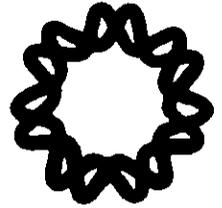
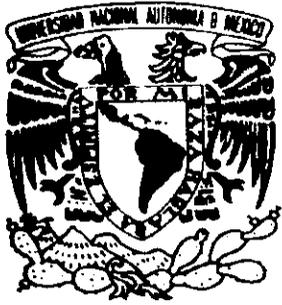


00562



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



**PAPEL DE CD43 EN LA REORGANIZACION DEL
CITOESQUELETO DE ACTINA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
PRESENTA:**

SELENE GUADALUPE NUÑEZ CRUZ

Cuernavaca, Morelos 2000.



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.

RESUMEN

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

Selene Gpe. Núñez Cruz

PAPEL DE CD43 EN LA REORGANIZACION DEL CITOESQUELETO DE ACTINA

No. de Cuenta 9885206-4, No. Expediente 66981006.

El co-receptor CD43 es una mucina linfocitaria que al unirse con su(s) ligando(s) genera señales intracelulares que, junto con otras moléculas co-receptoras, definen la respuesta de un linfocito ante distintas situaciones durante los procesos de maduración, diferenciación y reconocimiento.

Los experimentos realizados a lo largo de este trabajo se enfocaron en el estudio de la participación de CD43 en la remodelación del citoesqueleto de actina. Demostramos que la expresión ectópica del cDNA de CD43 humano en una línea de fibroblastos murinos induce profundos cambios morfológicos y que estos dependen de la presencia de una secuencia rica en prolinas localizada en el carboxilo terminal de la región intracitoplásmica de CD43. Así mismo, encontramos que la expresión de CD43 en estas células es suficiente para inducir la fosforilación en tirosinas de la cinasa de adhesiones focales (FAK) de manera constitutiva.

Para simular las señales que se generan como consecuencia de la interacción de CD43 con alguno de sus ligandos, estimulamos linfocitos T, aislados de sangre periférica de donadores sanos, con un anticuerpo anti-CD43 inmovilizado sobre una superficie de plástico. Después de 30 min de activación, las señales CD43 específicas inducen cambios notorios en la morfología celular. Un porcentaje importante de las células presentan urópodos, estructuras alargadas de citoesqueleto de actina que se encuentran en el extremo apical de la célula linfoide y funcionan durante los fenómenos de polarización celular y extravasación. Observamos que paralelamente a la formación de urópodos había una relocalización de CD43 hacia el urópodo. Durante este fenómeno, claramente dependiente de la reorganización de actina, reclutamos a dos cinasas que participan en la remodelación del citoesqueleto: FAK y PYK-2, siendo la máxima fosforilación de ambas 30 min, tiempo que coincide con la máxima formación de urópodos. Además de estas dos cinasas, la polarización celular dependiente de CD43 requiere necesariamente de la participación de la cinasa Lck, la cual pertenece a la familia Src.

En conjunto, los resultados obtenidos muestran que la molécula CD43 participa de manera importante en las señales intracelulares que conducen a la remodelación del citoesqueleto de actina, y a la formación de estructuras que dan lugar a movimiento celular.



Vo. Bo. Dra. Yvonne Rosenstein

Este trabajo se realizó en el INSTITUTO de BIOTECNOLOGIA de la UNAM en Cuernavaca, Mor. bajo la asesoría de la Dra. Yvonne Rosenstein A. y del Dr. Gustavo Pedraza-Alva.

El proyecto fue auspiciado por el donativo de CONACYT 25307-M y por el donativo IN217498 de DGAPA, mi estancia de maestría fue auspiciada por una beca de Maestría otorgada por CONACYT (No. de registro 121811).

La primera parte de este proyecto se presentó en el XXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica que se realizó en Mérida, Yuc. en Noviembre de 1998.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia

Por su cariño y porque siempre estuvieron conmigo.

Al Grupo de trabajo donde realicé mi maestría:

Mi asesora: **Dra. Yvonne Rosenstein**
y al **Dr. Gustavo Pedraza-Alva**
Por ayudarme en mi formación académica.

A **Lily, Marito, Norma, Esther, Roxana, Angélica y Homero** Por su compañerismo y amistad

A **Xochitl Alvarado** por su asesoría y gran ayuda en el trabajo de microscopia confocal.

A mi comité tutorial:

Dra. Leonor Pérez
Dr. Federico Sánchez
Dra. Yvonne R.

A mis sinodales:

Dra. Carmen Quinto
Dr. Fernando Esquivel
Dr. Marco Villanueva
Dr. Victor Bustamante

y muy especialmente a la **Dra. Yvonne Rosenstein** por todo el apoyo que me brindó.

Al INSTITUTO de BIOTECNOLOGIA

Por el apoyo a congresos y cursos de investigación.

A MIS AMIGOS

A Araceli Cantero

Gracias por todos los momentos de alegría.

A Marito

Po..po.. por el bu...bu... buen chisme entre cada blot.

A Chava-cano y Serge S.

Chepas: gracias por todo su ¡¡amorsh..!!!!

A Lily

Por ser siempre *la más rápida del rancho* en todos los chismes

Al Fefin

Por soportar mis transferencias en *coomassie*, mis bromas y por ser tan buena onda

A Fabian

Por cada momento "*super Mochan*", aunque a veces a distancia.

A Pepeluche

Por ser un ¡¡ "chamaco" tan "canijo" !!

A Olga, Anita y Terita, que aunque casi no las veo, siempre estan conmigo.

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
INTRODUCCION	4
EL CITOESQUELETO DE ACTINA	4
LAS CINASAS DE LA FAMILIA FAK	5
1) ESTRUCTURA DE LA PROTEINA	6
2) EXPRESION DE FAK	6
3) INTERACCION DE FAK CON OTRAS PROTEINAS	7
4) FUNCIONES DE FAK	9
LA CINASA PYK2	10
1) ESTRUCTURA DE LA PROTEINA	10
2) EXPRESION DE PYK-2	10
3) INTERACCION DE PYK-2 CON OTRAS PROTEINAS	10
4) FUNCIONES DE PYK-2	11
EL CO-RECEPTOR CD43	12
1) LA ESTRUCTURA DE CD43	13
2) EXPRESION E ISOFORMAS DE CD43	13
3) LIGANDOS	14
4) LA SEÑALIZACION A TRAVES DE CD43	16
OBJETIVOS E HIPOTESIS	19
MATERIALES Y METODOS	20
1) TRANSFECCION	20
2) AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFERICA	21
3) ACTIVACION DE LINFOCITOS T	22
4) BIOQUIMICA DE PROTEINAS	23
5) INMUNOCITOQUIMICA	25
RESULTADOS	27
1) EXPRESION ECTOPICA DE CD43 EN FIBROBLASTOS	27
a) ANALISIS DE LA MORFOLOGIA CELULAR	27
b) ORGANIZACION DEL CITOESQUELETO	28
2) PARTICIPACION DE LAS CINASAS FAK Y PYK-2	30
a) LA EXPRESION DE CD43 EN FIBROBLASTOS (FAK)	30
b) FOSFORILACION DE FAK Y PYK-2 EN LINFOCITOS T	31

3) PARTICIPACION DE CD43 EN LOS CAMBIOS DE MORFOLOGIA DE LINFOCITOS T DE HUMANO	33
a) LAS SEÑALES DE CD43 EN LA POLARIZACION CELULAR	33
b) LA PRESENCIA DE LCK ES NECESARIA PARA LA FORMACION DE UROPODOS	36
DISCUSION	38
CONCLUSIONES	47
PERSPECTIVAS	48
BIBLIOGRAFIA	49
APENDICES	60

LISTA DE ABREVIATURAS

aas	aminoácidos
Ac	anticuerpo.
APC	células presentadoras de antígeno
BCS	suero de bovino recién nacido.
β GP	β -glicerol fosfato.
β ME	β -mercaptoetanol.
BSA	albúmina sérica de bovino.
DAG	diacilglicerol.
DMEM	medio de cultivo Dulbelco modificado
DTT	ditiotreitól.
EDTA	ácido etilendiaminotetracético.
EGF	factor de desarrollo epidérmico.
EGFR	receptor para el factor de desarrollo epidérmico.
FGF	factor de desarrollo de fibroblastos.
FCS	suero fetal bovino
GalNAc	N-acetil galactosamina
GAP	factor activador de proteínas
GDP	difosfato de guanosina.
GEF	factor de intercambio de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina.
G418	neomicina
HSA	albúmina sérica humana.
ITAM	motivos de activación basados en tirosinas.
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular-1
IL-2	interleucina-2
IPP	inmunoprecipitado
JNK	cinasa del extremo N-terminal de Jun
KDa	kilodalton
LcT	linfocito T
mAb	anticuerpo monoclonal
MAPK	proteína cinasa activada por mitógeno.
MAPKK	cinasa de la proteína cinasa activada por mitógenos
MEK1/2	cinasa de MAPK- ERK 1/2
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad

NFAT	factor de transcripción de células T activadas
PMA	phorbol 12-miristato-13-acetato.
PMSF	fenil metil sulfonil fluoruro.
PTK	proteína cinasa de tirosina.
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PH	dominio con homología a pleckstrina
PI	fosfatidilinositol
PIK	cinasa de fosfatidilinositol
PI3K	fosfatidilinositol 3-cinasa
PKA	proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa C
PLC γ 1	fosfolipasa C γ 1
Prot A-S4B	sefrosa 4B-proteína A
PTB	dominio de unión a fosfotirosina
PY	fosfotirosina
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
Ser	serina
Src	cinasa descubierta de virus de sarcoma
SH2	dominio tipo 2 con homología a Src
SH3	dominio tipo 3 con homología a Src
TA	temperatura ambiente
TNF	factor de necrosis tumoral
TPA	12-O-tetradecanoylforbol-13-acetato
TcR	receptor para el antígeno de células T
Thr	treonina
Tyr	tirosina
IAV	virus de la influenza tipo A

RESUMEN

Selene Gpe. Núñez Cruz

PAPEL DE CD43 EN LA REORGANIZACION DEL CITOESQUELETO DE ACTINA

El co-receptor CD43 es una mucina linfocitaria que al unirse con su(s) ligando(s) genera señales intracelulares que, junto con otras moléculas co-receptoras, definen la respuesta de un linfocito ante distintas situaciones durante los procesos de maduración, diferenciación y reconocimiento.

Los experimentos realizados a lo largo de este trabajo se enfocaron en el estudio de la participación de CD43 en la remodelación del citoesqueleto de actina. Demostramos que la expresión ectópica del cDNA de CD43 humano en una línea de fibroblastos murinos induce profundos cambios morfológicos y que estos dependen de la presencia de una secuencia rica en prolinas localizada en el carboxilo terminal de la región intracitoplásmica de CD43. Así mismo, encontramos que la expresión de CD43 en estas células es suficiente para inducir la fosforilación en tirosinas de la cinasa de adhesiones focales (FAK) de manera constitutiva.

Para simular las señales que se generan como consecuencia de la interacción de CD43 con alguno de sus ligandos, estimulamos linfocitos T, aislados de sangre periférica de donadores sanos, con un anticuerpo anti-CD43 inmovilizado sobre una superficie de plástico. Después de 30 min de activación, las señales CD43 específicas inducen cambios notorios en la morfología celular. Un porcentaje importante de las células presentan urópodos, estructuras alargadas de citoesqueleto de actina que se encuentran en el extremo apical de la célula linfoide y funcionan durante los fenómenos de polarización celular y extravasación. Observamos que paralelamente a la formación de urópodos había una relocalización de CD43 hacia el urópodo. Durante este fenómeno, claramente dependiente de la reorganización de actina, reclutamos a dos cinasas que participan en la remodelación del citoesqueleto: FAK y PYK-2, siendo la máxima fosforilación de ambas 30 min, tiempo que coincide con la máxima formación de urópodos. Además de estas dos cinasas, la polarización celular dependiente de CD43 requiere necesariamente de la participación de la cinasa Lck, la cual pertenece a la familia Src.

En conjunto, los resultados obtenidos muestran que la molécula CD43 participa de manera importante en las señales intracelulares que conducen a la remodelación del citoesqueleto de actina, y a la formación de estructuras que dan lugar a movimiento celular.

INTRODUCCION

EL CITOESQUELETO DE ACTINA

Las células linfocitarias forman parte de sistemas complejos que han adquirido funciones especializadas como reconocimiento específico, transporte intracelular y movimiento celular. Muchas de las funciones linfocitarias requieren de un "armazón celular" ó *citoesqueleto*. Esta malla intracelular funciona como un soporte estructural que le da forma a la célula e interviene en la distribución adecuada de los componentes celulares en el citoplasma. En este trabajo nos enfocamos en estudiar la participación de los filamentos de actina en la activación de linfocitos T mediada a través del co-receptor CD43.

El citoesqueleto está constituido por tres tipos diferentes de fibras: filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos. Los filamentos de actina son estructuras que juegan un papel muy importante en funciones generales de la célula como transporte intracitoplásmico, motilidad y migración celulares (Carlier, 1991; Kabsch and Vanderkerckhove, 1992). Los filamentos intermedios forman estructuras a manera de rodillos que proveen a las células de fuerza mecánica (Steinert and Roop, 1988; Cary and Klymkowsky, 1992). Los microtúbulos son los organizadores primarios de la célula, juegan un papel muy importante durante la división celular y en la distribución de organelos celulares (Kreis et al., 1990; Gelfand and Berhadsky, 1991).

La actina es el componente principal de los filamentos de actina; junto con distintas proteínas de unión a actina, participa en la inducción de los rearrreglos del citoesqueleto y, dependiendo de las proteínas que se unan a ella, se generan diferentes estructuras celulares con funciones bien definidas. Las fibras de estos microfilamentos se forman a partir de la polimerización de subunidades de actina, dando como resultado cambios en la forma de la célula. Para estos eventos, las proteínas de citoesqueleto requieren de proteínas motoras, como miosina, en el caso de actina, cuya energía de movimiento se obtiene de la hidrólisis de ATP y liberación de ADP y fosfato (Korn et al., 1987). La actina juega un papel importante en diferentes tipos de movimientos celulares, en migración celular y en transporte citosólico.

Las células mantienen una polaridad durante el movimiento, formándose un frente (*leading edge*) y una parte posterior, la cual se caracteriza por formar estructuras de tipo *urópodo* (prolongación apical que resulta de reacomodos de las fibras de actina, y cuya función es iniciar el contacto con otras células para promover el movimiento celular). En el caso de movimiento rápido como quimiotaxis, algunas células como la ameba ó los linfocitos generan estructuras a manera de protuberancias en el frente de la célula que permiten que la célula realice movimientos hacia adelante. Este tipo de estructuras son conocidas como *pseudópodos* ya que son estructuras semejantes a un dedo (del griego *podium*). Otros tipos de estructuras son características de células de movimiento lento como es el caso de los fibroblastos. Cuando una célula fibroblástica comienza a moverse, el cuerpo celular se extiende generando "*lamelopodios*" ó delgadas láminas que se desarrollan hacia las orillas de la célula. Los fibroblastos también forman proyecciones celulares alargadas llamadas "*filopodios*". Una vez alcanzado el sustrato, la membrana celular establece contacto con él y se forman las llamadas "*placas de adhesión*". La porción celular no unida al sustrato, que generalmente corresponde a la parte posterior de la célula, se encuentra despegada formando ondulaciones ó *ruffles* que generan un movimiento ondulatorio de atrás hacia delante de la célula (Alberts et al., 1994).

LAS CINASAS DE LA FAMILIA FAK.

Muchas de las modificaciones de la morfología celular se establecen en función del contacto de receptores membranales con sus ligandos, mismos que inician vías específicas de transducción en las que participan cinasas, fosfatasa, proteínas adaptadoras y proteínas de unión a citoesqueleto.

Numerosas proteínas participan en la inducción de remodelaciones del citoesqueleto de actina. Una de ellas es la tirosina cinasa FAK. La cinasa de adhesiones focales FAK es una proteína que ha sido implicada en diferentes respuestas celulares, como migración supervivencia y proliferación, las cuales son mediadas por distintos receptores de la superficie celular, como las integrinas. Nuestro interés en el estudio de FAK se debe a resultados previos de nuestro laboratorio en los que se observamos importantes cambios morfológicos en linfocitos T en respuesta a las señales generadas a través del co-receptor CD43.

Así mismo, basándonos en reportes recientes (Sánchez-Madrid and del Pozo, 1999), en los que se encontró que la cinasa PYK-2 (proline-rich tyrosine kinase 2) se localiza junto con FAK en el frente celular en respuesta a las señales generadas por integrinas linfocitarias, evaluamos la participación de PYK-2 en respuesta a las señales dependientes de CD43.

1) ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA FAK

La cinasa FAK es una proteína de 125 KDa, contiene un dominio central que es el sitio catalítico de la enzima; dos secuencias ricas en prolina (PR1 y PR2) y hacia el carboxilo terminal de la molécula, se encuentra el dominio de unión a adhesiones focales (focal adhesion targetting: FAT), importante para la interacción de FAK con proteínas de unión a citoesqueleto.

FAK contiene seis residuos de tirosinas fosforilables, dos de ellos en su dominio de cinasa (Tyr 576 y 577), otros dos en el amino terminal de la proteína (Tyr 397 y 407), que al estar fosforilados se unen al dominio SH2 de proteínas de la familia de Src; los dos últimos residuos se encuentran hacia el carboxilo terminal de la proteína (Tyr 861 y 925, Hanks and Polte, 1997; Fig.1).

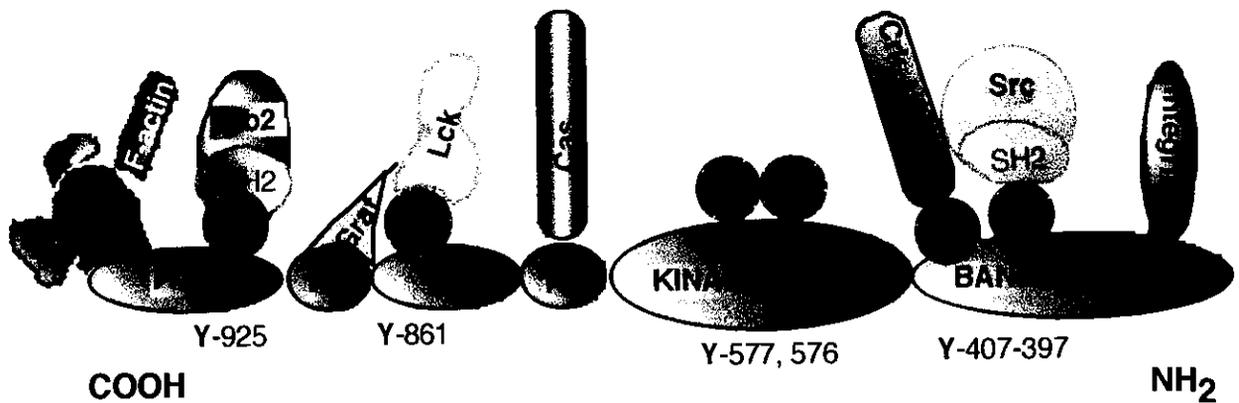


FIG . 1 LOS DOMINIOS DE LA CINASA FAK

Al fosforilarse en tirosinas, FAK interacciona con diferentes proteínas que también participan en la vía de señalización de CD43: la cinasa Lck, la subunidad p85 de PI3K y la proteína adaptadora Grb2, entre otras.

2) EXPRESION DE FAK

La cinasa FAK se expresa en una gran variedad de tejidos, lo que indica su importancia en las funciones primordiales del organismo. Por ejemplo, durante la etapa embrionaria (ver funciones FAK), FAK se expresa en distintas áreas del cerebro: en el cortex cerebral, el hipocampo, el striatum, el cerebelo, el tálamo, el hipotálamo y el bulbo olfatorio; así mismo se

observa su expresión en el hígado, testículos, corazón, riñón, músculo y pulmones (Burgaya et al., 1997). Fak también se encuentra en células eritroides, en plaquetas, en células endoteliales, en linfocitos B, en linfocitos T y en células NK (Schaller et al., 1994; Gismondi et al., 1997).

3) INTERACCION DE FAK CON OTRAS PROTEINAS

Muchas de las interacciones entre proteínas intracelulares se regulan a través del reconocimiento de dominios específicos encontrados en ellas. FAK es una proteína cinasa que puede unirse con muchas proteínas a pesar de no contener dominios SH2 ó SH3.

a) UNION A PROTEINAS CON DOMINIOS SH2

Los dominios tipo 2 con homología a proteínas Src (SH2) establecen contactos con proteínas que tienen secuencias específicas que contienen residuos fosforilados en tirosinas (pTyr-Glu-Glu-Ile, Songyang et al, 1993). La capacidad de señalización de las cinasas de tirosinas es regulada por su propia fosforilación, FAK no es la excepción. Como se mencionó anteriormente, FAK es una proteína cinasa que tiene seis sitios fosforilables en tirosinas. El residuo Tyr-397 es el sitio principal de autofosforilación de la cinasa FAK (Hanks and Polte, 1997); al estar fosforilado, este residuo media la interacción directa de FAK con el dominio SH2 de Src (Schaller et al., 1994). Este sitio también es indispensable para la interacción de FAK con el dominio SH2 de la cinasa Fyn (Polte and Hanks, 1995). En células transformadas con Src, se demostró que la fosforilación de los otros cinco residuos de tirosinas de FAK es también mediada por las cinasas de la familia Src. La fosforilación de los residuos Tyr-576/Tyr-577 induce cambios conformacionales que permiten la exposición del dominio catalítico de FAK y su unión con proteínas sustrato y fosforilación de las mismas (Calalb et al., 1995). La fosforilación del residuo Tyr-925 permite la interacción de FAK con el dominio SH2 de la proteína adaptadora Grb-2, que a su vez, por medio de su dominio SH3 se une al intercambiador de guanina Sos, el cual activa a la GTPasa Ras. De esta forma se induce la activación de la cascada de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK's cinasas; Schlaepfer et al., 1994; Calalb et al., 1995). Al fosforilarse el residuo Tyr-407 de FAK, adquiere la capacidad de unirse a proteínas como la cinasa c-Abl, y las adaptadoras c-Crk y Nck (Cantley and Songyang, 1994).

El residuo Tyr-861 de FAK puede ser otro sustrato para proteínas de la familia Src, ya que cuando este se encuentra fosforilado, semeja el sitio aceptor (pTyr-Gln-Pro-Gly) para los dominios SH2 de las cinasas de la familia Src Fyn y Lck (Cantley and Songyang, 1994; Berg and Ostergaard, 1997, Fig. 1).

b) UNION A PROTEINAS CON DOMINIOS SH3

Las secuencias PR1 y PR2 localizadas hacia el carboxilo terminal de FAK median las interacciones entre FAK y proteínas intracelulares que contienen dominios SH3. Los dominios SH3 son módulos de unión a secuencias ricas en prolinas como las encontradas en las secuencias PR1 y PR2 de FAK (Yu et al., 1994). En experimentos de co-inmunoprecipitación se demostró que el dominio SH3 de Cas (Crk-associated substrate; p130^{Cas} recluta proteínas señalizadoras como v-Src y v-Crk) interacciona con las secuencias PR1 y PR2 de FAK (Nojima et al., 1995; Harte et al., 1996; Fig. 1). La proteína Graf, una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina ó GEF, cuyo nombre deriva de su función como activadora de las guanosinas trifosfatasas ó GTPasas pequeñas de la familia Rho: RhoA y Cdc42 (proteínas de bajo peso molecular que tienen la capacidad de unirse e hidrolizar GTP), se asocia por medio de su dominio SH3 a la secuencia PR2 de FAK (Hildebrand et al., 1996).

La participación de las pequeñas GTPasas permite la regulación de una serie de eventos intracelulares entre los cuales, destaca la polimerización de actina (Hall, 1998). Rho es una proteína que al activarse induce una vía de señalización que conduce al ensamble de filamentos de actina ó fibras de estrés y la formación de complejos asociados a adhesiones focales (Ridley and Hall, 1992; Hall, 1998). La estimulación celular a través de la GTPasa pequeña Rho induce la fosforilación de FAK y la participación del citoesqueleto de actina. El tratamiento con citocalasina D, una droga que inhibe la formación de filamentos de actina, bloquea la fosforilación de tirosinas de FAK, lo que confirma la participación del citoesqueleto de actina en las funciones de FAK mediadas por Rho (Schwartz et al., 1995, Rozengurt, 1995). La activación de Cdc42 induce la formación de filopodios ricos en actina polimerizada (Nobes and Hall, 1995; Kozma et al., 1995).

c) EL DOMINIO DE UNIÓN A ADHESIONES FOCALES Y SU INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS DE UNIÓN A CITOESQUELETO.

Paxilina es una proteína de unión a citoesqueleto que funciona como molécula adaptadora; se une al *dominio de unión a paxilina* de FAK, el cual se encuentra en el dominio FAT (aa 919-1042) de FAK. Al unirse paxilina a FAK, se induce la fosforilación en tirosinas de ésta última y la capacidad de asociarse al dominio SH2 de Src y Crk (Tachibana et al., 1995; Chen et al., 1995). El *dominio de unión a paxilina* de FAK contiene aminoácidos con cadenas hidrofóbicas que están involucrados en la formación de estructuras terciarias y de bolsas hidrofóbicas, aunque otros aminoácidos de FAK, como Glu 1039 y Arg 1042, son esenciales para establecer el contacto con paxilina (Wood et al., 1994; Turner and Miller, 1994). En fibroblastos, la estimulación con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet-derived growth factor, PDGF) induce la asociación de FAK con la cinasa de inositol tipo 3 (PI3K; Chen and Guan, 1994) con la proteína adaptadora Grb2 y la activación de la vía de Ras-MAPKs. La formación de este complejo macromolecular genera respuestas celulares de adhesión que incluyen cambios en el citoesqueleto de actina (Hanks and Polte, 1997).

4) FUNCIONES DE FAK

La interacción de integrinas con proteínas de la matriz extracelular (ECM), tales como fibronectina, induce la activación de la cinasa FAK y media efectos celulares como migración, sobrevivencia y proliferación dependientes de anclaje y de cambios en la expresión de genes (Parsons, 1996; Yamada and Geiger, 1997). Durante el desarrollo, FAK participa activamente en procesos morfogénicos como migración celular (Gilmore and Romer, 1996; Ilíc et al., 1996). Los ratones FAK^{-/-} no sobreviven más allá de la etapa embrionaria, debido a anomalías en la migración celular desde la gastrulación (Ilíc et al., 1995, 1996). FAK participa en la reparación de heridas cuando se sobreexpresa en keratinocitos migratorios (Gates et al., 1994). La sobreexpresión de FAK también se ha reportado en líneas celulares de melanomas y en tumores metastásicos de colon y mama (Owens et al., 1995). El hecho que FAK pueda ser estimulada por oncoproteínas como Src y que en células transformadas con Src se eleve la actividad y fosforilación de FAK sugiere su participación en la inducción de enfermedades malignas.

LA CINASA PYK-2

1) ESTRUCTURA DE LA PROTEINA PYK-2

PYK-2, también conocida como CAK β , RAFTK, es una cinasa con una organización estructural similar a FAK (FIG. 1). PYK-2 comparte con FAK 60% de identidad en el dominio central catalítico, 42% de identidad con el dominio amino terminal y 36% con el dominio carboxilo terminal, donde se encuentran las secuencias FAT, de unión a adhesiones focales (Li et al., 1996).

2) EXPRESION DE PYK-2

PYK-2 es la PTK (asociada al citoesqueleto) predominante en células del linaje linfocitario, se ha detectado su expresión en monocitos, linfocitos T, linfocitos B y células NK (Avraham et al., 1995; Li et al., 1996).

La cinasa PYK-2 se expresa también en células cerebrales y fibroblastos (Gismondi et al., 1997).

3) INTERACCION DE PYK-2 CON OTRAS PROTEÍNAS

a) INTERACCION CON PROTEINAS CON DOMINIOS SH2

PYK-2 conserva la secuencia que corresponde al sitio de autofosforilación de FAK (Tyr-Ala-Glu-Ile), la cual se identificó como un sitio de unión de alta afinidad con el SH2 de Csk:Tyr 404 (Illíc et al., 1997), lo que sugiere que puede regular la activación de las proteínas de la familia de FAK, tal como sucede con las cinasas de la familia Src (Sabe et al., 1994).

b) INTERACCION CON PROTEINAS CON DOMINIOS SH3

Al igual que FAK, PYK-2 contiene secuencias ricas en prolinas hacia el carboxilo terminal de la molécula (residuos 699-720, 747-777 y 788-799), las cuales son sustrato para la interacción con los sitios SH3 de moléculas tales como p130^{Cas}, p105^{Cas-L} ó Graf (Polte and Hanks, 1995; Parsons, 1996; Illíc et al., 1997).

c) INTERACCION CON PROTEINAS DE UNION A CITOESQUELETO

PYK-2 interacciona con la proteína leucocitaria leupaxilina, la cual guarda identidad con paxilina. Leupaxilina, al igual que paxilina, contiene dominios LIM¹ y LD², que en paxilina son importantes para su localización y anclaje hacia las adhesiones focales (Brown et al., 1996), lo que sugiere que la unión de PYK-2 con leupaxilina sea un mecanismo regulatorio para su localización en los sitios de adhesión (Lipsky et al., 1998).

En células NK, PYK-2 se fosforila en tirosinas y se asocia constitutivamente con paxilina en respuesta a la estimulación a través de integrina $\beta 1$ (Li et al., 1996).

4) FUNCIONES DE PYK-2

PYK-2 está involucrada en la regulación de canales iónicos inducidos por calcio, en la activación de cinasas de tipo MAPKs (Lev et al., 1995), en la activación de la cinasa inducida por estrés JNK y, en células PC12, en la activación de la vía de proteínas cinasas MAPK mediada por Src (Hanks and Polte, 1997). Así mismo, PYK-2 se activa por un receptor acoplado a bradykinina y por ésteres de forbol, cuya vía de señalización involucra MAPK cinasas (Dikic et al., 1996).

En cuanto a la participación de PYK-2 en la polarización celular y cambios en citoesqueleto, se demostró que la activación de la integrina CD11/CD18 induce la activación y redistribución de PYK-2 y FAK hacia el centro de organización de microtúbulos (MTOC, Rodríguez-Fernández et al., 1999).

RECEPTORES LINFOCITARIOS Y LA REMODELACION DEL CITOESQUELETO.

Las células linfocitarias son las encargadas de iniciar una serie de eventos que dan lugar a la respuesta inmune. Para ello, es necesaria la participación de moléculas de superficie que regulan las señales intracelulares que, entre otras cosas, inducen modificaciones en la morfología celular de los linfocitos. Cambios morfológicos como deformación celular y aparición de proyecciones membranales están involucrados en la generación de respuestas celulares como adhesión, locomoción, fagocitosis, producción de interleucinas, etc (Keller et al., 1991). Un ejemplo claro del papel de proteínas membranales en la remodelación del citoesqueleto se observa en el fenómeno de migración hacia sitios de infección ó ganglios linfáticos, a través del cual las células linfocitarias que circulan por el torrente sanguíneo atraviesan las paredes endoteliales (extravasación) para llegar al sitio indicado.

¹ Los dominios LIM son secuencias de aprox. 50 residuos de aas, de los cuales destacan residuos de cisteína, histidina y aspartato que forman módulos de unión a zinc. Las proteínas paxilina, Hic-5, zyxina y la proteína rica en cisteínas presentan estos dominios en tandem hacia la región carboxilo terminal. Son necesarios para la redistribución de paxilina hacia las adhesiones focales.

² Los dominios LD son secuencias de aprox. 13 residuos de aas que contienen un par invariable leucina-aspartato en el amino terminal de la proteína. Estas secuencias son necesarias para la localización de FAK a las adhesiones focales, cuando se une con paxilina.

Para iniciar el proceso de extravasación es necesario que el linfocito circulante disminuya su velocidad y frene para "estacionarse" en la pared venular y, de esta forma, que pueda pasar a través de las células endoteliales (Springer, 1994). Las moléculas de la familia de las selectinas (E-selectina y L-selectina) median interacciones débiles mediante las cuales se disminuye la velocidad del linfocito circulante, de manera que éste, prácticamente, comienza a "rodar" sobre las células endoteliales de las vénulas altas (Lawrence and Springer, 1991). A continuación se establecen interacciones de mayor afinidad que permiten que el linfocito se "adhiera" firmemente al endotelio. Estas interacciones son mediadas esencialmente por las integrinas linfocitarias (CD11a/CD18) que interactúan con ICAM-1 (CD54), una proteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas presente en las células endoteliales de las vénulas altas, y cuya expresión es regulada por citocinas inflamatorias (Dustin and Springer, 1989). Una vez que el linfocito se encuentra unido firmemente al endotelio, las quimiocinas (ej: IL-8/NAP-1) contribuyen a inducir la polarización del linfocito, es decir, a la formación de un "leading edge" y de un urópodo (Springer, 1994). Este fenómeno implica entre otras cosas, la polimerización de actina y como consecuencia, cambios en la morfología de la célula linfoide, lo que permite su migración transendotelial (Miller and Krangel, 1992; Rot 1992; Tanaka et al., 1993).

