI3K, p85 se une específicamente a la región intracitoplásmica de CD43 y esto correlaciona con actividad de cinasa.

Con la finalidad de valorar la unión de p85 a la región intracitoplásmica de CD43 se utilizó una proteína de fusión expresada en bacterias que codifica para la proteína glutatión S-transferasa fusionada con la región intracitoplásmica de CD43 (GST-CD43). Esta proteína inmovilizada sobre esferas de sefarosa 4-B-glutatión se uso como sonda para precipitar proteínas intracelulares que interactúan con la región citoplásmica de CD43. En la figura 4.5 A se puede apreciar que GST-CD43 es capaz de unir a la proteína adaptadora de PI3K (carril 2) y que esta interacción se abatió al agregar un péptido que corresponde a una región rica en prolina de p85: p85/300-314 [50 μ M] (carril 1), mismo que compite con la asociación de PI3K a CD43 (figura 4.2). Al incubar los lisados celulares con GST no se observó a p85 (carril 3), indicando que esta proteína no se une de forma inespecífica a GST o a sefarosa 4-B-glutatión.

Así mismo, nos preguntamos si la asociación de p85 con la proteína de fusión GST-CD43 incluía actividad de PI3K y si esta actividad podría inhibirse con wortmanina. En la figura 4.5 B se muestra que la PI3K asociada a la proteína de fusión GST-CD43 es activa y que al preincubar los linfocitos T con wortmanina es posible abatir esta actividad. Los resultados fueron normalizados con respecto a la actividad de PI3K de sus controles respectivos. Como puede verse en esta figura, tanto la actividad de PI3K inducida por CD28 como la asociada a GST-CD43 es sensible a wortmanina. En ambos casos la wortmanina inhibe en un 50 - 60% de la actividad enzimática. La inhibición de PI3K inducida por CD28 con el inhibidor wortmanina es consistente con lo reportado en la literatura (Truitt et al., 1994; Hutchcroft et al., 1995).

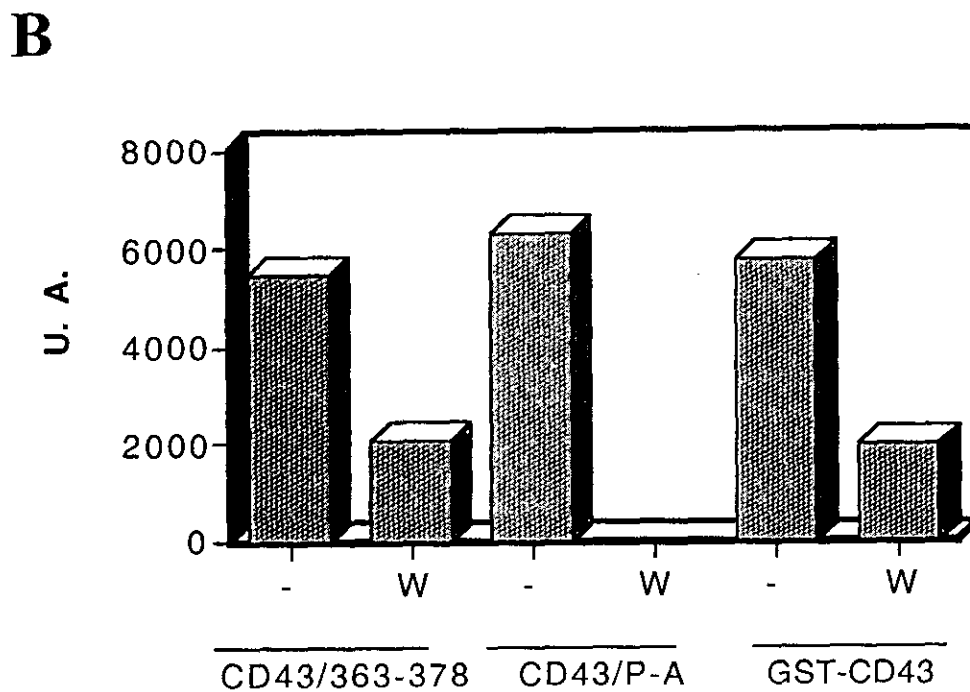
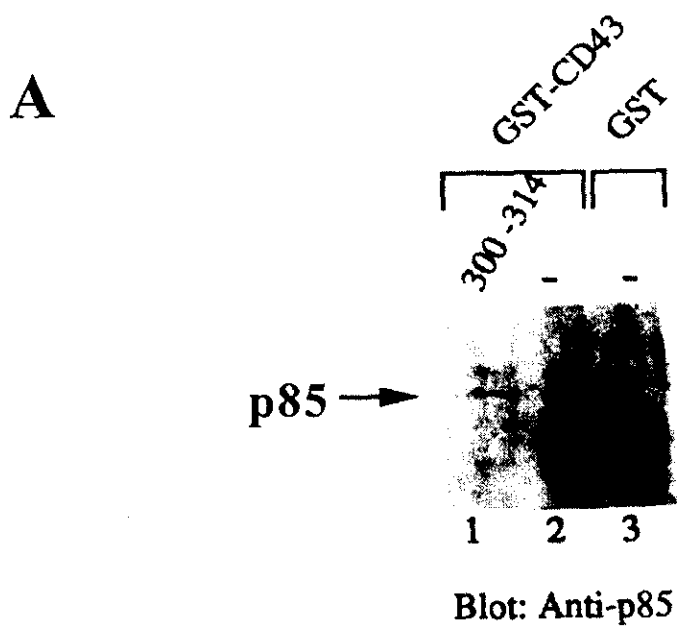


Figura 4.5. PI3K se une a GST-CD43 probablemente por un dominio SH3. **A.** Lisados de 2×10^7 células T en reposo fueron incubados con GST-CD43 (carriles 1 y 2) en presencia (carril 1) o ausencia (carril 2) de $50 \mu\text{M}$ del péptido p85/300-314 o sólo con GST (carril 3). Los complejos proteicos resultantes fueron separados por SDS-PAGE, transferidos a nitrocelulosa e inmunobloteados con anti-p85. **B.** 2×10^7 linfocitos T fueron preincubados o no con wortmanina (100 nM) durante 20 min a 4°C , estimulados por entrecruzamiento con el anticuerpo anti-CD28 ($9.3: 1 \mu\text{g/ml}$) durante 5 min a 37°C o los lisados celulares fueron incubados con la proteína de fusión GST-CD43 durante 15 min a 4°C . Se hizo el ensayo de cinasa con los complejos formados y se cuantificó la actividad en un Phosphorimager. (Se muestra un experimento representativo de dos independientes).