En la superficie de las células linfoides existen numerosas moléculas que inducen señales intracelulares que dan lugar a cambios morfológicos en la célula. Al estimular linfocitos T a través de la oligomerización del receptor para el antígeno del linfocito T (TcR) mediante la adición de anticuerpos dirigidos en contra del TcR, se generan señales que inducen la polimerización de los filamentos de actina y/o la formación de redes de filamentos o husos de actina que generan movimiento celular (Parcey and Lewis, 1993). Además de las moléculas que confieren el reconocimiento específico para el antígeno, existen moléculas accesorias en la superficie celular de los linfocitos que juegan también un papel importante en los fenómenos de activación celular, reconocimiento de células presentadoras de antígeno (APCs) y remodelación de citoesqueleto, tal es el caso de CD2, CD4, CD8, CD34, CD40, CD43 y CD44 (Bierer et al., 1989; Gepper and Lipsky, 1991; Offringa and Bierer, 1993; Tada et al., 1999; Rosenstein et al., 1999).

EL CO-RECEPTOR CD43

En este trabajo nos enfocamos a analizar la participación de la molécula CD43, también conocida como sialoforina ó leucosialina, en la inducción de rearrreglos del citoesqueleto.

El co-receptor CD43 es una proteína de la superficie membranal altamente glicosilada y que se expresa en todos los tipos de células linfocitarias, excepto eritrocitos (Remold-O'Donnell et al., 1986). Su estructura alargada (45 nm) y abundancia (500,000 moléculas por célula) sugieren que es una de las primeras moléculas que interaccionan con la célula presentadora de antígeno, y que esta interacción genera señales intracelulares en la célula linfoide (Shelley et al., 1989; Park et al., 1991; Cyster and Williams, 1992).

1) ESTRUCTURA DE CD43.

CD43 está constituida por tres dominios bien definidos. El dominio extracitoplásmico contiene 235 aminoácidos (aa), de los cuales uno de cada cuatro son prolinas, serinas ó treoninas. Estos dos últimos aminoácidos mantienen uniones O-glicosídicas con los carbohidratos galactosa y galactosamina, que a su vez se unen a residuos de ácido siálico (Pallant et al., 1989; Shelley et al., 1989; Cyster et al., 1990); por su composición y estructura alargada, CD43 se considera una sialomucina. Consta de una región transmembranal de 23 aa y de una región intracitoplásmica (IC) de 123 aa que mantiene 72% de identidad entre humano, ratón y rata (Cyster et al., 1990). Esta región tiene una secuencia rica en prolinas hacia el carboxilo terminal de la molécula que puede ser un sitio de unión a proteínas que contienen dominios SH3 (Pedraza-Alva et al., 1996). Debido a la conservación del dominio intracitoplásmico de CD43 entre varias especies y su papel en la interacción con proteínas intracelulares, se sugiere que éste es necesario para desempeñar funciones de señalización mediadas por CD43 (Remold-O'Donnell et al., 1987; Piller et al., 1989; Park et al., 1991; Pedraza-Alva et al., 1996; 1998).

2) EXPRESION E ISOFORMAS DE CD43.

Se han reportado dos isoformas de CD43 que se originan por procesos postraduccionales y que resultan de patrones diferenciales de glicosilación. Existe una isoforma de 115 KDa en la que los residuos de ácido siálico se encuentran unidos a tetrasacáridos, y que se expresa preferencialmente en timocitos, linfocitos T CD4⁺ en reposo, y monocitos; mientras que en plaquetas, linfocitos B, linfocitos T CD4⁺ activados, linfocitos CD8⁺ y neutrófilos se expresa una isoforma de 130 KDa en la que los residuos de ácido siálico se unen a hexasacáridos (Carlsson and Fukuda, 1986; Remold-O'Donnell, 1987).

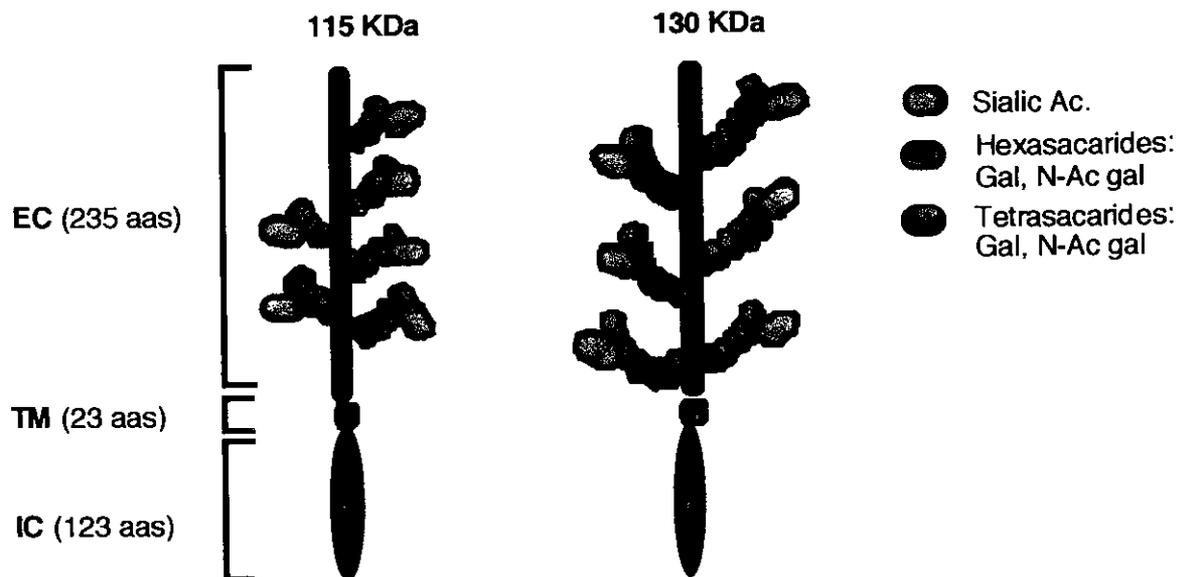


FIG. 2. ESTRUCTURA E ISOFORMAS DE CD43

CD43 es una proteína que atraviesa una sola vez la membrana celular. Esta compuesta por tres dominios: Un dominio extracelular (EC), un dominio transmembranal (TM) y un dominio intracitoplásmico (IC). Existen dos isoformas de CD43 que se diferencian en su grado de glicosilación (ver detalles en el texto).

3) LIGANDOS

Se han identificado por lo menos cinco ligandos para CD43: la proteína de adhesión intercelular ICAM-1 (CD54), la albumina de suero humana (HSA), la galectina-1, el virus de la influenza (IAV), el complejo proteico MHC clase I (Rosenstein et al., 1991; Nathan et al., 1993; Baum et al., 1995; Abramson and Hudnor, 1995; Stöckl et al., 1996).

ICAM-1 es una proteína que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Es también un ligando de la integrina linfocitaria CD11a/CD18 (LFA-1). La interacción de estas dos moléculas establece una de las vías más importantes de adhesión linfocitaria (Dustin and Springer, 1989). La interacción de CD43 con ICAM-1 se descubrió mediante ensayos de adhesión utilizando CD43 purificado e inmovilizado en placas y células Daudi, que expresan ICAM-1. Esta interacción es específica, ya que al utilizar anticuerpos anti-CD43 ó anti-ICAM-1 se inhibe la unión (Rosenstein et al., 1991).

La albúmina de suero humano a través de su interacción específica con CD43 inhibe, en neutrófilos, la respuesta respiratoria (producción de radicales de oxígeno) mediada por TNF (factor de necrosis tumoral).

HSA bloquea el corte de CD43 inducido por TNF en neutrófilos. Se ha sugerido que la interacción específica entre la molécula CD43 y HSA puede regular la proliferación celular de neutrófilos y de esta forma, controlar los flujos de neutrófilos hacia zonas de infección (Nathan et al., 1993).

Se ha descrito que **galectina-1**, una lectina tipo S, participa en fenómenos de reconocimiento y adhesión de células normales y neoplásticas (Perillo et al., 1995). Anticuerpos anti-CD43 y anti-CD45 inhiben significativamente la unión de galectina-1 a una línea de células linfoblastoides T (MOLT-4), lo cual sugiere que CD43 y CD45 son ligandos de galectina-1. Durante el desarrollo y maduración de linfocitos T, la expresión de galectina-1 en células estromales de nódulos linfoides induce apoptosis de los timocitos autoreactivos durante el proceso de selección negativa. CD43 se expresa en linfocitos T durante estos estadios y es probable que la unión de CD43 y/o CD45 con galectina-1 también juegue algún papel en la selección de timocitos durante el desarrollo (Perillo et al., 1995; Baum et al., 1995).

CD43 es también un ligando para el virus de la influenza A en leucocitos polimorfonucleares (PMN). Esta interacción induce la producción de radicales libres como peróxido de hidrógeno a la vez que una disminución significativa en las funciones de éstas células. La interacción que se establece entre CD43 e IAV es específica ya que la reacción producida por IAV en PMN puede ser inhibida por anticuerpos anti-CD43 (Abramson and Hudnor, 1995).

CD43 interactúa también con las moléculas **MHC-I**; esta unión induce la formación de conjugados de células linfoides con células dendríticas. La formación de conjugados celulares resultantes de la unión de MHC-I con CD43 se demostró utilizando anticuerpos anti-CD43 y anti-MHC-I. En ese mismo reporte se encontró que la estimulación con el anticuerpo monoclonal anti-CD43 6F5 incrementa la adhesión célula-célula al aumentar la afinidad de la interacción entre el co-receptor CD2 y su ligando CD58 por un fenómeno de transactivación. Estos datos sugieren que la interacción entre CD43 y MHC-I en células dendríticas y una línea linfoblastoide, favorece la formación de conjugados celulares que inician la comunicación celular (Stöckl et al., 1996).

4) SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE CD43

Es probable que la interacción específica de las distintas isoformas de CD43 con su(s) ligando(s) determine alguna de las múltiples funciones que se han descrito para esta molécula, como son regulación de la adhesión, activación celular y apoptosis (Rosenstein et al., 1991; Nathan et al., 1993; Baum et al., 1995; Abramson and Hudnori, 1995; Stöckl et al., 1996).

Para semejar el proceso normal de estimulación por los ligandos, se han utilizado anticuerpos monoclonales para entrecruzar a distintas moléculas co-receptoras en la superficie celular y estudiar las señales intracelulares que se generan. En el caso de CD43 se han empleado distintos anticuerpos monoclonales para oligomerizar a CD43 en la superficie celular. CD43 es capaz de activar linfocitos T, independientemente del TcR (Mentzer et al., 1987; Axelsson et al., 1988). Al igual que otros co-receptores linfocitarios, como CD5, CD7, CD8 y CD28, CD43 se fosforila en respuesta a activadores de PKC (ésteres de forbol) en células mononucleares (Chatila and Raif, 1988). En monocitos, la estimulación con anticuerpos monoclonales en contra de CD43 induce movilización de Ca^{++} intracelular, la activación de PKC e hidrólisis de fosfoinosítidos (Wong et al., 1990). La activación de PKC por PMA induce la hiperfosforilación de CD43 e inhibe la señalización mediada por CD43. Se piensa que una vez activada PKC, hiperfosforila a CD43, ya que la fosforilación de CD43 puede ser bloqueada por estaurosporina, un inhibidor de PKC (Silverman et al., 1989; Wong et al., 1990). Los residuos blanco de fosforilación por PKC en CD43 son serinas que se encuentran en los primeros 73 aminoácidos de la región intracitoplásmica de CD43. (Piller et al., 1989). Recientemente, se ha demostrado que, en linfocitos T, la activación con anticuerpos anti-CD43 induce la fosforilación en tirosinas de la cinasa Fyn. Esta asociación es mediada por la interacción del dominio tipo 3 de homología a Src (SH3) de Fyn y, probablemente, la secuencia rica en prolina de la región intracitoplásmica de CD43 (Pedraza-Alva et al., 1996).

Para que la transducción de señales intracelulares sea eficiente, es necesaria la interacción coordinada de diferentes proteínas, donde la fosforilación de las mismas juega un papel primordial en la formación de complejos proteicos. Al estimular linfocitos T con anticuerpos anti-CD43 se induce además la fosforilación en tirosinas de la proteína adaptadora Shc y del factor de intercambio de guaninas, Vav, promoviendo la

formación del complejo proteico Shc/Grb2 y Vav, que finalmente incide sobre la vía de las MAPK cinasas, activando a ERK2 e induciendo su traslocación al núcleo (Pedraza-Alva et al., 1998). Así mismo, la expresión de CD43 en líneas celulares linfocitarias (CEM) y no linfocitarias, células HeLa y fibroblastos, induce la fosforilación de una proteína de 93 KDa, aún no identificada (Manjunanth and Ardam, 1995; Núñez-Cruz 1997).

Los eventos intracelulares mediados por CD43, como fosforilación y activación de tirosinas cinasas (PTKs), reclutamiento de proteínas adaptadoras, y formación de macrocomplejos proteicos son señales que participan en respuestas celulares como proliferación y adhesión, entre otras. Durante estas respuestas, son parte fundamental los cambios en morfología, caracterizados por remodelaciones del citoesqueleto de actina que involucran la polimerización de actina monomérica para formar filamentos de actina, la subsecuente inducción de pseudópodos, ricos en F-actina, así como la polarización de F-actina hacia sitios de contacto celular en los que participan numerosas proteínas intracelulares que interactúan con el citoesqueleto (Ryser et al., 1982; Phatak et al., 1988; Piller et al, 1991).

El primer indicio de la interacción de CD43 con proteínas de asociación a citoesqueleto de actina fue la co-localización de CD43 con proteínas de la familia Ezrina-Radixina-Moesina (ERMs), las cuales juegan un papel primordial en la asociación de actina a la membrana plasmática. La porción amino terminal de estas proteínas contiene un dominio globular de unión a membrana; esta región es seguida de un dominio α -helicoidal y de un dominio de unión a actina que contiene aminoácidos cargados positivamente y que se encuentra en el carboxilo terminal de la molécula (Tsukita et al., 1997). Las proteínas de la familia ERM se concentran en las membranas plasmáticas y participan en la formación de estructuras como microvellosidades, "*ruffles*" y sitios de contacto célula-célula (Bretscher, 1989; Thuillier et al, 1994; Hirao et al, 1996). Además de regular los rearrreglos del citoesqueleto, las proteínas ERM generan señales intracelulares (Thuillier et al., 1994; Hirao et al., 1996). En timocitos, durante la división celular, a través de la interacción con las proteínas ERMs y filamentos de actina, CD43 se concentra en el surco mitótico. Esta interacción es aparentemente mediada por una región de 98 aminoácidos, rica en residuos cargados positivamente, que se encuentran en la región IC de CD43 (Yonemura et al., 1993). Así mismo, la estimulación de timocitos ó

neutrófilos con anticuerpos anti-CD43, colchicina o péptidos quimiotácticos induce, por medio de un motor de miosina, la polarización de CD43 hacia el urópodo. Estos datos sugieren que CD43 participa en polarización celular (Sanchez-Mateos et al., 1995; Seveau et al., 1997).

Datos experimentales de nuestro laboratorio también sugieren que CD43 interacciona directa ó indirectamente con proteínas del citoesqueleto. Al realizar inmunoblots anti-actina en inmunoprecipitados de CD43 de lisados de linfocitos T observamos actina; así mismo al realizar inmunoblots anti-CD43 en inmunoprecipitados de actina observamos a CD43. Además, la activación de linfocitos T humanos de sangre periférica a través de CD43 induce la polimerización de actina (Pedraza-Alva G. y Mérida L.B., datos no publicados). En conjunto, estos resultados sugieren que las señales dependientes de CD43 podrían estar directamente asociadas con los mecanismos de remodelación de actina.

En éste trabajo, nos enfocamos a estudiar la participación de la molécula CD43 en rearrreglos de citoesqueleto y en la activación de las cinasa de adhesiones focales FAK y PYK-2.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es estudiar las señales de activación generadas a través de la molécula CD43.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar si las vías de señalización inducidas por CD43 participan en la remodelación del citoesqueleto.
- 2) Identificar la región del dominio IC de CD43 que interactúa con proteínas que regulan la arquitectura del citoesqueleto.

HIPOTESIS

En base a resultados preliminares de nuestro grupo y otros sobre la participación de CD43 en polarización celular y formación de estructuras celulares como urópodos, proponemos que la expresión del cDNA que codifica para CD43 humano en fibroblastos de ratón nos permitirá analizar el papel de esta molécula en remodelación de citoesqueleto, sin la intervención de otras moléculas linfocitarias que pudieran regular ó enmascarar éste efecto. Esperamos que la expresión estable de CD43 en células no linfoides induzca cambios morfológicos mediados por proteínas de citoesqueleto, cambios en el estado de fosforilación y en la localización de proteínas que participan en la regulación de las funciones del citoesqueleto.