4.6. Existe una fosfatidilinositol cinasa de tipo II en el complejo de CD43.

En algunos experimentos, la incapacidad de la wortmanina para inhibir la actividad de PIK encontrada en el complejo de CD43 (datos no mostrados) puede sugerir que hay otras cinasas de fosfoinosítidos asociadas a CD43 además de PI3K. Se han descrito otras PIK, en particular PIK de tipo II que es una proteína asociada a membrana capaz de fosforilar el fosfatidilinositol en la posición D-4 del anillo de myo-inositol para producir PI 4-P. La actividad de PI4K es estimulada por la adición de detergentes no iónicos e inhibida de forma competitiva por adenosina, AMP y ADP. En la figura 4.6 se muestra la actividad de cinasa encontrada en inmunoprecipitados de CD43 de células T no estimuladas, estimuladas con L10 o 3D6, a los cuales se agregó NP-40 (0.05%). Se encontró que la actividad de PIK se incrementa considerablemente por la adición del detergente y sugiere que se trata de una cinasa de tipo II. Así mismo, se observa que la actividad de PIK de tipo II encontrada en los inmunoprecipitados de CD43 de células activadas durante 2 min con anticuerpos anti-CD43 es menor que la actividad encontrada en células no estimuladas o estimuladas con el anticuerpo irrelevante 3D6, de manera semejante a lo observado en la actividad de PIK asociada a CD43 (figuras 4.3; 4.4 A).

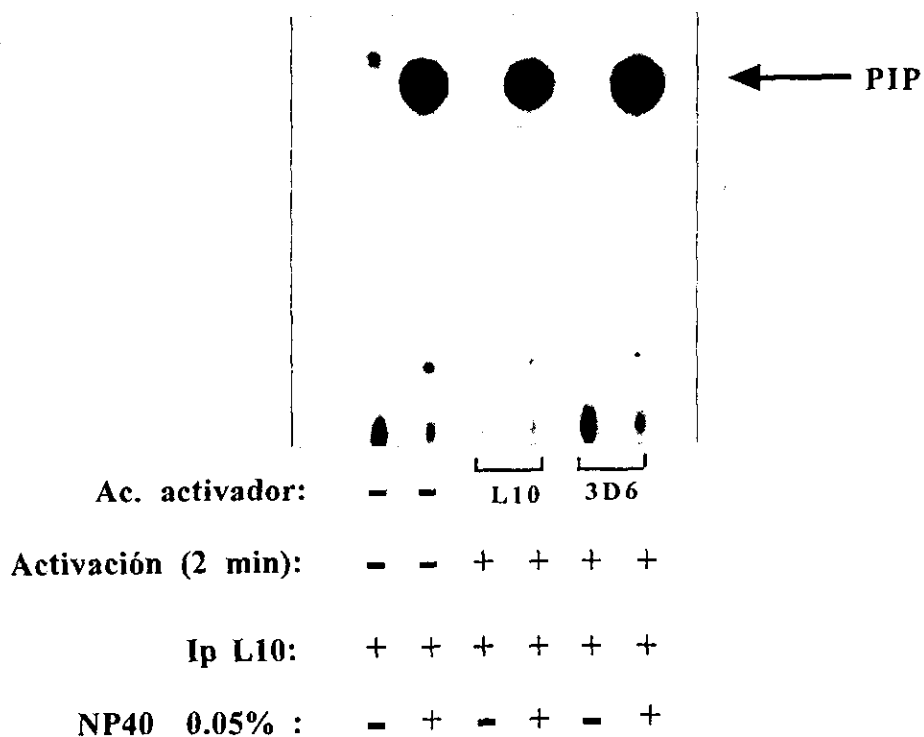
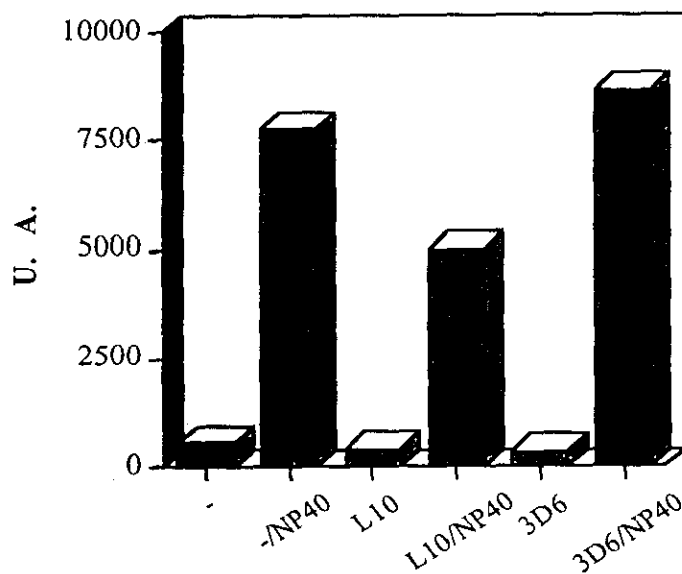
A**B**

Figura 4.6. PIK de tipo II se asocia a CD43. Los inmunoprecipitados de CD43 de 2×10^7 células T no estimuladas, estimuladas con L10 o 3D6 durante 2 min a 37°C , se les agregó NP-40 para alcanzar una concentración final de 0.05%. Se realizó el ensayo de PIK y se muestra la autoradiografía de las muestras desarrolladas por cromatografía de capa fina (A) y los fosfolípidos radiactivos fueron cuantificados con un Phosphorimager (B). (El experimento mostrado es representativo de tres experimentos independientes).

5. DISCUSION

La molécula CD43 es una molécula abundante en la superficie de los linfocitos T, no obstante, sus funciones fisiológicas son aún pobremente entendidas. La información existente en la literatura acerca del papel de CD43 sugiere que esta molécula, al interactuar con su(s) ligando(s) regula por un lado las interacciones célula-célula de los linfocitos T a la vez que genera señales intracelulares que culminan en la regulación de distintos genes.

Recientemente en el laboratorio se identificaron varias de las moléculas que participan en la(s) vía(s) de señalización de CD43. La cinasa de tirosinas Fyn se asocia a CD43 (Pedraza-Alva et al., 1996), y la proteína adaptadora Shc es fosforilada en tirosina en respuesta a la estimulación de linfocitos T con el mAb anti-CD43, L10. Después de la activación a través de CD43 se forma un complejo multimolecular constituido por Shc-PY, Cbl y Grb2. Así mismo, las señales dependientes de CD43 involucran a otra molécula adaptadora exclusiva de células linfoides, SLP-76. El entrecruzamiento de CD43 con el anticuerpo L10 activa a la MAP cinasa ERK2, induciendo su translocación al núcleo (Pedraza-Alva et al., 1998).

El hecho que existan dos isoformas de CD43 (Rosenstein et al., 1993) y por lo menos tres ligandos (Rosenstein et al., 1991, Stockl et al., 1996; Baum et al., 1995), sugiere que se puede generar una variedad de señales a través de CD43, mismas que podrían culminar en distintas funciones efectoras como son la progresión del ciclo celular, diferenciación celular y rearrreglos del citoesqueleto.

Se ha sugerido que la PI3K interviene en diversos procesos biológicos como re-arreglos en la estructura del citoesqueleto, aumento de la adhesión celular mediada por integrinas y tráfico vesicular, entre otros. Inhibidores específicos de la PI3K tales como la wortmanina y el compuesto LY294002 son capaces de evitar cambios en el citoesqueleto como son la

formación de lamelipodia y de fibras de estrés, lo cual sugiere que PI3K participa en estos rearreglos (Keely et al., 1997). Se ha reportado que diversas moléculas de la superficie de células linfoides generan señales que inducen la actividad enzimática de PI3K. Ejemplos de dichas moléculas son los co-receptores CD2, CD7 o CD28. La actividad de PI3K descrita para estas moléculas se ha asociado con distintas funciones efectoras de estas células entre las cuales está la adhesión de la integrina $\alpha 4\beta 1$ a fibronectina (Kolanus, W. and Seed, B. 1997). En este trabajo nos enfocamos a analizar la participación de la enzima PI3K en las vías de señalización de CD43.

El primer paso en la búsqueda de información acerca de la participación de PI3K en la ruta de señalización de CD43 fué saber si ambas moléculas se asociaban. En la figura 4.1 A se observa a CD43 en inmunoprecipitados de p85 y p110 de células T no estimuladas. También encontramos a p85 en inmunoprecipitados de CD43 de células T estimuladas con distintos anticuerpos monoclonales anti-CD43 (figura 4.1 B). Las interacciones mediadas a través de los dominios SH3 y regiones ricas en prolina suelen ser independientes de la estimulación, a diferencia de las asociaciones dependientes de la estimulación que inducen la fosforilación en tirosina tanto de receptores como de otras cinasas de tirosina (Vartikovski, comunicación personal; Fukui and Hanafusa 1989; Truitt et al., 1994). Nuestros resultados sugieren que la asociación de CD43 a PI3K no requiere de la estimulación y que se trata de una asociación constitutiva, como la que se ha descrito entre PI3K y la región rica en prolina de CD2 (Shimizu et al., 1995).

El hecho que CD43 contenga una región rica en prolina plantea la posibilidad de que interactúe con proteínas que contienen dominios SH3. Entre estas se encuentra Fyn, y como lo demostramos en este trabajo posiblemente p85. Los resultados previamente obtenidos en el laboratorio sugieren que la interacción entre CD43 y Fyn se da a través de la región rica en prolina de CD43 y el dominio SH3 de Fyn. Nos preguntamos entonces si

CD43 podría, por medio de la misma región rica en prolina, interactuar con PI3K. Los resultados obtenidos con los péptidos CD43/363-378 y p85/300-314 sugieren que p85 se une mediante su dominio SH3 a la región rica en prolina de CD43 y que esta unión es específica, ya que los péptidos CD43/P-A y p85/82-96 no inhibieron dicha unión (figura 4.2). Es posible que CD43 interactúe también con otras proteínas con dominios SH3 tales como proteínas del citoesqueleto (Yamada and Geiger, 1997).

Sabiendo que PI3K se une a CD43 tanto en células T no estimuladas como en células T activadas, nos preguntamos si esta enzima poseía actividad de cinasa de PI al estar asociada con CD43. Encontramos que en inmunoprecipitados de CD43 de células T activadas o no, PI3K es activa. Sin embargo, la actividad de PIK asociada a CD43 disminuye después de la estimulación de linfocitos T a través de CD43 (figura 4.3; 4.4 A). Se observa una fuerte disminución de la actividad de PI3K asociada a CD43 en los primeros 5- 10 min después de la activación de los linfocitos a través de CD43 y luego se empieza a ver una recuperación. Paralelamente la actividad de PI3K no asociada a CD43 aumenta en función del tiempo de estimulación con anti- CD43 (figura 4.4 B y C). Estos resultados, en conjunto con los de la figura 4.4 A sugieren que existe una complementación entre la actividad de PI3K unida a CD43 con la actividad de PI3K soluble de células estimuladas con L10, ya que mientras que la actividad de PIK unida a CD43 disminuye en función de la estimulación, la actividad de PI3K no asociada a CD43 aumenta con ella. También podría tratarse de un incremento o decremento en la actividad de PI3K más que de la asociación o disociación de PI3K a CD43 en respuesta a las señales generadas a través de CD43, ya sea por fosforilación, de-fosforilación u ocasionando la disociación del heterodímero p85- p110. En respuesta al entrecruzamiento de CD43 se podría activar alguna proteína que a su vez fuera responsable de activar a la PI3K que no está unida a CD43. Otra posibilidad sería la disociación del complejo PI3K-CD43 de

forma CD43-dependiente, incrementándose de esta forma la actividad de PIK. Sin embargo, no tenemos resultados que comprueben esta hipótesis.

Este trabajo se realizó con linfocitos T humanos aislados a partir de concentrados leucocitarios de donadores "sanos". Sin embargo, durante el desarrollo de las cinéticas de activación encontramos variaciones cuantitativas de un donador a otro, aunque por lo general las tendencias fueron semejantes.

Es posible que las señales generadas a través de CD43 activen enzimas capaces de fosforilar a p85 o a p110 en residuos de tirosina, serina o treonina, provocando la disociación de PI3K de CD43 o su inactivación. La fosforilación de p85 en tirosina regula la afinidad con la que esta molécula se une a receptores distintos de membrana y la fosforilación de p110 en tirosina ocasiona que disminuya la capacidad de fosforilación de PI por esta molécula. Lck es una de las proteínas cinasas que realizan esta regulación fosforilando a ambas subunidades (von Willebrand et al., 1994). Recientemente Pedraza-Alva et al., (1996), reportaron que Fyn, otra cinasa de tirosina de la familia de Src, se asocia a CD43 y que la actividad de Fyn aumenta en respuesta a la estimulación CD43-dependiente. CD43 podría inducir la fosforilación de p85 o de p110 a través de la cinasa Fyn, regulando indirectamente la actividad de PI3K. Además, se ha identificado una actividad de cinasa de proteínas intrínseca de p110 que fosforila residuos de serina y treonina en PI3K. Esta cinasa fosforila a ambas subunidades de PI3K y es posible purificarla con anticuerpos anti-p85. p85 es fosforilada en tres sitios de forma idéntica tanto *in vitro* como *in vivo* y dicha fosforilación es capaz de disminuir la actividad de PI3K de tres a siete veces, siendo reversible esta inhibición al incubar a PI3K con fosfatasa 2A (Carpenter et al., 1993; Dhand et al., 1994). Podría pensarse también que esta actividad de cinasa sea estimulada por CD43. Alternativamente, CD43 podría sufrir un cambio estructural después de la estimulación con el mAb anti-CD43 L10 y este cambio ocasionaría la disociación de PI3K del complejo de CD43.