MATERIALES Y METODOS.

1) TRANSFECCION POR PRECIPITACION CON CALCIO Y FOSFATO.

Las construcciones que se emplearon para las transfecciones se crearon a partir del cDNA de CD43 humano insertado en el plásmido *pFneo* (Park et al, 1991). La expresión de los genes insertados en *pFneo* depende de la actividad del promotor SFFV-LTR (Spleen Focus Forming Virus), derivado de un promotor de vectores retrovirales que contienen LTRs (Proviral Long Terminal Repeats; Hanh et al., 1993). Además del SFFV-LTR, *pFneo* está provisto de un gen controlado por el promotor de SV40 (early promotor) que confiere resistencia a neomicina (G418) y un gen con resistencia a ampicilina, derivado del plásmido pBR322.

Las construcciones utilizadas en este estudio fueron:

pFneo (el plásmido solo), *CD43 wt* (contiene el cDNA completo de CD43), ΔPRO , que carece de los aminoácidos 356 al 380 que se encuentran hacia el COOH terminal de CD43 y, ΔIC que carece de toda la región IC de CD43. (Núñez-Cruz, 1997, Apendice 2).

Para analizar la función de CD43 en un sistema libre de moléculas linfocitarias que pudieran intervenir en la actividad de CD43 se transfectaron las diferentes construcciones de CD43 por el método de precipitación con calcio y fosfato en fibroblastos de ratón NIH-3T3. La técnica que se utilizó se describe a continuación:

Se utilizaron 15 μ g del DNA (*pFNeo*, *pCD43*, ΔPRO ó ΔIC) resuspendido en 25 μ l de agua estéril al que se adicionaron 450 μ l de solución HEBS (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 0.7 mM, HEPES 21 mM pH 7.1, KCl 5 mM , glucosa 6 mM) y 25 μ l de CaCl₂ 2M. Se incubó a temperatura ambiente por 20 min para inducir la precipitación del DNA unido a las sales de calcio y fosfato. La solución HEBS/DNA (*pFNeo*, *pCD43*, ΔPRO ó ΔIC) se agregó gota a gota a las células 3T3 y se dejó en reposo por 4 h a 37° C, con 5% de CO₂. Después, para favorecer la entrada del DNA a las células, se realizó un "shock de glicerol" donde se adicionan 2 ml de HEBS con 15% de glicerol (previamente calentado a 37° C). Al cabo de 2 min exactos, las células se lavaron con PBS para eliminar los residuos de glicerol y, posteriormente las células se cultivaron en placas a 37° C con 5% de CO₂ en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Biosciences) complementado con: glutamina 2 mM (Sigma), estreptomycin 50 μ g/ml,

penicilina 100U (Gibco), fungizona 50 µg/ml (Gibco), gentamicina 10 mg/ml (Gibco) y suero fetal bovino (FCS) al 10% (Hyclone). Después de 24 h se agregó el antibiótico neomicina (G418) a una concentración de 600 µg/ml (antibiótico al que pFNeo confiere resistencia) para seleccionar las células que contienen las diferentes construcciones. Las colonias de células que sobrevivieron a la selección con G418 se cultivaron en DMEM completo y G418 y, se seleccionaron nuevamente en función de su expresión de CD43 en la superficie celular por medio de inmunoblots con anti-CD43.

2) AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFERICA

Se aislaron linfocitos T a partir de concentrados leucocitarios obtenidos de donadores voluntarios sanos del banco de sangre. Después de diluir el concentrado leucocitario 1:3 en PBS, las células se centrifugaron sobre un colchón de Ficoll-Hypaque en una centrífuga clínica (Sorvall RT 6000D) por 30 min a 1,200 rpm a temperatura ambiente (TA). Las células mononucleares que se encuentran en la interfase del medio acuoso y del Ficoll-Hypaque se aislaron con ayuda de una pipeta estéril. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con PBS: una vez centrifugándose por 15 min a 1,200 rpm a TA y la segunda vez 7 min a 1,200 rpm a TA. Finalmente, las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 complementado con 5% de FCS, 5% de suero de bovino recién nacido complementado con hierro (BCS, Hyclone) y antibióticos (ver sección anterior). Para separar linfocitos de células adherentes (esencialmente macrófagos y monocitos), las células mononucleares se incubaron a 8×10^7 cels/placa toda la noche en cajas de petri de 10 cm de diámetro (Costar) a 37° C con 5% de CO₂. Al día siguiente, las células no adherentes se colectaron y, después de centrifugar 5 min a 1,200 rpm a TA, se cargaron en columnas de lana de nylon (previamente equilibradas con RPMI complementado) y se incubaron, por 2 h, a 37° C con 5% de CO₂. A continuación, los linfocitos T se eluyeron de las columnas con RPMI complementado y calentado a 37° C. La pureza de la población celular se analizó por citofluorometría. El porcentaje de linfocitos T CD3⁺ fue alrededor del 80% y el porcentaje de células que expresaron CD43 en su superficie fue alrededor de 95%.

Antes de la estimulación con diferentes anticuerpos (ver sección c), las células se arrestaron por 24 h en medio RPMI complementado con 2% de FCS en presencia de antibióticos con la finalidad de iniciar los experimentos de activación a partir de linfocitos T con maquinaria basal.

3) ACTIVACION DE LINFOCITOS T.

a) PEGADO DE ANTICUERPOS A PLACAS

Se agregó 1 ml de inmunoglobulinas de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón (ramig), a una concentración de 5 µg por ml de PBS a cajas de petri de 6 cm de diámetro (Costar) y se dejó adherir durante 24 h a 37° C con 5% de CO₂. Posteriormente se bloqueó con una solución estéril de BSA al 1% en PBS durante por lo menos 2 h. Las placas se lavaron con PBS a 37° C y se adicionó el primer anticuerpo (anti-CD43, L10, anti-CD3ε, OKT3 ó un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo que L10; 3D6) a una concentración de 10 µg por ml, se incubó durante 24 h. Al día siguiente, se volvió a lavar con PBS a 37° C y se adicionaron 1×10^7 linfocitos T de sangre periférica. En el caso de activación con TPA, se utilizaron placas con ramig adherido en ellas y se agregó TPA en solución a una concentración de 50 ng por ml, por placa.

b) ACTIVACION

Los linfocitos T (1×10^7) sembrados en las placas preparadas, como se describe en la sección anterior, se siguieron durante una cinética de activación de 3 a 60 min. Para asegurarse que todas las células se depositaran en el fondo de la placa al mismo tiempo, las placas se centrifugaron a 400 rpm por 10 segundos. Las placas se mantuvieron a 37° C con 5% de CO₂ por los tiempos indicados. Después del período de activación, las células no adheridas a las placas se aspiraron con pipeta y se adicionaron 200 µl de buffer de lisis (ver sección bioquímica) a las placas. Para desprender las células adheridas, se utilizó una espátula; los lisados celulares se trataron como se describe en la sección de inmunoprecipitados.

4) BIOQUIMICA DE PROTEINAS

a) INMUNOPRECIPITADOS.

Se hicieron lisados celulares de las clonas de células NIH-3T3 transfectadas con las distintas construcciones (*pFneo*, *CD43wt*, Δ *PRO* ó Δ *IC*) ó de 1×10^7 linfocitos T con buffer de lisis (Hepes 25mM pH7.7, NaCl 150 mM, MgCl₂, EDTA 0.2mM, Tritón X-100 al 0.5%, DTT 0.5 mM, β -glicerolfosfato 20 mM, Na₃VO₄ 1mM, NaF 5mM, PMSF 4mM, leupeptina 1 μ g/ml, aprotinina 1 μ g/ml) incubando por 30 min a 4 °C. Los lisados se centrifugaron 10 min a 14,000 rpm a 4 °C y, se pre-clarificaron por incubación por 40 min con esferas sefarosa 4B-proteína A. Se centrifugaron por 10 segundos a 14,000 rpm a 4 °C y con el sobrenadante, se hicieron inmunoprecipitados para FAK con un anticuerpo policlonal anti-FAK obtenido de conejo(c-20, Santa Cruz Biotechnologies) ó para PYK-2, con un anticuerpo policlonal anti-PYK-2 obtenido de conejo (Upstate Biotechnology). Después de 60 min a 4° C se adicionaron 20 μ l de esferas de sefarosa 4B-proteína A a los lisados y se incubaron por 2 h a 4° C. Para eliminar las proteínas que estuvieran interaccionando inespecíficamente, los inmunoprecipitados se lavaron una vez con TNE-T (Tris/HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 140 mM, EDTA 5 mM, Triton X100 1%), dos veces con TNE (Tris/HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 140 mM, EDTA 5 mM) y una vez con agua bidestilada. Los complejos inmunes asociados a la sefarosa 4B-proteína A se desnaturalizaron en presencia de buffer de muestra 2x (Tris/HCl 625 mM pH 6.8, 15% de glicerol, 2% de SDS, 0.001 % de azul de bromofenol, 5% de β -mercaptoetanol), para luego ser separados en geles desnaturalizantes por SDS-PAGE.

b) INMUNOBLOTS

Las proteínas se resolvieron en geles desnaturalizantes por SDS-PAGE 10% (Laemmli, 1979). Para fibroblastos, se utilizaron 20 μ g de proteína celular de cada lisado celular (*pFneo*, *CD43*, Δ *PRO* y Δ *IC*), determinadas por el método de Bradford (1976), y para linfocitos se utilizaron los lisados correspondientes a 2×10^6 células por punto. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.22 μ m previamente humedecidas en buffer de transferencia (Tris/HCl 48 mM y glicina 39 mM, pH 7.4). La transferencia a la membrana se realizó a 100 mAmp por 1 h, utilizando una cámara de transferencia semi-seca (BioRad). Para blots anti-fosfotirosinas se bloqueó con BSA al 5% disuelta en TBS-T durante toda la

noche a 4 °C. Se lavó con TBS-T y se agregó el anticuerpo anti-fosfotirosinas 4G10, 1µg/ml diluído en TBS-T. Se incubó toda la noche a 4 °C. Para los blots anti-FAK, se utilizó el anticuerpo policlonal c-20 a una dilución 1:700 en leche al 5% disuelta en TBS-T, se realizó el mismo procedimiento como ya se describió. Después de lavar la membrana tres veces con TBS-T, se agregó el segundo anticuerpo (inmunoglobulinas de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón acopladas a peroxidasa), a una dilución 1:5000 y se incubó por 1 h. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y se reveló por el método ECL (Enhanced chemiluminescence, Amersham), el cual es un método no radiactivo que se utiliza para la detección de antígenos específicos conjugados directa o indirectamente con anticuerpos acoplados a peroxidasa de rábano (HRP/peróxido de hidrógeno). La HRP cataliza la oxidación de luminol permitiendo la emisión de luz en presencia de fenoles. Estos últimos aumentan la intensidad de emisión luminosa de las muestras hasta 1000 veces por 5-20 min hasta decaer después de 1 h (Withehead, 1979).

c) ENSAYOS DE CINASA.

Para realizar los ensayos de cinasa, se utilizó una placa confluyente de células 3T3 pFneo, CD43, Δ PRO ó Δ IC, para cada punto experimental. Cada placa se lisó con 200 µl de buffer de lisis, los lisados celulares se incubaron por 30 min a 4 °C, y posteriormente se centrifugaron 10 min. a 14000 rpm a 4 °C. Se determinaron las cantidades de proteína de cada lisado celular y se hicieron inmunoprecipitados de FAK ó PYK-2 con los anticuerpos ya mencionados (2 µg para cada punto, ver sección a) a partir de cantidades equivalentes de proteína (200 µg por punto). Después de al menos 2 h a 4 °C, los complejos inmunes se aislaron agregando 20 µl de sepharosa 4B-proteína A y se incubaron por lo menos 1 hr más a 4 °C. Los complejos inmunes se lavaron dos veces con buffer TNE-T, una vez con TNE (sin detergente) y una vez con buffer de cinasa (Hepes 20 mM, NaCl 160 mM, MgCl₂, MnCl₂ 5mM). Después, las esferas se incubaron con 100 µl de buffer cinasa por 15 min a 30 °C con ó sin 20 µM de ATP y se lavaron con buffer TNE-T (dos veces) y con buffer TNE (una vez). Las muestras se corrieron en geles de acrilamida al 10% y se transferieron a nitrocelulosa. El estado de fosforilación de FAK se detectó utilizando el anticuerpo anti-fosfotirosinas 4G10, comprobándose la presencia de cantidades equivalentes de FAK con inmunoblots anti-FAK.

5) INMUNOCITOQUIMICA

a) EVALUACION DEL GRADO DE PUREZA DE LOS LINFOCITOS T AISLADOS DE CONCENTRADOS LEUCOCITARIOS.

Como se mencionó anteriormente, la pureza de la población de linfocitos T aislados, fue evaluada por métodos convencionales de citometría. Brevemente, las células se incubaron con anti-CD43 (L10, ascitis 1:100) en solución de FACS (NaN₃ al 0.02 % en PBS, 2% FCS) por 30 min a 4 °C. Después de lavar con 4 ml de solución de FACS se agregaron 50 µl de Ramig-FITC al pellet celular, se incubó por 30 min a 4 °C en la oscuridad. El exceso de anticuerpo marcado se eliminó lavando las células una vez más a 1,200 rpm por 5 min a 4 °C. Finalmente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 1% en PBS y almacenadas a 4 °C y en la oscuridad hasta ser analizadas en el citómetro, usando el programa CellQuest (Becton & Dickinson).

b) SELECCION

A partir de una caja de petri de 10 cm de diámetro, con un cultivo confluyente de fibroblastos de ratón transfectados con cada una de las diferentes construcciones de CD43 (*pFneo, CD43, Δ PRO* ó *Δ IC*) se realizó una selección por FACS/SORT (Becton & Dickinson) para aislar células que expresaran cantidades equivalentes de CD43 en su superficie. Se procedió como sigue: después de remover el medio de cultivo, las células adherentes se lavaron con PBS y se desprendieron de la superficie del plástico con una solución de tripsina (tripsina 0.05% y EDTA-4Na 0.53 mM, Gibco). Posteriormente, las células se depositaron en tubos de poliestireno de 12 x 5 mm (Falcon) y se centrifugaron por 5 min a 1,200 rpm a 4 °C. El pellet celular se resuspendió en una solución de PBS y 0.01% de suero de bovino recién nacido (BCS) para remover el exceso de tripsina. Se volvió a centrifugar por 5 min a 1,200 rpm. A continuación se adicionaron 50 µl del anticuerpo anti-CD43 L10 (ascitis, en una dilución 1:100) incubándose en frío durante 1 h a 4 °C. Después de lavar con 1 ml de solución PBS/BCS, se adicionó el segundo anticuerpo, ramig-FITC y se incubó 30 min a 4 °C en la oscuridad. Se volvió a lavar con 1 ml de PBS/BCS. Las células 3T3 (*CD43, Δ PRO* ó *Δ IC*) se pasaron por el citómetro y se seleccionaron las poblaciones de células positivas para CD43; posteriormente, se cosecharon en tubos cónicos de 50 ml, los cuales contenían medio DMEM complementado con 20% de suero fetal y

antibióticos. Las células seleccionadas se concentraron por centrifugación y posteriormente se cultivaron sobre cubreobjetos de vidrio, previamente limpiados con etanol, con medio DMEM completo a 37° C con 5% de CO₂ por 24 h.

c) INMUNOTINCION PARA MICROSCOPIA

Al día siguiente, las células aisladas por citometría se lavaron dos veces con PBS a 37° C y se tiñeron para CD43 (con L10 ascitis en una dilución 1:100) por 1 h a 4 °C; pasado ese tiempo, las células se fijaron con 1 ml de paraformaldehído al 2% y 1 ml de solución de FACS por 10 min. El exceso de solución se aspiró con ayuda de una pipeta pasteur. A continuación se adicionó el segundo anticuerpo, anti-ratón unido a ficoeritrina (dilución 1:250), y se dejó en obscuridad por 1 h a 4 °C. Pasado ese tiempo, se lavó con solución de FACS fría dos veces y las células se permeabilizaron incubando por 10 min a temperatura ambiente con 0.01 % de Triton X-100 diluido en solución de FACS. Después de lavar con solución de FACS fría, las células se tiñeron por 1 h a 4 °C con un conjugado de faloidina fluoresceínada (proteína que se une a F-actina). Las células se lavaron para eliminar el exceso del conjugado y se fijaron otra vez con 1 ml de paraformaldehído al 2% y 1 ml de solución de FACS.