Al utilizar una proteína de fusión que contiene la región intracitoplásmica de CD43 unida a GST (fig 4.5 A), comprobamos la interacción entre CD43 y p85: Así mismo, al agregar el péptido p85/300-314, rico en prolina, encontramos que ese péptido era capaz de competir la interacción de GST-CD43 con p85. Este resultado sugiere que esta unión es mediada por la región rica en prolina de CD43. Es posible que p85 se una directamente a CD43, sin embargo también es factible que la interacción sea mediada por otra proteína unida a la región rica en prolina de CD43 y que a su vez esta interactúe con PI3K o con otra(s) proteína(s) adaptadora(s).

El que p85 se una a la proteína de fusión GST-CD43 (figura 4.5 A), sugiere que *in vitro* PI3K también podría hacerlo. Para evaluar esta posibilidad, incubamos esferas de S4B-glutación-GST-CD43 con lisados de linfocitos T no estimulados, previamente incubados o no con wortmanina, un inhibidor específico de p110. Encontramos que junto con p85, PI3K se une a la proteína de fusión GST-CD43, y que la actividad enzimática es bloqueada al preincubar las células con wortmanina (figura 4.5 B). GST-CD43 es expresada en bacterias, por lo que no se encuentra fosforilada en residuos de serina como sucede con la proteína nativa (Piller et al., 1989). De tal modo que nuestros resultados sugieren que la/las cinasas de fosfoinosítidos se unen a CD43 independientemente del estado de fosforilación de CD43. Este resultado parece contradecirse con aquellos que obtuvimos en un experimento preliminar en el cual preincubamos linfocitos T con wortmanina antes de lisar las células, inmunoprecipitar CD43 y medir la actividad de PI3K asociada a CD43, los cuales no sugerían que esta actividad fuera sensible al efecto de la wortmanina (datos no mostrados). El hecho que la actividad de PIK asociada a la molécula CD43 nativa no sea aparentemente susceptible a wortmanina se podría explicar de varias maneras: Una de ellas, es que la actividad de cinasa de fosfoinosítidos fuera de tipo PI3K pero que fuera sensible a concentraciones mayores de wortmanina (3 μ M vs 100 nM en nuestros experimentos), como es el caso de una PI3K descrita en humanos y que

tiene un alto grado de homología con VPS34, una PI3K que se encuentra en levaduras, y que está relacionada con el transporte de vesículas, (Volinia et al., 1995). Otra posibilidad es que sea una PI3K poco sensible a inhibidores como wortmanina y LY294002, como la descrita por Domni et al (1997). Finalmente, se podría pensar que la actividad de PIK que encontramos asociada a CD43 podría deberse a la presencia de otra enzima, además del complejo p85- p110.

Investigamos esta última posibilidad con el objeto de averiguar que otras PIKs se encuentran asociadas a CD43. Se midió la actividad de PIK en presencia del detergente no iónico NP-40 [0.05%] en inmunoprecipitados de CD43 de células activadas o no a través de CD43. Los resultados de este experimento muestran que la actividad de PIK aumentó considerablemente en presencia de detergente (figura 4.6), sugiriendo que se trata de una fosfatidilinositol cinasa de tipo II, ya que se activa con detergentes no iónicos.

Una de las enzimas claves en la señalización por DG e incremento en Ca^{2+} intracelular es la PI4K. Esta enzima fosforila el anillo de myo-inositol del fosfatidilinositol en la posición D-4, produciendo PI 4-P (Whitman et al., 1988). El PI 4-P es el precursor del PI 4,5-P₂, y este a su vez es sustrato de la PLC γ 1. Se piensa que PI4K genera el precursor del PI 4,5-P₂, sustrato de la fosfolipasa C γ 1. El que CD43 este asociado a una enzima con actividad de PI4K podría explicar como se recluta a PKC y como se genera el incremento de Ca^{2+} intracelular en respuesta a las señales mediadas por CD43 (Wong R. et al., 1990). Recientemente se encontró que CD63 y CD81 co-precipitan actividad de PI4K. CD63 y CD81 son proteínas transmembranales que forman asociaciones específicas con integrinas y han sido relacionadas con la regulación de la adhesión, movilidad y proliferación celular (Berditchevski et al., 1997), de tal modo que PI4K podría participar en la transducción de señales involucradas en la regulación de la adhesión celular.

Aunque el papel de los fosfoinosítidos generados por las PIKs es bastante incierto aún, se ha descrito su participación en la regulación de la actividad de distintas proteínas. El descubrimiento de los dominios PH cuya afinidad por los diferentes fosfoinosítidos es elevada, ha generado las pistas que relacionan la unión de receptores transmembranales en el exterior de las células con la activación de diversas proteínas intracelulares, colocando a las PIKs como las proteínas mediadoras de este proceso.

Vav intercambia GDP por GTP en Rac y su actividad es regulada de forma secuencial por PI3K y por Lck, es una proteína con homología a Dbl y como tal, contiene un dominio PH situado en el extremo carboxilo terminal del dominio de intercambio de nucleótidos (GEF). El dominio PH une fosfoinosítidos a la vez que regula la fosforilación en tirosina de Vav mediada por Lck. Vav unido a PI 4,5-P₂ no es fosforilado por Lck, mientras que, al unirse con PI 3,4,5-P₃, Vav es fosforilado y activado por Lck. De esta forma, la fosforilación de PI 4,5-P₂ por PI3K genera PI 3,4,5-P₃ y regula la actividad de Vav y de Rac e induce cambios en el citoesqueleto (Han et al., 1998).

Recientemente, Pedraza-Alva et al., 1998, encontraron que la proteína Vav es fosforilada en tirosina en respuesta a la estimulación de linfocitos T a través de CD43 y que la fosforilación aumenta de forma concomitante con el tiempo. Así mismo, y como ya se mencionó, Vav se asocia con Shc en células T estimuladas a través de CD43 y en células no estimuladas. La fosforilación en tirosina de Vav así como la de Shc aumentan en respuesta a las señales CD43- específicas. Si CD43 induce la fosforilación en tirosina de Vav, y este último participa en la activación de Rac, y además, si PI3K está unida a CD43, ¿cual será la implicación biológica que conlleva esta asociación? Rac es una GTPasa, responsable de inducir cambios morfológicos como la formación de "ruffles" y lamelipodia, por lo que se puede pensar que algunas de las interacciones intermoleculares generadas por las señales dependientes de CD43 regulan cambios en el citoesqueleto. Si los fosfoinosítidos que se generan de forma basal por la PI3K unida a CD43 en células no

activadas son PI 3-P, PI 3,4-P₂ y PI 3,4,5-P₃ y si la estimulación a través de CD43 disminuye la producción de éstos, se podría pensar que CD43 transduce señales inhibitorias para algunas proteínas como Vav a la vez que recluta otras proteínas cuyos dominios PH presenten alta afinidad por PI 4-P ó PI 4,5-P₂ como proteínas de citoesqueleto que unen actina. Tal es el caso por ejemplo de profilina, una proteína con alta afinidad por PI 4,5-P₂ que permite la polimerización de actina (Singh et al., 1996). Será necesario realizar experimentos para analizar esta posibilidad y otras mas.

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que al menos dos cinasas de fosfolípidos estan asociadas a CD43. Será necesario realizar experimentos adicionales para conocer la identidad de la(s) otra(s) proteína(s) involucrada(s) en la señalización de fosfoinosítidos mediada por CD43, así como la(s) funciones biológicas de esta abundante glicoproteína de la superficie de las células linfoides.

6. CONCLUSIONES

La subunidad reguladora así como la subunidad catalítica de PI3K se encuentran asociadas constitutivamente con la región intracitoplásmica de CD43.

La enzima PI3K asociada a CD43 es activa y su actividad disminuye en función de la activación a través de CD43.

La asociación de p85 con CD43 se puede competir con péptidos ricos en prolina.

Existe otra fosfatidilinositol cinasa de tipo II asociada a CD43, cuya actividad se estimula con detergentes no-iónicos.

7. BIBLIOGRAFIA.

- Abbas, A., Lichtman, A. and Pober, J. (1997) Cellular and molecular Immunology. W. B. Saunders Company. 457 pp.
- Abramson, J.S., and Hudnori, H.R. (1995) Role of the sialophorin (CD43) receptor in mediating influenza A virus induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction. *Blood*. **85**: 1615- 1619.
- Alvarado, M., Klassen, C., Cerny, J., Horejci, V. and Schmidt, R.E. (1995) MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1051-1055.
- Arcaro, A. and Wymann, M. P. (1993) Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem. J.* **296**: 297- 301.
- Auger, K. R., Serunian, L. A., Soltoff, S. P., Libby, P. and Cantley, L. C. (1989) PDGF-Dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell*. **57**: 167- 175.
- Axelsson, B., Yousefi-Etemad, R., Hammerstrom, S., and Perlmann, P. (1988) Induction of aggregation and enhancement of proliferation and IL-2 secretion in human T cells by antibodies to CD43. *J. Immunol.* **141**, 2912-2917.
- Backer, J. M., Myers Jr. M. G., Shoelson, S. E., Chin, D. J., Sun, X. J., Miralpeix, M., Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E. Y., Schlessinger, J. and White, M. F. (1992) Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J.* **11**: 3469- 3479.
- Baekstrom, D. (1997) Post- translational fate of a mucin- like leucocyte sialoglycoprotein (CD43) aberrantly expressed in a colon carcinoma cell line. *J. Biol. Chem.* **272**: 11503- 11509.
- Baum, L.G., Pang, M., Perillo, N.L. and Wu, T. (1995) Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med.* **181**, 877- 887.
- Bazil, V., and Strominger, J. L. (1993) CD43, the Major sialoglycoprotein of human leukocytes, is proteolytically cleaved from the surface of stimulated lymphocytes and granulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 3792- 3796.
- Berditchevski, F., Toliás, K., Wong, K., Carpenter, C. and Hemler, M. (1997) A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Biol. Chem.* **272**:2595- 2598.
- Brewster J.L., de Valoir T., Dwyer N.D., Winter E., and Gustin M.C. (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science.* **259**: 1760-1763

- Cantrell, D. (1996) T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 259- 274.
- Carpenter, C., Auger, K., Duckworth, B., Hou, W., Schaffhausen, B. and Cantley, L. (1993) A tightly associated Serine/ Threonine protein kinase regulates phosphoinositide 3-kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* 13:1657- 1665.
- Carpenter, C.L., and Cantley, L.C. (1996) Phosphoinositide kinases. *Curr. Op. Cell. Biol.* 8: 153- 158.
- Cerny, J., Stockinger, H., and Horejsi, V. (1996) Noncovalent associations of T lymphocyte surface proteins. *Eur. J. Immunol.* 26: 2335- 2343.
- Chan, A.C., and Shaw, A.S. (1995) Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr. Op. Immunol.* 8: 394- 401.
- Chou, M. M., and Blenis, J. (1996) The 70 KDa S6 kinase complexes with and is activated by the Rho family G proteins Cdc42 and Rac1. *Cell.* 85: 573- 583.
- Coligan, J.E., Kruisbeck, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M., and Strober, W. (1994) Current protocols in immunology. John Wiley & Sons, Inc. Vol. 2. Unit 7.1.1.
- Crabtree, G.R. and Clipstone, N.A. (1994) Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 1045- 1083.
- Cyster JG, Shotton DM, and Williams AF (1991) The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *EMBO J* 4: 893- 902.
- del Peso, L., González-García, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G. (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science.* 278: 687- 689.
- del Pozo, M.A., Cabanas, C., Montoya, M.C., Ager, A., Sánchez- Mateos, P., and Sánchez- Madrid, F. (1997) ICAMs redistributed by chemokines to cellular uropods as a mechanism for recruitment of T lymphocytes. *J. Cell. Biol.* 137: 493- 508.
- Dennehy, K. M., Broszeit, R., Garnett, D., Durrheim, G. A., Spruyt, L. L., and Beyers, A. D. (1997) Thymocyte activation induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase and pp120 with CD5. *Eur. J. Immunol.* 27: 679- 686.
- Dhand, R., Hiles, I., Panayotou, G., Roche, S., Fry, M., Gout, I., Totty, N., Truong, O., Vicendo, P., Yonezawa, K., Kasuga, M., Courtneidge, S. and Waterfield, M. (1994) PI 3-Kinase is a dual specificity enzyme: Autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *Embo J.* 13: 522- 533.
- Dragone, L., Barth, R., Sitar, K., Disbrow, G. and Frelinger, J. (1995) Disregulation of leukosialin (CD43, Ly48, Sialophorin) expression in the B-cell lineage of transgenic mice increases splenic B-cell number and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 626- 630.

- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, and Healy JJ (1997) Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature*. **386**: 855-858.
- Domin, J., Pages, F., Volinia, S., Rittenhouse, S., Zvelebil, M., Stein, R. and Waterfield, M. (1997) Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. *Biochem. J.* **326**: 139- 147.
- Dove, S.K., Cooke, F.T., Douglas, M.R., Sayers, L.G., Parker, P.J., and Michell, R.H. (1997). Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature*. **390** :187-192.
- Egan, S. and Weinberg, R. (1993) The pathway to signal achievement. *Nature*. **365**:781-783.
- Ellies, L., Tao, W., Fellingner, W., Teh, H. and Ziltener, H. (1996) The CD43 130-kD peripheral T-cell activation antigen is downregulated in thymic positive selection. *Blood*. **88**: 1725- 1732.
- Escobedo, J., Navankasattusas, S., Kavanaugh, M., Milfay, D., Fried, V., and Williams, T. (1991) cDNA Cloning of a novel 85 kd protein that has SH2 domains and regulates binding of PI3-kinase to the PDGF β -receptor. *Cell*. **65**: 75- 82.
- Exley, M., Varticovski, L., Peter, M., Sancho, J., and Terhorst, C. (1994) Association of phosphatidylinositol 3-kinase with a specific sequence of the T cell receptor zeta chain is dependent on T cell activation. *J Biol Chem*. **269**: 15140- 15146.
- Franke, T. F., and Cantley, L. C. (1997) A Bad kinase makes good. *Nature*. **390**: 116-117.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R., and Cantley, L.C. (1997) PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. **88**:435- 437.
- Fukui, Y. and Hanafusa, H. (1989) Phosphatidylinositol kinase activity associates with viral p60^{src} protein. *Mol. Cell. Biol.* **9**:1651- 1658.
- Hahn, W.C., Rosenstein, Y., Calvo, V., Burakoff, S.J., and Bierer, B.E. (1992) A distinct cytoplasmic domain of CD2 regulates ligand avidity and T cell responsiveness to antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**: 7179- 7183.
- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R., Krishna, U., Falck, J., White, M. and Broek, D. (1998) Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science*. **279**:558- 560.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988) Antibodies. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 726 pp.
- Herman, P. and Emr, S. (1990) Characterization of VPS34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**:6742- 6754.

- Hiles, I., Otsu, M., Volinia, S., Fry, M., Gout, I., Dhand, R., Panayotou, G., Ruiz-Larrea, F., Thompson, A., Totty, N., Hsuan, J., Courtneidge, Parker, P. and Waterfield, M. (1992) Phosphatidylinositol 3-kinase: Structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell*. 70: 419- 429.
- Hinchliffe, K., and Irvine, R. (1997) Inositol lipid pathways turn turtle. *Nature*. 390: 123-124.
- Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E. Y., Lammers, R., Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1992) Interaction of phosphatidylinositol 3-kinase-associated p85 with epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors. *Mol. Cell. Biol.* 12: 981-990.
- Hu, P., Mondino, A., Skolnik, E. Y., and Schlessinger, J. (1993) Cloning of a novel, ubiquitously expressed human phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85. *Mol. Cell. Biol.* 13: 7677- 7688.
- Hughes, C. and Pober, J. (1996) Transcriptional regulation of the interleukin-2 gene in normal human peripheral blood T cells. Convergence of costimulatory signals and differences from transformed T cells. *J. Biol. Chem.* 271:5369- 5377.
- Kapeller, R., Prasad, K.V., Janssen, O., Hou, W., Schaffhausen, B.S., Rudd, C.E., and Cantley, L.C. (1994) Identification of two SH3-binding motifs in the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 269: 1927- 1933.
- Kauffmann-Zeh, A., Klinger, R., Endemann, G., Waterfield, M. D., Wetzker, R., and Hsuan, J. J. (1994) Regulation of human type II phosphatidylinositol kinase activity by epidermal growth factor-dependent phosphorylation and receptor association. *J. Biol. Chem.* 269: 31243- 31251.
- Keely, P., Westwick, J., Whitehead, I., Der, Ch. and Parise, L. (1997) Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature*. 390: 632- 636.
- Kolanus W, and Seed B (1997) Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3. *Curr Opin Cell Biol* 9:725-731.
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680- 685.
- Lange-Carter, C.A., Pleiman, C.M., Gardner, A.M., Blumer, K.J., and Johnson, G.L. (1993) A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* 260: 315- 319.
- Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F.X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson, G.L., and Karin, M. (1995) Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-MPK2. *Science*. 268: 286- 290.
- McFarland, T.A., Ardman, B., Manjunath, N., Fabry, J.A., and Lieberman, J. (1995) CD43 diminishes susceptibility to T lymphocyte-mediated cytolysis. *J. Immunol.* 154: 1097- 1104.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Manjunath, N., Johnson, R., Staunton, D., Pasqualini, R. and Ardman, B. (1993) Targeted disruption of CD43 gene enhances T lymphocyte adhesion. *J. Immunol.* **151**: 1528- 1534.
- Manjunath, N., Correa, M., Ardmann, M. and Ardman, B. (1995) Negative regulation of T- cell adhesion and activation by CD43. *Nature.* **377**: 535- 538.
- Mentzer SJ, Remold-O'Donnell E, Crimmins MA, Bierer BE, Rosen FS, and Burakoff SJ (1987) Sialophorin, a surface sialoglycoprotein defective in the Wiskott-Aldrich syndrome, is involved in human T lymphocyte proliferation. *J Exp Med* **165**: 1383-1392.
- Nimnual, A., Yatsula, B. and Bar-Sagi, D. (1998) Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science.* **279**: 560- 563.
- Ostberg, J., Dragone, L., Driskell, T., Moynihan, J., Phipps, R., Barth, R. and Frelinger, J. (1996) Disregulated expression of CD43 (Leukosialin, Sialophorin) in the B cell lineage leads to immunodeficiency. *J. Immunol.* **157**: 4876- 4884.
- Otsu, M., Hiles, I., Gout, I., Fry, M., Ruiz-Larrea, F., Panayotou, G., Thompson, A., Dhand, R., Hsuan, J., Totty, N., Smith, A., Morgan, S., Courtneidge, S., Parker, P. and Waterfield, M. (1991) Characterization of two 85 Kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60^{c-src} complexes, and PI3-Kinase. *Cell.* **65**: 91- 104.
- Padilla, N., Werner-Eckert, R., Mackow, E., Gorziglia, M., Larralde, G., Taniguchi, K. and Greenberg, H. (1993) Serologic analysis of human rotavirus serotypes P1A and P2 using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **31**:622
- Pages, F., Ragueneau, M., Klasen, S., Battifora, M., Couez, D., Sweet, R., Trunch, A., Ward, S.G., and Olive, D. (1996) Two distinct intracytoplasmic regions of the T-cell adhesion molecule CD28 participate in phosphatidylinositol 3-kinase association. *J Biol Chem.* **271**: 9403-9409.
- Pallant, A. , Eskenazi, A., Mattei, M., Fournier, R., Carlsson, S., Fukuda, M. and Frelinger, J. (1989) Characterization of cDNAs encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome gene 16. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **86**, 1328-1332.
- Park, J.K., Rosenstein, Y., Remold-O'Donnell, E., Bierer, B.E., Rosen, F.S., and Burakoff, S.J. (1991) Enhancement of T- cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott-Aldrich Syndrome. *Nature.* **350**: 706- 709.
- Pawson, T. (1995) Protein modules and signaling networks. *Nature.* **373**: 573- 580.
- Payraastre, B., van Bergen en Henegouwen, P. M. P., Breton, M., den Hartigh, J. C., Plantavid, M., Verkleij, A. J., and Boonstra, J. (1991) Phosphoinositide kinase, diacylglycerol kinase, and phospholipase C activities associated to the cytoskeleton: effect of epidermal growth factor. *J. Cell. Biol.* **115**: 121- 128.
- Pedraza-Alva, G., Merida, L.B., Burakoff, S.J., and Rosenstein, Y. (1996) CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase. *J. Biol. Chem.* **271**: 27564- 27568.