Las células teñidas adheridas a los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con una solución de glicerol al 50% en PBS. Se sellaron las preparaciones con barniz transparente y se guardaron a 4 °C en la obscuridad hasta su análisis en microscopio confocal y de fluorescencia.

El mismo procedimiento de tinción se realizó para linfocitos T. Salvo que, para éstos, se tiñó para CD43 con el anticuerpo MEM-59 (Ig G1 como L10) y se utilizaron cubreobjetos de plástico, debido a que se activaron las células con anticuerpos (L10, 3D6 ó TcR) unidos a plástico (como en sección 3).

RESULTADOS

1) LA EXPRESION ECTOPICA DE CD43 EN FIBROBLASTOS INDUCE CAMBIOS EN LA MORFOLOGIA Y TAMAÑO CELULAR, ASI COMO EN EL CITOESQUELETO.

a) ANALISIS DE LA MORFOLOGIA Y DEL TAMAÑO CELULAR

En este trabajo nos enfocamos a analizar la participación de CD43 en la polarización celular y rearrreglos del citoesqueleto. Se hicieron dos construcciones a partir de la región intracitoplásmica del gen que codifica para CD43 humano: Δ PRO, que carece de 75 pb que corresponden al COOH terminal de la proteína (aminoácidos 356 al 380) y Δ IC que carece de toda la región IC de CD43 (Núñez-Cruz, 1997). Para analizar la participación de esta molécula en la remodelación del citoesqueleto sin la intervención de moléculas linfocitarias que pudieran enmascarar su actividad, las construcciones CD43 wt, Δ PRO y Δ IC se transfectaron en fibroblastos 3T3 de ratón. La expresión de cualquiera de las formas de CD43 genera notables cambios en la morfología celular de las células NIH-3T3. Es interesante notar que los fibroblastos transfectados con CD43wt son, en promedio, 5 veces más grandes que los fibroblastos sin transfectar ó transfectadas con el plásmido pFneo (Tabla 2). Debido a su gran tamaño, en las células CD43wt se observa con mejor detalle las estructuras secundarias de citoesqueleto de un fibroblasto normal (lamelopodios, fibras de estrés y filopodios). Las células 3T3 Δ PRO en cambio, tienen una longitud semejante a las transfectadas con CD43wt pero son muchísimo más angostas que éstas últimas y presentan un aspecto alargado, con prolongaciones de tipo filopodios que asemejan dendritas.

TABLA 2- LA EXPRESION DE CD43 INDUCE CAMBIOS EN EL TAMANO CELULAR.

	Largo \pm SD(μ m)	Ancho \pm SD(μ m)
NIH-3T3 pFneo	12.90 \pm 4.80	3.37 \pm 0.55
NIH-3T3 CD43 wt	29.00 \pm 6.55 ¹	13.29 \pm 6.30 ¹
NIH-3T3 Δ Pro	25.37 \pm 5.09 ¹	1.03 \pm 0.53 ²
NIH-3T3 Δ IC	14.32 \pm 2.10	4.71 \pm 1.25

Células NIH/3T3 transfectadas con pFneo, CD43 wt, CD43 Δ PRO ó CD43 Δ IC se midieron con un ocular graduado. Se muestran resultados del promedio de la medición de 100 células \pm SD en cada caso. Estos valores fueron significativamente diferentes ($p < 0.001$)¹ y ($p < 0.05$)² de los de las células pFneo (prueba t student).

Las células 3T3 Δ IC mantienen un tamaño similar a las células sin transfectar o las transfectadas con el plásmido sólo, pero no se observa un arreglo del citoesqueleto como en los fibroblastos normales, transfectados con el plásmido sólo, ó con CD43wt ó Δ PRO (Tabla 2 y Fig. 3).

b) ORGANIZACION DEL CITOESQUELETO DE FIBROBLASTOS 3T3 QUE EXPRESAN LAS DIFERENTES CONSTRUCCIONES PARA CD43.

La organización de los filamentos de actina en fibroblastos es muy dinámica. Generalmente se distinguen tres tipos de arreglos de citoesqueleto: fibras de estrés en las zonas de contracción celular y adhesiones focales; filopodios en las zonas del frente celular y lamelopodios que son extensiones celulares a través de la cuales se establece contacto con el sustrato.

Por microscopia confocal se analizó la localización de CD43 en la superficie celular, enfocándose en la parte externa del fibroblasto (1.08 μ m) y, la colocación de actina en el citoplasma (a aprox. 4.32 μ m, Fig. 3). En lo que se refiere a la organización del citoesqueleto y a la formación de estructuras secundarias dependientes de la remodelación del citoesqueleto, se observa que si bien las células 3T3 transfectadas con la construcción CD43 wt son más grandes que sus contrapartes transfectadas con el plásmido control, la arquitectura general del citoesqueleto es la misma en ambos casos. Se ven claramente fibras de actina orientadas en la misma dirección (fibras de estrés), así como filopodios y lamelopodios (Fig. 3). La organización de las estructuras secundarias del citoesqueleto de actina se observan claramente en los enormes fibroblastos que expresan a CD43 wt. Cabe señalar que algunas de estas estructuras no se observan en las células que expresan las mutantes Δ PRO ó Δ IC (Fig 3). En las mutantes Δ PRO se observa que el cuerpo celular se prolonga formando estructuras de tipo filopodios, pero no se observa la formación de fibras de estrés ni de lamelopodios. En cuanto se elimina la región IC de CD43 (mutante Δ IC) se observa que los fibroblastos no son capaces de generar estructuras secundarias del citoesqueleto de actina en todo el cuerpo celular (fibras de F-actina, filopodios y lamelopodios).

Estos datos sugieren que CD43 es una molécula co-receptora que está involucrada en la regulación de la arquitectura del citoesqueleto y que la región intracitoplásmica de CD43 juega un papel importante en este fenómeno.

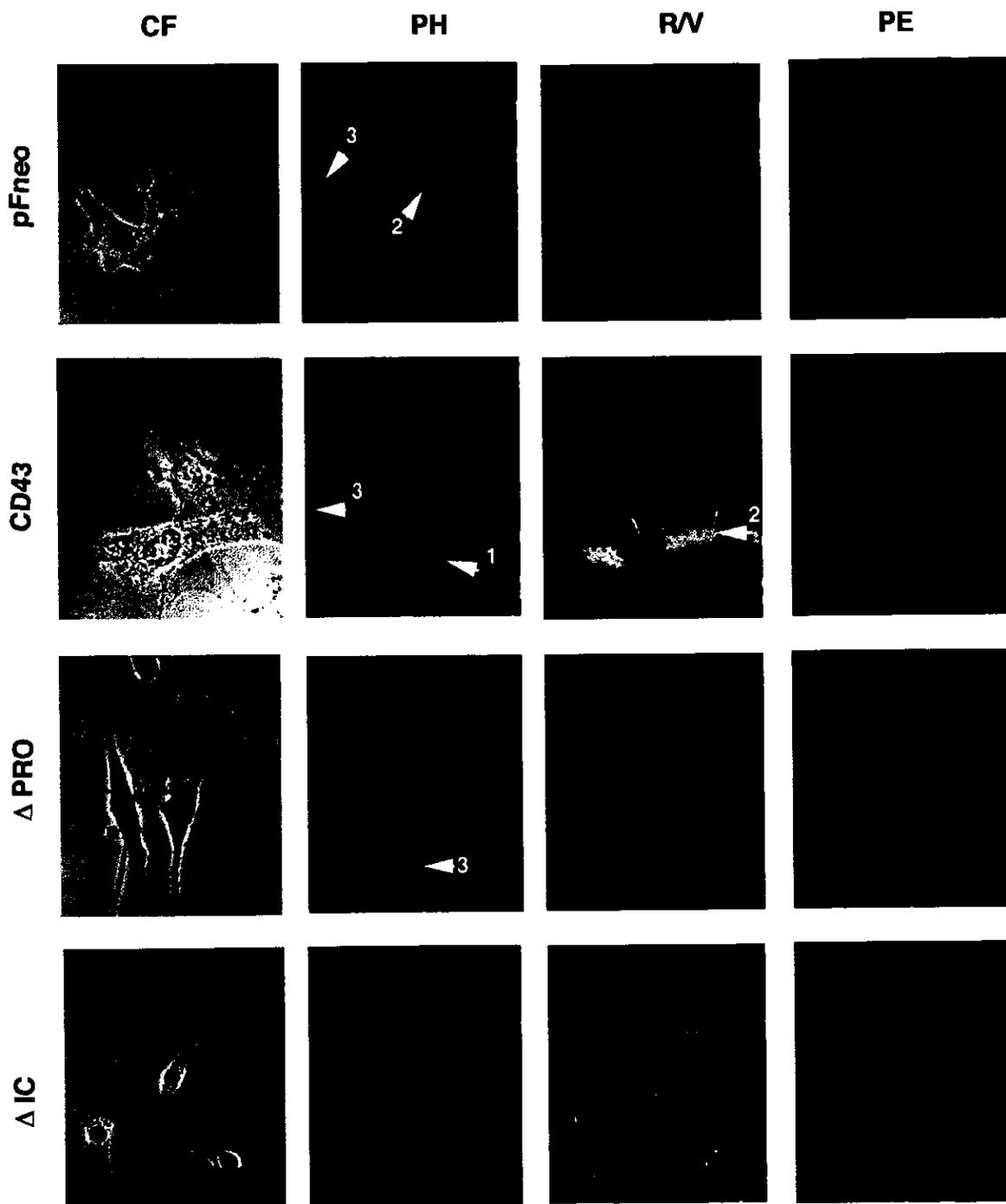


FIG. 3. LA EXPRESIÓN ECTÓPICA DE CD43 INDUCE CAMBIOS EN LA MORFOLOGIA CELULAR DE FIBROBLASTOS DE RATÓN.

Se cultivaron fibroblastos 3T3 pFneo, CD43 wt, Δ PRO y Δ IC en cubreobjetos, se tiñeron para CD43 con el anticuerpo L10 y un segundo anticuerpo acoplado a ficoeritrina. Posteriormente, se permeabilizaron las células y se tiñeron para actina-F con faloidina-FITC, analizándose por microscopia confocal. CF: Contraste de fases, PH: tinción para actina, R/V: sobreposición actina, CD43; PE: Tinción para CD43. Las flechas señalan las fibras de estrés1, lamelopodios2 y filopodios3. Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos en aumento 40x.

2) PARTICIPACION DE LAS CINASAS FAK y PYK-2 EN LA VIA DE ACTIVACION DE CD43.

a) LA EXPRESION DE CD43 EN FIBROBLASTOS DE RATON INDUCE LA FOSFORILACION EN TIROSINAS DE LA PROTEINA FAK.

La cinasa de adhesiones focales (FAK) es una proteína intracelular que se asocia, entre otras moléculas receptoras, a integrinas para controlar respuestas celulares como migración y proliferación. Actúa como una proteína reguladora, ya que tiene dominios de unión a diferentes proteínas intracelulares, como las de la familia de las cinasas Src, así como a proteínas adaptadoras como Grb2 y a proteínas de unión a citoesqueleto como paxilina.

Dado que la autofosforilación de FAK en tirosinas es un evento regulador que correlaciona con la activación y la capacidad de señalización de FAK, analizamos el estado de fosforilación de esta cinasa en fibroblastos CD43⁺. Utilizamos células 3T3 que expresaran cantidades equivalentes de las diferentes mutantes de CD43 (CD43wt, Δ PRO ó Δ IC); a partir de inmunoprecipitados de FAK se hizo un ensayo de cinasa *en frío* en el que se incubaron los inmunoprecipitados con buffer de cinasa en presencia ó ausencia de ATP y Mg⁺⁺.

Los resultados que obtuvimos indican que FAK está constitutivamente fosforilada en tirosinas en todas las poblaciones de fibroblastos 3T3, tanto en las células que expresan alguna forma de CD43 como en las células transfectadas con el vector solo (Fig. 4, panel a). En el análisis densitométrico del blot 4G10, se aprecia un incremento del 20 % en la fosforilación de FAK en los lisados tratados con ATP (datos no mostrados, carriles 5-8, panel a). Pero sólo, se observa un cambio en movilidad electroforética de FAK en las células que expresan CD43 wt (carril 6, panel a), a diferencia de las células que expresan las mutantes Δ PRO ó Δ IC y de las células que sólo fueron transfectadas con el plásmido pFneo (carriles 5, 7 y 8). Esto sugiere que la expresión de CD43 wt induce la fosforilación de otros residuos de tirosinas de FAK, generando cambios en la movilidad electroforética de esta molécula.

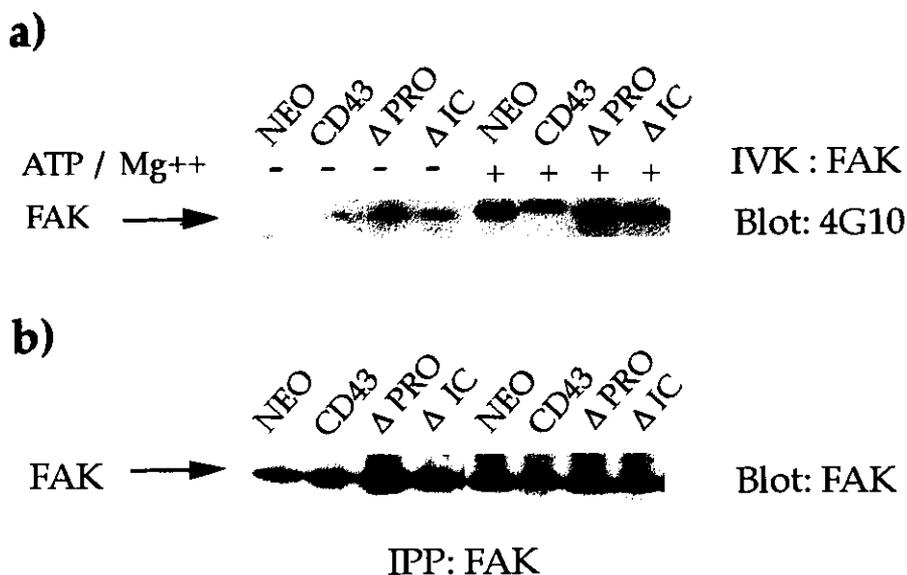


FIG. 4 LA EXPRESIÓN ECTÓPICA DE CD43 EN FIBROBLASTOS 3T3 INDUCE LA FOSFORILACIÓN EN TIROSINAS DE LA CINASA FAK.

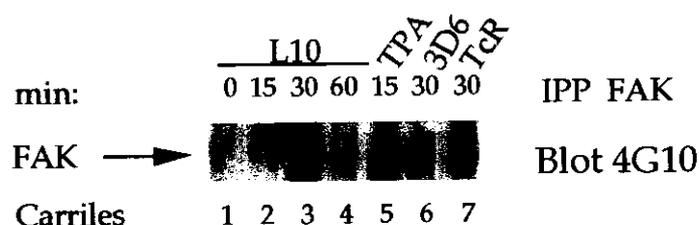
Se evaluó la activación de la cinasa FAK, inmunoprecipitada a partir de lisados celulares de clonas que expresaban cantidades equivalentes de las diferentes mutantes de CD43, mediante un ensayo de cinasa *in vitro* (IVK) en presencia (+) ó ausencia (-) de ATP / Mg⁺⁺. Se probó la membrana con a) el anticuerpo anti-fosfotirosinas 4G10 ó con b) el anticuerpo anti-Fak. (Esta figura es representativa de 4 experimentos).

b) EN LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFERICA HUMANA LAS SEÑALES DE CD43 ACTIVAN A LAS CINASAS FAK Y PYK-2.