- Pedraza-Alva, G., Merida, L.B., Burakoff, S.J., and Rosenstein, Y. (1998) T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation. *J. Biol. Chem.* **273**:14218-14224.
- Pérez, L., Paasinen, A., Schnierle, B., Kach, S., Senften, M., and Ballmer-Hofer, K. (1993) Mitosis-specific phosphorylation of polyomavirus middle-sized tumor antigen and its role during cell transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 8113- 8117.
- Perillo, N.L., Pace, K.E., Seilhamer, J.J., and Baum, L. G. (1995) Apoptosis of T cell mediated by galectin-1. *Nature.* **378**: 736-739.
- Piller, V., Piller, F. and Fukuda, M. (1989) Phosphorylation of the major leucocyte surface sialoglycoprotein, Leucosialin, is increased by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J. Biol. Chem.*, **264**, 18824-18831.
- Prasad, K.V.S., Kapeller, R., Janssen, O., Repke, H., Duke-Cohan, J.S., Cantley, L.C., and Rudd, C.E. (1993) Phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and PI4-kinase binding to the CD4-p56^{lck} complex: the p56^{lck} SH3 domain binds to PI 3-kinase but not PI 4-kinase. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7708- 7717.
- Raab, M., da Silva, A. J., Findell, P.R., and Rudd, C.E. (1997) Regulation of Vav-SLP-76 binding by ZAP-70 and its relevance to TCR ζ /CD3 induction of interleukin-2. *Immunity.* **6**: 155- 164.
- Rameh, L.E., Chen, C., and Cantley, L.C. (1995) Phosphatidylinositol (3,4,5)P₃ interacts with SH2 domains and modulates PI 3-kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell.* **83**: 821-830.
- Ravichandran, K.S., Lee, K.K., Songyang, Z., Cantley, L.C., Burn, P., and Burakoff, S.J. (1993) Interaction of Shc with the zeta chain of the T cell receptor upon T cell activation. *Science.* **262**: 902- 905.
- Reinhold, S.L., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., and McIntyre, T.M. (1990) Activation of human neutrophil phospholipase D by three separable mechanisms. *FASEB J.* **4**: 208- 214.
- Remillard, B., Petrillo, R., Maslinski, W., Tsudo, M., Strom, T. B., Cantley, L., and Varticovski, L. (1991) Interleukin-2 receptor regulates activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **266**: 14167- 14170.
- Remold-O'Donnell, E., Davis, A.E., Kenney, D., Bhaskar, K.R., and Rosen, F.S. (1986) Purification and chemical composition of gpl, 115, the human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiscott- Aldrich syndrome. *J. Biol. Chem.* **261**: 7526- 7530.
- Remold-O'Donnell, E., Zimmerman, C., Kenney, D. and Rosen, F. (1987) Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in Wiscott- Aldrich syndrome. *Blood.* **70**: 104- 109.
- Remold-O'Donnell, E. and Parent, D. (1994) Two proteolytic pathways for down-regulation of the barrier molecule CD43 of human neutrophils. *J. Immunol.* **152**: 3595- 3605.

- Remold-O'Donnell, E. and Parent, D. (1995) Specific sensitivity of CD43 to neutrophil elastase. *Blood*. **86**: 2395- 2402.
- Rodriguez- Viciana, P., Warne, P. H., Khwaja, A., Marte, B. M., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M. D., Ridley, A., and Downward, J. (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell*. **89**: 457- 467.
- Rosenstein, Y., Park, J.K., Hahn, W.C., Rosen F.S., Bierer, B.E., and Burakoff, S.J. (1991). CD43, a molecular defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature*. **354**: 233- 235.
- Rosenstein, Y., Park, J. K., Bierer, B. E., and Burakoff, S. J. (1993) Chapter 12. The Wiskott- Aldrich Syndrome: An immunodeficiency associated with defects of the CD43 molecule. Gupta, S. and Griscelli, C. Eds. John Wiley and Sons Ltd. p249.
- Ruderman, N. B., Kapeller, R., White, M. F., and Cantley, L. C. (1990) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**: 1411- 1415.
- Sanchez-Mateos, P., Campanero, M., del Pozo, M. and Sanchez-Madrid, F. (1995) Regulatory role of CD43 leukosialin on integrin- mediated T- cell adhesion to endothelial and extracellular matrix ligands and its polar redistribution to a cellular uropod. *Blood*. **86**: 2228- 2239.
- Santana, M. A.; Pedraza-Alva, G.; Madrid-Marina, V.; Horejsi, V.; Burakoff, S.; and Rosenstein, Y. (1998) CD43 mediated activation of T cells induces IL-2 mRNA and transcription factors AP-1, NF-AT and NF κ B binding to DNA by a Ca²⁺ and PKC dependent mechanism. *Sometido*.
- Serrador, J., Nieto, M., Alonso-Lebrero, J., del Pozo, M., Calvo, J., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Lozano, F., González-Amaro, R., Sánchez-Mateos, P. and 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*. **12**: 4632- 4644.
- Seveau, S.; Lopez, S.; Lesavre, P.; Guichard, J.; Cramer, E.; and Halbwachs-Mecarelli, L.(1997) Leukosialin (CD43 sialophorin) redistribution in uropods of polarized neutrophils is induced by CD43 cross- linking by antibodies, by colchicine or by chemotactic peptides. *J. Cell Sci*. **110**: 1465-1475.
- Shaw, L., Rabinovitz, I., Wang, H., Toker, A. and Mercurio, A. (1997) Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the α 6 β 4 integrin promotes carcinoma invasion. *Cell*. **91**: 949- 960.
- Shelley, C. S., Remold-O'Donnell, E., Davis, A. E., Bruns, G. A., Rosen, F. S., Carroll, M. C., and Whitehead, A. S. (1989) Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **86**: 2819-2823.

- Shimizu, Y., Mobley, J., Finkelstein, L. and Chan, A. (1995) A role for phosphatidylinositol 3-kinase in the regulation of $\beta 1$ integrin activity by the CD2 antigen. *J. Cell. Biol.* **131**: 1867- 1880.
- Silverman, L.; Wong, R.; Remold-O'Donnell, E.; Vercelli, D.; Sancho, J.; Terhoshorst, C.; Rosen F.; Geha, R.; and Chatila, T. (1989) Mechanism of mononuclear cell activation by an anti-CD43 (Sialophorin) agonistic antibody. *J. of Immunol.* **142**: 4194-4200.
- Singh, S.S., Chauhan, A., Murakami, N., and Chauhan, V.,P.S. (1996) Profilin and gelsolin stimulate phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Biochemistry.* **35**: 16544-16549.
- Skolnik, E., Margolis, B., Mohammadi, M., Lowenstein, E., Fischer, R., Drepps, A., Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1991) Cloning of PI3 kinase- associated p85 utilizing a novel method for expression / cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases. *Cell.* **65**: 83- 90.
- Springer, T.A., Dustin, M.L., Kishimoto, T.K., Marlin, S.D. (1987) The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Annu Rev Immunol.* **5**: 223- 252.
- Stack, J.H., and Emr, S.D. (1994) Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI3-kinase activities. *J. Biol. Chem.* **269**: 31552- 31562.
- Stefanova, I., Hilgert, P., Angelisova, H., Kristofova, H. and Horejsi, V. (1988) Characterization of a 95 kDa human leucocyte sialoglycoprotein: its identity with CD43, gpL115, leukosialin and sialophorin. *Folia Biol. (Praga)* **34**: 255- 265.
- Stockl, J., Majdic, O., Kohl, P., Pickl, W.F., Menzel, J.E., and Knapp, W. (1996) Leukosialin (CD43)-Major Histocompatibility Class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation. *J. Exp. Med.* **184**: 1769- 1779.
- Su, B. and Karin, M. (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Immunol.* **8**: 402- 411.
- Susa, M., Keeler, M. and Varticovski, L. (1992) Platelet-derived growth factor activates membrane associated phosphatidylinositol 3-kinase and mediates its translocation from the cytosol. *J. Biol. Chem.* **267**: 22951- 22956.
- Toker, A., and Cantley, L.C. (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature.* **387**: 673- 676.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from poly-acrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4350
- Truitt, K., Hicks, Ch. and Imboden, J. (1994) Stimulation of CD28 triggers an association between CD28 and phosphatidylinositol 3-kinase in Jurkat T cells. *J. Exp. Med.* **179**: 1071- 1076.

- van Weering, D. H., de Rooij, J., Marte, B., Downward, J., Bos, J. L., and Burgering, B. M. T. (1998) Protein kinase B activation and lamellipodium formation are independent phosphoinositide 3-kinase-mediated events differentially regulated by endogenous Ras. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 1802- 1811.
- Varticovski, L., Druker, B., Morrison, D., Cantley, L., and Roberts, T. (1989) The colony stimulating factor-1 receptor associates with and activates phosphatidylinositol-3 kinase. *Nature.* **342**: 699- 702.
- Varticovski, L., Harrison-Findik, D., Keeler, M.L., and Susa, M. (1994) Role of PI3-kinase in mitogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1226**: 1- 11.
- Volinia, S., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., MacDougall, L.K., Stein, R., Zvelebil, M.J., Domin, J., Panaretou, C., and Waterfield, M.D. (1995) A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J.* **14**: 3339- 3348.
- von Willebrand, M., Baier, G., Couture, C., Burn, P., and Mustelin, T. (1994) Activation of phosphatidylinositol-3-kinase in Jurkat T cells depends on the presence of the p56^{lck} tyrosine kinase. *Eur. J. Immunol.* **24**: 234- 238.
- Wange, R.L. and Samelson, L.E. (1996) Complex complexes: Signaling at the TcR. *Immunity.* **5**: 197- 205.
- Ward, S.G., June, C.H., and Olive, D. (1996) PI3-kinase: a pivotal pathway in T cell activation? *Immunol. Today.* **17**: 187- 197.
- Weiss, A., Koretzky, G., and Schatzman, R. (1991) Functional activation of the T cell antigen receptor induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C γ 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 5484-5488.
- Whitman, M., Kaplan, D. R., Schaffhausen, B., Cantley, L., and Roberts, T. (1985) Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature.* **315**: 239- 242.
- Whitman, M., Kaplan, D., Roberts, T., and Cantley, L. (1987) Evidence for two distinct phosphatidylinositol kinases in fibroblasts implications for cellular regulation. *Biochem J.* **247** :165-174.
- Whitman, M., Downes, P., Keeler, M., Keller, T. and Cantley, L. (1988) Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3 phosphate. *Nature.* **332**: 644- 646.
- Wong, K., and Cantley, L.C. (1994) Cloning and characterization of a human phosphatidylinositol 4- kinase. *J. Biol. Chem.* **269**: 28878-28884.
- Wong, K., Meyers, R., and Cantley, L.C. (1997) Subcellular locations of phosphatidylinositol 4-kinase isoforms. *J. Biol. Chem.* **272**: 13236- 13241.
- Wong, R.C.K., Remold-O'Donnell, E., Vercelli, D., Sancho, J., Terhorst, C., Rosen, F., Geha, R., and Chatila, T. (1990) Signal transduction via leukocyte antigen CD43 (Sialophorin). feedback regulation by protein kinase C. *J. Immunol.* **144**: 1455- 1460.

- Yamada, K. and Geiger, B. (1997) Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol.* 9: 76-85.
- Yano, H., Nakanishi, S., Kimura, K., Hanai, N., Saitoh, Y., Fukui, Y., Nonomura, Y. and Matsuda, Y. (1993) Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* 268: 25846- 25856.
- Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S. and 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: 885- 895.
- Zenner, G., zur Hausen, J.D., Burn, P. and Mustelin, T. (1995) Towards unraveling the complexity of T cell signal transduction. *BioEssays.* 17: 967- 975.
- Zheng, C. and Guan, K. (1993) Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J. Biol. Chem.* 268: 11435- 11439.