FAK y PYK-2 son cinasas que pertenecen a la misma familia, tienen una organización estructural semejante: contienen un dominio de cinasa (60% de identidad) flanqueado por un extremo carboxilo y un extremo amino (40% de identidad, Hanks and Polte, 1997). En células linfocitarias, la cinasa de adhesiones focales FAK participa en la adhesión celular mediada por integrinas, las cuales inducen remodelación del citoesqueleto (Tachibana et al., 1995). Al igual que FAK, la cinasa PYK-2 (proteína cinasa rica en prolinas) se fosforila en tirosinas de manera dependiente de integrinas (Gismondi et al., 1997). PYK-2 participa también en la regulación de canales iónicos inducidos por calcio, en la activación de cinasas de tipo MAPKs, en la activación de la cinasa inducida por estrés JNK y en la activación de la vía de proteínas cinasas MAPK mediada por Src (Hanks and Polte, 1997). En función a los resultados descritos en la sección anterior, en donde

encontramos que FAK está constitutivamente fosforilada en tirosinas en las células NIH-3T3 que expresan CD43wt, evaluamos la posible participación de FAK y PYK-2 en la vía de señalización mediada por CD43 en linfocitos T humanos de sangre periférica. Para ello se hicieron inmunoprecipitados anti-FAK y anti-PYK-2 a partir de los lisados de linfocitos T humanos estimulados con anti-CD43 (L10), anti-TcR (OKT3) inmovilizados sobre placas, ó con TPA soluble, y posteriormente se hicieron inmunoblots anti-fosfotirosinas para evaluar la fosforilación de estas cinasas.

a)



b)

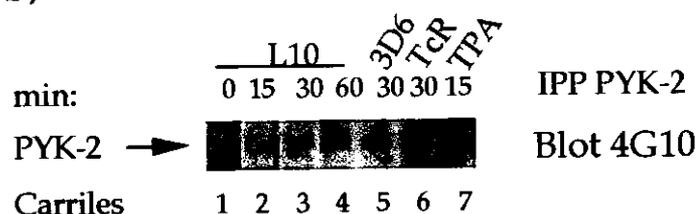


FIG. 5 LA ESTIMULACIÓN A TRAVÉS DE CD43 EN LINFOCITOS T INDUCE LA FOSFORILACIÓN EN TIROSINAS DE FAK Y PYK-2.

Se estimularon 1×10^7 células por punto, a través de CD43, TcR, TPA ó con un anticuerpo irrelevante (3D6), por los tiempos indicados. A partir de lisados preclarificados, se hicieron inmunoprecipitados anti-FAK (panel a) y anti-PYK-2 (panel b). Las proteínas se corrieron en geles SDS-PAGE y se hicieron inmunoblots anti-fosfotirosinas.

Los resultados obtenidos indican que FAK y PYK-2 se fosforilan en tirosinas a un tiempo máximo de 30 min (carril 3 de los paneles a y b de la Fig. 5). Esta fosforilación es mayor al adicionar ésteres de forbol (activadores de PKC, carril 5, panel a y carril 7, panel b). Al estimular a través del TcR se observa también la fosforilación de PYK-2 y FAK (carril

7, panel a y carril 6, panel b). Estos resultados indican que, en linfocitos T humanos, CD43 puede inducir la fosforilación de FAK y PYK-2, promoviendo su activación y la subsecuente participación en vías de señalización que, probablemente, conducen a la reorganización del citoesqueleto.

3) PARTICIPACION DE CD43 EN LOS CAMBIOS DE MORFOLOGIA DE LINFOCITOS T HUMANOS.

a) LAS SEÑALES DE CD43 INDUCEN POLARIZACION CELULAR Y FORMACION DE URÓPODOS.

La cinasa FAK se localiza en las adhesiones focales de la célula y al fosforilarse en tirosinas se promueve su unión con proteínas adaptadoras, otras proteínas cinasas y proteínas de unión al citoesqueleto de actina (Hanks and Polte, 1997). El complejo macromolecular que se forma y las señales que se generan, promueven el movimiento celular (Parsons, 1996) y el contacto con otras células (Yamada and Geiger, 1997) a través de estructuras celulares como los urópodos, los cuales son prolongaciones apicales que contienen altas concentraciones de actina filamentosa.

Debido a la capacidad que tiene CD43 de inducir la fosforilación de FAK y de PYK-2 (Fig. 4 y 5) y de promover cambios en el citoesqueleto, evaluamos la formación de urópodos en linfocitos T humanos en respuesta a las señales dependientes de CD43. Así mismo, evaluamos la localización de CD43 y de actina en respuesta a las señales específicas mediadas por CD43.

Linfocitos T humanos aislados de sangre periférica se activaron por distintos tiempos por medio del anticuerpo anti-CD43 L10 inmovilizado sobre placas. Así mismo, se activaron a través del TcR con el anticuerpo OKT3, con 3D6, un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo que L10, así como con TPA. Posteriormente se hicieron dobles tinciones utilizando un anticuerpo anti-CD43 (MEM-59) y un segundo anticuerpo anti-ratón unido a ficoeritrina para teñir las células para CD43 y, conjugados fluoresceinados de faloidina (que se une a F-actina) para teñir para actina (materiales y métodos).

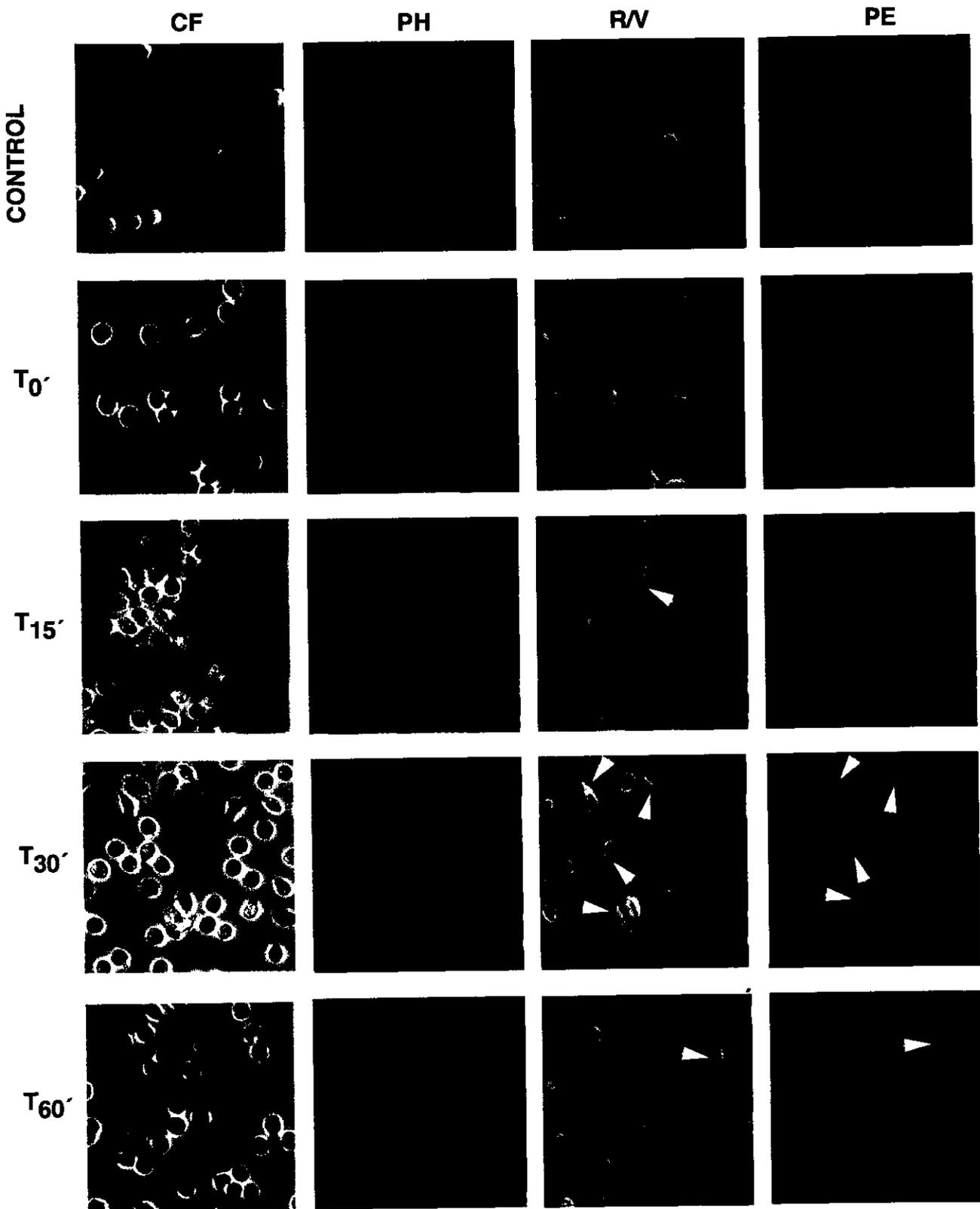


FIG. 6 EN LINFOCITOS T LA ACTIVACIÓN A TRAVÉS DE CD43 INDUCE LA POLARIZACIÓN CELULAR, Y LA COLOCALIZACIÓN DE CD43 CON ACTINA HACIA EL URÓPODO

Se activaron linfocitos T humanos por diferentes tiempos con anticuerpos anti-CD43 y anti-3D6 (detalles en materiales y métodos). Las células se tiñeron con el anticuerpo anti-CD43 MEM-59 y un segundo anticuerpo acoplado a ficoeritrina y, después de permeabilizar, se tiñó para actina-F con faloidina-FITC. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2%. CF: Contraste de fases, PH: tinción para actina, R/V: sobreposición actina-CD43; PE: Tinción para CD43. Las flechas señalan los urópodos de algunas células polarizadas. Se muestran imágenes de microscopía confocal en aumento 40x, representativas de 3 experimentos independientes.

Al estimular a través de CD43, TPA ó TcR, la máxima formación de urópodos se presenta a los 30 min (Fig. 6 y 7). Esta coincide con la máxima fosforilación de las cinasas FAK y PYK-2 (Fig. 5). En células estimuladas con anticuerpos anti-CD43 (ver cinética de activación en la Fig. 6), ésteres de forbol (TPA) ó con el TcR, CD43 colocaliza con actina principalmente hacia el urópodo (datos no mostrados). En células activadas con un anticuerpo control (3D6) del mismo isotipo que L10, no se observa la formación de urópodos, comparando con las células estimuladas a través de CD43 (Fig. 6).

El análisis cuantitativo de la inducción de urópodos en linfocitos T humanos de sangre periférica, en respuesta a las señales de CD43, reveló que esta molécula genera señales que dan lugar a la formación de urópodos a un máximo de 30 min, como sucede al estimular con TPA.

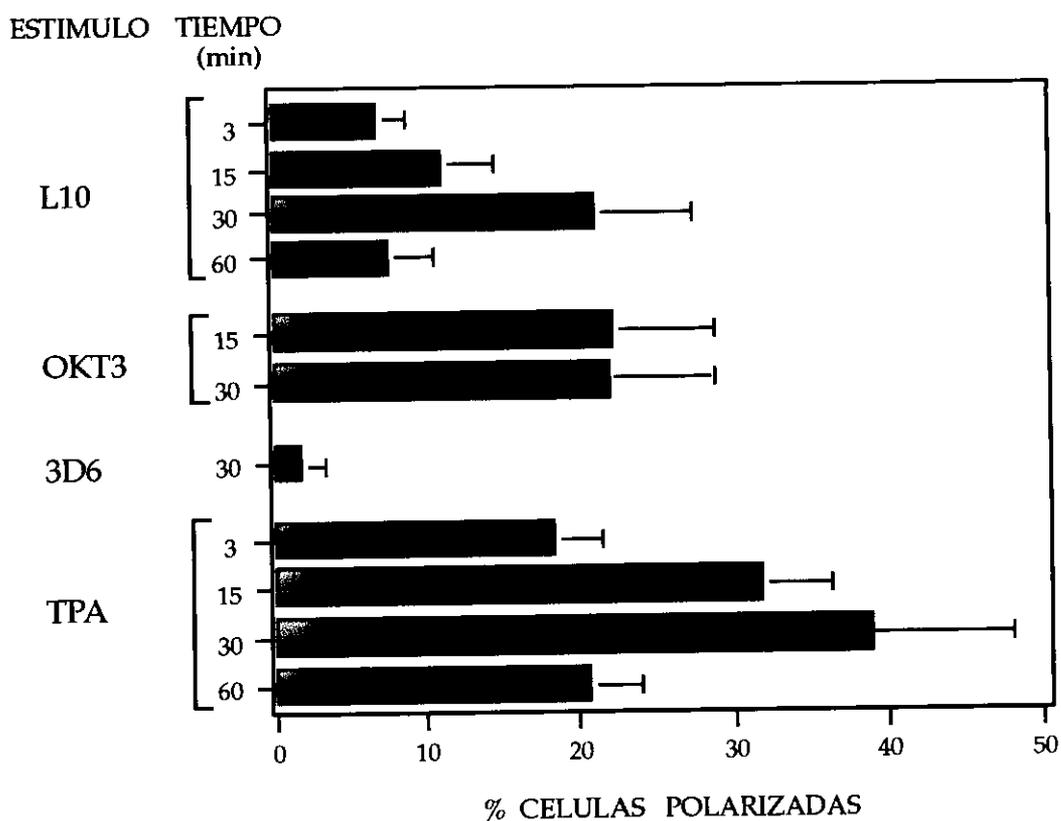


FIG. 7 ANALISIS CUANTITATIVO DE LA FORMACION DE UROPODOS MEDIADOS POR CD43, TPA Y TcR.

Se realizó la misma metodología que en la figura 5. Se muestran resultados del promedio de un conteo de 5 campos \pm SD de 2 experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que CD43 induce la formación de urópodos, que son considerados como estructuras celulares previas al movimiento celular, y que sus funciones como molécula señalizadora a través del reclutamiento de proteínas cinasas tales como FAK y PYK-2, juega un papel importante en la inducción de rearrreglos de citoesqueleto.

b) LA PRESENCIA DE Lck ES NECESARIA PARA LA FORMACION DE UROPODOS.

En linfocitos T, FAK y PYK-2 se asocian a Lck en respuesta a las señales del TcR (Berg and Ostengaard, 1997). La asociación de estas cinasas con cinasas de la familia Src induce una serie de eventos que conlleva a la remodelación del citoesqueleto (Hanks and Polte, 1997). Por otro lado, la estimulación a través del TcR induce la actividad de tirosina cinasa de Lck y la formación de urópodos (Parcey and Lewis, 1993). CD43 induce la fosforilación (Alvarado et al., 1995; Pedraza-Alva et al., 1996; Tkaczuk et al., 1999) y activación de Lck (Cruz-Muñoz M.E. IBT, comunicación personal). Con la finalidad de definir la participación de Lck en la formación de urópodos dependiente de CD43, realizamos experimentos de formación de urópodos con células Jurkat (CD3⁺, CD43⁺ y Lck⁺), y células JCAM, que es una línea celular derivada de células Jurkat, deficiente en Lck (CD3⁺, CD43⁺, Lck⁻; Goldsmith and Weiss, 1987).

Los resultados demostraron que en células Jurkat, a diferencia de linfocitos T normales aislados de sangre periférica, la formación de urópodos dependientes de CD43, incrementa con el tiempo, alcanzando un máximo a los 60 min. En cambio, en células JCAM, deficientes en Lck, no se observa un porcentaje representativo de células que formen urópodos durante la cinética de estimulación a través de CD43, TcR ó TPA (Fig. 8). Así mismo, en células Jurkat estimuladas por 30 min a través del TcR, el porcentaje de células con urópodos es ligeramente inferior al de las células estimuladas por el mismo tiempo con CD43. Esto sugiere que en células Jurkat, la formación de urópodos mediada por señales dependientes del TcR requiere de mayor tiempo que cuando las células se estimulan a través de CD43. En cambio, al estimular en estas mismas células con ésteres de forbol, 15 min son suficientes para alcanzar un porcentaje de formación de urópodos similar al que se observa a los 60 min de estimulación a través de CD43.

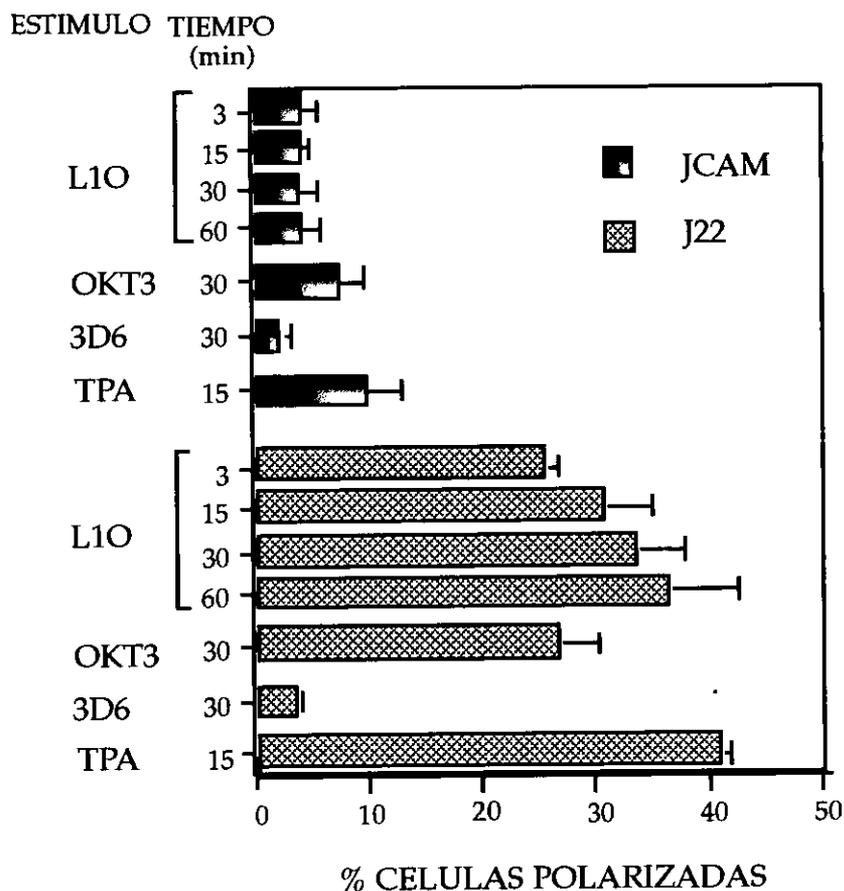


FIG. 8 LA FORMACION DE UROPODOS REQUIERE LA PARTICIPACION DE LA CINASA Lck.

Se evaluó la proporción de células J22 ó JCAM que formaron urópodos, después de ser estimuladas por distintos tiempos con L10 (anti-CD43), OKT3 (anti-TcR), 3D6 (anticuerpo irrelevante) ó TPA. Se muestra el promedio de cinco campos de cada tiempo \pm SD.

Estos datos indican que la presencia de Lck es necesaria para inducir la formación de urópodos mediada por CD43, TcR ó TPA. La asociación de las cinasas FAK y PYK-2 a Lck es un evento necesario en la formación de urópodos. En el caso del TcR, Lck se requiere para la inducción de estructuras secundarias de citoesqueleto (Parcey and Lewis, 1993). La estimulación a través del TcR induce la fosforilación de FAK y PYK-2 en tirosinas y su asociación con Lck (Berg and Ostengaard, 1997). Así mismo, los resultados obtenidos indican que la activación directa de PKC por TPA induce el reclutamiento de proteínas cinasas y adaptadoras implicadas en la reorganización de citoesqueleto en un tiempo más corto que el observado después de la estimulación con CD43 ó el TcR.

DISCUSION

CD43 es una molécula muy abundante en la superficie de las células linfoides. En función del número de moléculas presentes y de su gran tamaño, es posible pensar que la interacción de CD43 con su(s) ligando(s) sea uno de los primeros fenómenos que ocurran durante el contacto que se establece entre el linfocito, el ambiente que lo rodea, y/o la célula blanco. En la actualidad se desconoce cual es la función exacta de las distintas isoformas de ésta molécula, las cuales, como ya se mencionó en la introducción, difieren en su grado de glicosilación. El hecho que distintos anticuerpos monoclonales reconozcan epítopes distintos de CD43, sugiere que aún dentro de las dos isoformas hay variantes. El problema es aún más complicado si se considera que en una misma célula se expresan simultáneamente varias isoformas y que, la abundancia relativa de cada una de ellas es variable dependiendo del estado de activación de la célula linfocitaria. Las moléculas CD43 participan en numerosos fenómenos biológicos como son: tráfico linfocitario, adhesión celular y activación celular (Rosenstein et al., 1991; Park et al., 1991; Stöckl et al., 1996). Para realizar esas diferentes funciones, CD43 genera toda una gama de señales a través de su dominio intracelular, independientemente de las señales generadas por el TcR u otras moléculas co-receptoras (Chatila and Raif, 1988; Pedraza-Alva et al., 1996, 1998).

En este trabajo, estudiamos particularmente el papel de CD43 en la reorganización del citoesqueleto de actina. Para ello, mimetizamos la interacción de CD43 con alguno de sus ligandos por medio del anticuerpo monoclonal L10, específico para CD43. Este anticuerpo tiene la peculiaridad de ser el único anticuerpo que reconoce un epítope proteico en CD43, a diferencia de los otros anticuerpos dirigidos en contra de esta molécula, los cuales reconocen sólo epítopes glicosilados.

En la primera parte del trabajo se evaluó el papel de CD43 en la remodelación del citoesqueleto de actina en un sistema ectópico de fibroblastos de ratón, en los que se expresó CD43wt ó las mutantes de la misma (Δ PRO ó Δ IC). La expresión de CD43 wt en células 3T3-NIH sobre-indujo la formación de estructuras secundarias del citoesqueleto de actina (lamelopodios, fibras de estrés y filopodios) que se encuentran normalmente en un fibroblasto (Fig. 3). Al eliminar la secuencia rica en prolinas que comprende los aas 356-380 del carboxilo terminal de CD43 (mutante Δ PRO) los fibroblastos perdieron la capacidad de desarrollar algunas estructuras secundarias, como fibras de estrés y lamelopodios. Así mismo, cuando se transfectaron fibroblastos con la construcción que carece

de la región intracitoplásmica de CD43 (Δ IC), los fibroblastos perdieron por completo la capacidad de generar estructuras secundarias del citoesqueleto de actina. Estos datos indican que, en fibroblastos, para que CD43 induzca la formación de lamelopodios y fibras de estrés, se requiere de la presencia de la región rica en prolinas de CD43, y que esta secuencia puede ser importante para inducir una serie de señales intracelulares que conducen hacia la polimerización de actina y la formación de estructuras secundarias del citoesqueleto.

El hecho de no observar las estructuras secundarias lamelopodios, filopodios ó fibras de estrés en los fibroblastos que expresan la mutante de CD43 donde se eliminó la región IC de CD43, indica que se requiere de esta secuencia, necesaria para la interacción con diferentes proteínas intracelulares. Ezrina y Moesina son proteínas de unión a citoesqueleto que se asocian a los primeros 98 aas de la región IC de CD43 (Yonemura et al, 1993), su función en la formación de microvellosidades y otras estructuras de citoesqueleto, indica que participan en la vía de señalización de CD43 hacia citoesqueleto.

El gran tamaño y la forma del cuerpo celular de los fibroblastos que expresan CD43 wt sugiere la sobreactivación de GTPasas pequeñas, las cuales juegan un papel muy importante en la formación de las estructuras secundarias del citoesqueleto de actina, tales como filopodios, lamelopodios o fibras de estrés. La formación de fibras de estrés es mediada por la activación de la GTPasa Rho, inducida por ácido fosfatídico (Ridley y Hall, 1992). La activación de la GTPasa Rac induce el ensamble de fibras de actina para generar lamelopodios y "ruffles" (Ridley et al, 1992). La formación de filopodios resulta de la activación de la GTPasa CDC42 (Hall, 1998), la cual interacciona con diferentes proteínas implicadas en remodelación de citoesqueleto, como la adaptadora WASP (Derry et al., 1994; Gallego et al., 1997; Symons et al., 1996). Mutaciones en esta última causan el síndrome de inmunodeficiencia de Wiscott Aldrich, el cual se caracteriza, entre otras cosas, por expresar formas aberrantes de CD43 (Remold-O'Donnell et al., 1991; Rosenstein et al., 1993).

Interesantemente, los linfocitos aislados de pacientes afectados con éste síndrome carecen de filopodios y microvellosidades. Es probable que en la vía de señalización hacia citoesqueleto mediada por CD43 participen diferentes GTPasas como CDC42, Rac y Rho, así como proteínas de citoesqueleto como WASP, además de la proteína de adhesiones focales FAK, por lo que será necesario investigar si se encuentra activa la GTPasa CDC42 ó alguna otra, en fibroblastos de ratón que expresan las diferentes formas de CD43.

Cabe recalcar que los fibroblastos transfectados con CD43 wt tienen un tamaño celular muy grande (Tabla 2, Fig. 3) y se dividen lentamente a diferencia de las células transfectadas con el plásmido pFneo, ó las mutantes de CD43 (datos no mostrados). El gran tamaño de las células NIH-3T3 CD43 wt sugiere que el proceso de división celular está alterado y, eventualmente, el proceso de crecimiento celular. Existen evidencias de la participación en el crecimiento celular de la cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K1), cuya función es incrementar la traducción de mRNAs que codifican para proteínas ribosomales (Montagne et al., 1999). La falta de S6K1 en *Drosophila* induce una disminución en el tamaño celular y no en la división celular (Leevers, 1999). Es posible que la expresión de CD43 pudiera inducir la sobreexpresión de la cinasa S6K1, lo cual explicaría el gran tamaño celular que se observa en dichas células si se compara con los fibroblastos mutantes ó con los transfectados con pFneo. Interesantemente, la cinasa PI3K se encuentra arriba en la vía de señalización de la cinasa S6K1, cabe recordar que PI3K se asocia a CD43, probablemente a través del dominio SH3 de PI3K y la secuencia rica en prolinas de CD43 (Oceguera, 1998).

Por otra parte, con la finalidad de investigar la activación de proteínas cinasas involucradas en la remodelación del citoesqueleto y su posible papel en la vía de señalización de CD43, analizamos a la cinasa FAK, quien participa en distintas respuestas celulares que resultan en cambios de la morfología celular, migración, proliferación y diferenciación (Hanks and Polte, 1997). Como una medida del grado de activación de FAK, evaluamos su estado de fosforilación en tirosinas, en fibroblastos NIH-3T3 que expresan las diferentes mutantes de CD43. Para ello, se efectuaron ensayos de cinasa *in vitro* (IVK) a apartir de inmunoprecipitados de FAK de los lisados celulares de fibroblastos pFneo, CD43wt, PRO ó Δ IC. Los ensayos se llevaron a cabo bajo dos condiciones: los lisados celulares inmunoprecipitados en presencia ó ausencia de ATP y Mg^{++} . En el primer caso, debido a la ausencia de grupos fosfatos disponibles así como de iones Mg^{++} , se evaluó el grado de fosforilación basal de la cinasa FAK. En el segundo caso, donde se agregaron ATP y Mg^{++} a los inmunoprecipitados de FAK, se implementaron las condiciones para evaluar el incremento en la inducción de la autofosforilación y por ende de la actividad enzimática de FAK y/o otras cinasas asociadas a la misma.

Si bien FAK se encuentra constitutivamente "activa" en fibroblastos NIH-3T3, independientemente de la expresión de CD43 ó las mutantes de la misma (Fig. 4, panel a, carriles 1-4), en fibroblastos transfectados con

CD43wt, en presencia de ATP y Mg^{++} , se observa un cambio en la movilidad electroforética de FAK (Fig. 4 a, carril 6) y un incremento en la fosforilación de esta cinasa (alrededor del 20%, datos densitométricos no mostrados). Este aumento en el grado de fosforilación en tirosinas de FAK no se observa en fibroblastos que expresan las formas truncadas de CD43, (Δ PRO ó Δ IC; Fig. 4 a, carriles 7 y 8), lo que sugiere que los 25 aas del extremo carboxilo terminal de CD43 son necesarios para inducir señales intracelulares que promueven la fosforilación de otros residuos de tirosinas en FAK y que culminan en rearrreglos de citoesqueleto. Esto indica que la región IC de CD43 y particularmente la secuencia rica en prolinas de CD43 son necesarias para inducir el estado de hiperfosforilación de FAK.

CD43 no tiene actividad cinasa *per se*, pero, a través de su región rica en prolinas, recluta a la cinasa Fyn (Pedraza-Alva et al, 1996) e induce la actividad de cinasa de Lck (Cruz-Muñoz M. E., IBT, comunicación personal). Cabe la posibilidad que alguna de estas cinasas induzca el estado de hiperfosforilación de FAK resultante de las señales mediadas por CD43 (Fig. 4), como ya se ha reportado sobre el papel de cinasas de la familia de Src en la inducción de la fosforilación y activación de FAK (Calalb et al., 1995). El no observar este fenómeno en los fibroblastos Δ PRO podría deberse a la falta de reclutamiento de cinasas de la misma familia, con la subsecuente falta de activación de FAK. Sin embargo, estos resultados sugieren que la expresión de CD43 wt en fibroblastos NIH-3T3 promueve la interacción de FAK con proteínas cinasas y adaptadoras, y que estas interacciones, a su vez, generan señales intracelulares adicionales que dan lugar a rearrreglos de citoesqueleto.

Al igual que en fibroblastos transfectados con CD43, evaluamos la fosforilación en tirosinas de FAK y PYK-2 en linfocitos T humanos de sangre periférica estimulados por medio de anticuerpos anti-CD43 inmovilizados sobre placas de plástico. En linfocitos T, CD43, además de inducir la fosforilación en tirosinas de FAK, indujo la fosforilación en tirosinas de PYK-2, observándose el máximo efecto a los 30 min, en ambos casos, además del cambio en la movilidad electroforética de FAK (Fig. 5) La máxima fosforilación en tirosinas de FAK y PYK-2 coincide con la inducción de urópodos en respuesta a las señales de CD43 (Fig. 6) .

Los resultados que presentamos en este trabajo sugieren claramente que CD43 está directamente implicada en rearrreglos del citoesqueleto, tanto en fibroblastos que expresan ectópicamente a CD43 como en linfocitos T normales, asilados de donadores del banco de sangre. FAK está

involucrada en la formación de adhesiones focales y en remodelación de citoesqueleto. En linfocitos en migración, FAK fosforilada en tirosinas se localiza en el frente celular (leading edge; Entschladen et al., 1997). El hecho de que FAK se fosforile en tirosinas, sugiere que participa en la vía de señalización mediada por CD43. Nuestros datos son consistentes con datos ya publicados anteriormente, donde se describe que en células linfoblásticas estimuladas a través de integrinas, hay una reorganización del citoesqueleto de actina que culmina con la formación de urópodos, donde se concentra CD43 (Serrador et al, 1998, Rodriguez-Fernandez et al, 1999). Se ha demostrado que FAK puede fosforilarse cuando la GTPasa Rho se encuentra activa, ya que la fosforilación de FAK se inhibe por la exoenzima C3 de *Clostridium botulinum* que ADP-ribosila e inactiva específicamente a Rho (Murakami et al., 1999). Hasta ahora no se ha reportado que CD43 induzca la activación de dicha GTPasa, pero CD43 induce la fosforilación en tirosinas de Vav (Pedraza-Alva et al., 1998), el cual es un factor intercambiador de guaninas que activa a Rho y Rac (Schuebel et al., 1998). Por lo tanto, a través de CD43 se podría inducir, indirectamente, la activación de Rho y por ende, la posterior fosforilación de FAK para que se inicien señales hacia citoesqueleto (experimentos en curso, Fig. 9).

En células linfoides, PYK-2 es una PTK muy abundante y su expresión se ha detectado en monocitos, linfocitos T y B, así como en células NK. FAK y PYK-2 carecen de dominios SH2 ó SH3, pero presentan varios sitios de unión para proteínas señalizadoras que contengan dominios SH2 ó SH3 (tirosinas fosforilables y secuencias ricas en prolinas, respectivamente). PYK-2 es rápidamente fosforilada en respuesta a estímulos que elevan la concentración de Ca^{++} intracelular ó activan PKC. Las señales generadas a través de CD43 podrían reclutar directamente a PYK-2, a través de PKC y Ca^{++} intracelular (Wong et al, 1990) ó bien a través de Fyn (Pedraza-Alva et al, 1996). Esta cinasa fosforila selectivamente a PYK-2 en linfocitos T, y esta fosforilación no depende de Ca^{++} intracelular (Qian et al., 1997). El hecho que Fyn se asocie directamente con la porción intracitoplásmica de CD43 constituye una hipótesis atractiva para la fosforilación y activación de PYK-2 mediada por CD43 y la subsecuente reorganización del citoesqueleto (Fig. 9). Cabe señalar que la fosforilación en tirosinas de PYK-2 también puede mediar por ácido lisofosfatídico (Dikic et al., 1996), el cual, a su vez, induce la activación de la GTPasa Rho, implicada en la formación de fibras de estrés (Ridley and Hall, 1992).

A continuación, evaluamos la participación CD43 en la formación de urópodos y la relocalización de CD43 hacia estas estructuras. Las señales específicas de CD43 indujeron la formación de urópodos y la localización

de CD43 y actina hacia estas estructuras celulares. Se ha reportado que en los urópodos hay fibras de actina-F ordenadas en paralelo, proteínas de unión a actina y a membrana (proteínas ERM) y, moléculas co-receptoras como CD43, ICAM-1 y PSGL-1 (Serrador et al., 1998; Sanchez-Madrid and del Pozo, 1999). Los datos que presentamos sobre la formación de urópodos (Fig. 6) demostraron que la estimulación a través de CD43 fue capaz de inducir estas estructuras secundarias y la redistribución de CD43 y actina polimerizada en las mismas, independientemente de las señales generadas por integrinas. Se observó la co-localización de la mayoría de las moléculas de CD43 y actina principalmente hacia el urópodo, aunque todavía se encontraron moléculas de CD43 en la periferia celular. Es posible que las señales generadas a través de CD43 no sean suficientes para redistribuir todas las moléculas hacia el urópodo y que para ello se requiera de señales adicionales generadas eventualmente por integrinas; ya que en neutrófilos se ha reportado la redistribución de CD43 hacia el urópodo, en respuesta a señales dependientes de integrinas (Sánchez-Mateos et al, 1995; Serrador et al, 1997). También se podría pensar que la migración hacia el urópodo es característica de algunas isoformas de CD43, pero no de todas.

Al estimular a través del TcR ó con ésteres de forbol se observó básicamente el mismo fenómeno que cuando se activan las células a través de CD43 (Fig. 7). Hubo una rápida formación de urópodos, y en todos los casos, CD43 se relocaliza hacia el urópodo de la célula. Es interesante resaltar que, como las integrinas, el TcR también indujo la relocalización de CD43 hacia el urópodo (datos no mostrados). La aparente redundancia en las funciones de distintos receptores linfocitarios (CD43, TcR, integrinas...) indica que la polarización celular es un mecanismo muy importante para las respuestas celulares linfocitarias como quimiotaxis, infección, etc. En estos procesos es probable que la relocalización de CD43 hacia el urópodo permita el primer contacto con la célula blanco ó durante la extravasación, el paso a través del endotelio (Ratner et al., 1997).

Estos datos confirman la participación de CD43 en la inducción de rearrreglos del citoesqueleto, y que la estimulación en linfocitos humanos de sangre periférica a través de CD43 media la polarización celular y su redistribución hacia la estructura posterior ó urópodo.

En la vía de señalización de CD43 se han descrito diferentes proteínas que pueden participar en la remodelación del citoesqueleto, como es el caso de las cinasas Lck, PI3-K, Vav, Shc, ezrina y moesina, etc (Bretscher, 1989; Parcey and Lewis, 1993; Yonemura et al., 1993; Sánchez-Mateos et al., 1995; Thomas et al., 1995; Rodriguez-Viciano 1997; Pedraza-Alva et al., 1996, 1998; Ocegüera, 1998; Fischer et al., 1998; Tkaczuk et al., 1999; Fig. 9).

La estimulación a través de CD43 induce la activación y la asociación a la cinasa PI3-K (Oceguera, 1998). La subunidad p85 de esta cinasa se asocia a FAK y se transloca al citoesqueleto (Guinebault et al., 1995). CD43 induce la fosforilación en tirosinas de la proteína intercambiadora de guanina Vav; así como de la proteína adaptadora Shc (Pedraza-Alva et al., 1998). Vav es indispensable para procesos de reorganización de citoesqueleto como formación de parches y casquetes dependientes de la polimerización de actina (Fischer et al., 1998). Por su parte, Shc se asocia a actina-F después de la estimulación a través del factor de crecimiento nervioso (Thomas et al., 1995). Moesina, la cual pertenece a la familia ERMs, se une a membrana y a actina, y se asocia a CD43 a través de una secuencia de aprox. 20 aminoácidos cargados positivamente (Yonemura et al 1998). Moesina, al igual que ezrina y radixina, se concentra en las microvellosidades, en donde se concentra CD43, así como en los "ruffles" membranales y sitios de adhesión celular (Tsukita et al, 1997).

CD43 induce la fosforilación en tirosinas de Lck (Alvarado et al, 1995; Tkaczuk et al, 1999) y su activación (Cruz-Muñoz M.E., IBT, comunicación personal). Al estimular a través del TcR, se induce la fosforilación y activación de Lck y la polimerización de actina. Al tratar a las células T con citocalasina D (inhibidor de la polimerización de actina) se inhibe la actividad de Lck, por lo que se sugiere que esta cinasa juega un papel importante en la polimerización de actina (Parcey et al, 1993).

Investigamos la participación de Lck en la inducción de urópodos mediada a través de CD43. Para ello utilizamos dos líneas celulares de linfocitos T, células Jurkat y una línea derivada de esta, pero deficiente en Lck (JCAM), y comparamos la inducción de la formación de polarización celular y de urópodos en ambas líneas celulares en respuesta a la estimulación con anticuerpos anti-CD43. Las células deficientes en Lck fueron incapaces de formar urópodos, independientemente del estímulo (por lo menos a los tiempos estudiados). En cambio las células Jurkat, que expresan normalmente Lck, formaron urópodos al ser activadas a través de CD43, de manera tiempo-dependiente (Fig. 8). Cabe señalar que en estas células, el tiempo máximo de formación de urópodos mediado por CD43 se presenta media hora después del tiempo observado en linfocitos T de sangre periférica; además el número de urópodos es mayor en esta línea celular comparado con linfocitos T normales (Fig 7 y 8). Estas diferencias podrían deberse a una regulación distinta de las señales en linfocitos T normales comparados con las células tumorales.

Los datos anteriores demuestran que se requiere de la cinasa Lck en la vía de señalización hacia la remodelación de citoesqueleto y la polarización

celular mediadas por CD43, y que otras cinasas de la familia Src no son capaces de sustituirla para inducir la polarización celular.

Lck es una cinasa muy importante en diferentes procesos celulares de linfocitos T, como proliferación y producción de IL-2 (Siefken et al., 1998; Choi et al., 1998). Hasta ahora no se ha demostrado que la estimulación con anticuerpos anti-CD43 induzca la fosforilación de proteínas de citoesqueleto a través de Lck; pero se sabe que Lck esta involucrada en la fosforilación en tirosinas de Ezrina (Thuillier et al., 1994) y que, cuando se estimulan células de carcinomas a través del factor de crecimiento epidérmico (EGF), ezrina se fosforila en dos residuos de tirosinas y se redistribuye hacia las microvellosidades (Bretscher, 1989).

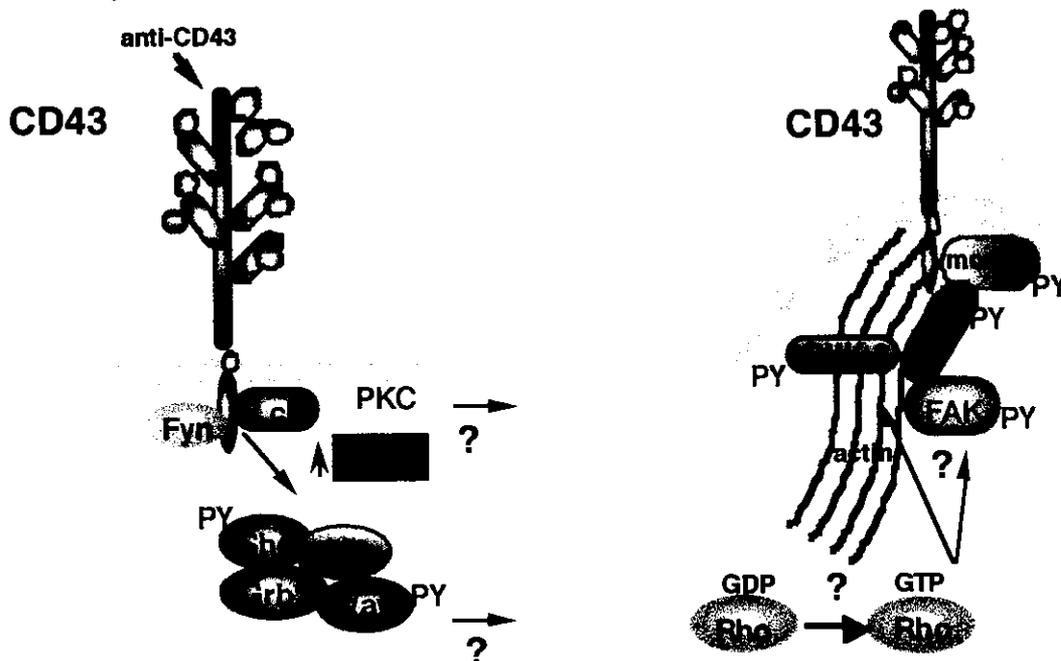


FIG. 9 MODELO QUE MUESTRA EL PAPEL DE FAK Y PYK-2 EN LAS SEÑALES MEDIADAS POR CD43.

La estimulación a través de CD43 induce la activación y ó fosforilación de diferentes proteínas adaptadoras y cinasas (Fyn, Lck, PYK-2, FAK, Vav, Shc, etc) que juegan un papel importante en la remodelación del citoesqueleto. Probablemente CD43 medie señales intracelulares donde participen estas moléculas para la formación de urópodos (ver texto para detalles).

Es probable que, en la vía de CD43, Lck induzca la activación de diferentes proteínas de unión a citoesqueleto, como ezrina, ó proteínas cinasa que regulan la arquitectura del mismo (Fig. 9).

El conjunto de datos experimentales de éste proyecto sobre la participación de CD43 en procesos de remodelación del citoesqueleto de actina nos permitió demostrar una de las funciones que se proponía para CD43. El entendimiento de las vías de señalización mediadas por CD43 nos ayudarán a esclarecer sus funciones linfocitarias y su intervención en

la respuesta inmune. De una manera general, el conocimiento de los procesos de activación de las células linfoides nos permitirá implementar y disponer de nuevas opciones terapéuticas en la lucha contra las enfermedades.

CONCLUSIONES

- CD43 es una proteína que induce cambios en la morfología celular cuando se expresa ectópicamente en fibroblastos de ratón.
- La secuencia rica en prolinas de CD43 juega un papel importante en las modificaciones morfológicas que involucran reorganización de actina.
- La expresión ectópica de CD43 induce la fosforilación en tirosinas de la proteína FAK; es probable que éste hecho se relacione con las modificaciones en rearrreglos de citoesqueleto mediados por CD43.
- La molécula completa de CD43 induce un cambio en movilidad electroforética en FAK, para ello se requiere de la presencia de la región IC y de la región rica en prolinas de CD43.
- En células que expresan la molécula completa CD43, la estimulación por medio de L10, fosforila y activa a CD43 (datos no mostrados) y a su vez, induce fuertemente la fosforilación en tirosinas de FAK a diferencia de la fosforilación basal que se observa con 3D6.
- En linfocitos T, CD43 induce la fosforilación de FAK y PYK-2 en tirosinas en un tiempo máximo de 30 min.
- La máxima formación de urópodos mediada por CD43 se observa a los 30 min y para este fenómeno se requiere de Lck.

PERSPECTIVAS

- Estudiar la localización de FAK y de PYK-2 en el urópodo formado a través de la estimulación con anticuerpos anti-CD43 .
- Analizar la participación de la cinasa Lck en la inducción de la activación de FAK y PYK-2.
- Estudiar el papel de las GTPasas de la familia Rho en las modificaciones del citoesqueleto mediadas por CD43.
- Identificar proteínas intracelulares que participen en las modificaciones de citoesqueleto mediadas por la vía de señalización de CD43, posible papel de Vav, Cbl, Shc, 14.3.3.

BIBLIOGRAFIA

- Abramson J. S. and Hudnor H. R. (1995)** Role of the sialophorin (CD43) receptor in mediating influenza A virus induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction. *Blood* 85(6):1615-9.
- Alberts B.; Bray D.; Lewis J.; Raff M.; Roberts K.; Watson J. (1994):** Molecular Biology of the Cell. 3rd Ed., Garland., New York. Chap. 10,12 and 13.
- Alvarado M.; Klassen C.; Cerny J.; Horejsi V.; Schmidt R.E. (1995)** MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation. *Eur. J. Immunol.* 25(4):1051-5.
- Avraham S.; London R.; Fu Y.; Ota S.; Hiregowdara D.; Li J.; Jiang S.; Pastor L.M.; White R.A.; Groopman J.E.; Avraham H. (1995)** Identification and characterization of a novel related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) from megakaryocytes and brain. *J. Biol. Chem.* 270:27742.
- Axelsson B.; Youseffi-Etemad R.; Hammarstrom S.; 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(9):2912-7.
- Baum L.G.; Pang M.; Perillo N.L.; Wu T.; Delegeane A.; Vittenbogaart C.H.; Fukuda M. and Scilhaner J.J. (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.
- Berg N.N. and Ostergaard H.L. (1997)** T cell receptor engagement induces tyrosine phosphorylation of FAK and Pyk2 and their association with Lck. *J. Immunol.* 159:1753-57.
- Bierer B.E.; Sleckman B.P.; Ratnofsky S.E.; Burakoff S.J. (1989)** The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Annu Rev Immunol* 7:579-99.
- Bradford M.M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bretscher A. (1989)** Rapid phosphorylation and reorganization of ezrin and spectrin accompany morphological changes induced in A-431 cells by epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* 108:921-930.
- Brown M.C.; Perrota J.A; Turner C.E. (1996)** Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J. Cell. Biol.* 135:1109-1123.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Burgaya F.; Toutant M. Studler J.M; Costa A.; Le Bert M. Gelman M.; Girault J.A.** (1997) Alternatively spliced focal adhesion kinase in rat brain with increased autophosphorylation activity. *J. Biol. Chem.* 272 (45): 28720-28725.
- Calalb M.B.; Polte T.R.; Hanks S.K.** (1995) Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol. Cell. Biol.* 15:954-63.
- Cantley L.C. and Songyang Z.** (1994) Specificity in recognition of phosphopeptides by Src-homology 2 domains. *J. Cell. Sci. (Suppl.)* 18:121-129.
- Carlier M.F.** (1991) Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chem.* 266:1-4.
- Carlsson S. R.; Fukuda M.** (1986): Isolation and characterization of leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes. *J. Biol. Chem.* 27: 12779-12786
- Cary R.B.; Klymkowsky M.W.** (1992) Finding filaments function. *Curr. Biol.* 2:43-45.
- Chatila A. T. and Raif S. G.** (1988): Phosphorylation of T cell membrane proteins by activators of protein kinase C. *J. Immunol.* 140: 4308-4314.
- Chen H.C. and Guan J.L.** (1994). Stimulation of phosphatidylinositol 3'-kinase association with focal adhesion kinase by platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* 269(49):31229-33.
- Chen H.C.; Appeddu P.A.; Parsons J.T.; Hildebrand J.D.; Schaller M.D.; Guan J.L.** (1995) Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J. Biol. Chem.* 270(28):16995-99.
- Choi S.H.; Chung E.J.; Whang D.Y.; Lee S.S.; Jang Y.S.; Kim C.W.** (1998) Alteration of signal-transducing molecules in tumor-infiltrating lymphocytes and peripheral blood T lymphocytes from human colorectal carcinoma patients. *J. Immunol.* 161(4):1645-51.
- Cyster J.; Chamorro S.; Killeen N.; Williams A. F.** (1990) Protein sequence and gene structure for mouse leukosialin (CD43), a T lymphocyte mucin without introns in the coding sequence. *Eur. J. Immunol.* 20: 875-881.
- Cyster, J. G. and Williams A. F.** (1992): The importance of cross-linking in the homotypic aggregation of lymphocytes induced by anti-leukosialin (CD43) antibodies. *Eur. J. Immunol.* 22: 2565.
- Derry J.J.; Ochs H.D.; Francke U.** (1994) Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 78:635-644.

- Dikic I.; Tokiwa G.; Lev S.; Courtneidge S.A.; Schlessinger J.** (1996) A role for PYK-2 and Src in linking G/protein coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383:547-550.
- Dustin M.L. and Springer T.A.** (1989) T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341(6243):619-24.
- Entschladen F.; Niggemann B.; Zanker K.S.; Friedl P.** (1997) Differential requirement of protein tyrosine kinases and protein kinase C in the regulation of T cell locomotion in three-dimensional collagen matrices. *J. Immunol.* 159(7):3203-10.
- Fischer K.D.; Kong Y.Y.; Nishina H.; Tedford K.; Marengere L.E.; Kozieradzki I.; Sasaki T.; Starr M.; Chan G.; Gardener S.; Nghiem M.P.; Bouchard D.; Barbacid M.; Bernstein A.; Penninger J.M.** (1998) Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr. Biol.* 8(10):554-62.
- Gallego M.D.; Santamaria M.; Peña J. Molina I. J.** (1997) Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott-Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation. *Blood* 90(8):3089-3097.
- Gates R.E.; King L.E. Jr.; Hanks S.K. Nanney L.B.** (1994) Potential role for focal adhesion kinase in migrating and proliferating keratinocytes near epidermal wounds and in culture. *Cell. Growth. Differ.* 5:891-99
- Gelfand V.I.; Bershadsky A.D.** (1991) Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 7:93-116.
- Gepper T.D. and Lipsky P.E.** (1991) Association of various T cell-surface molecules with the cytoskeleton. Effect of cross-linking and activation. *J. Immunol.* 146(10):3298-3305.
- Gilmore A.P. and Romer L.H.** (1996) Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) signaling in focal adhesions decreases cell motility and proliferation. *Mol. Biol. Cell.* 7. 1209-1224.
- Gismondi A.; Bisogno L; Mainiero F.; Palmieri G.; Piccoli M.; Frati L; Santoni A.** (1997) Proline-rich tyrosine kinase-2 activation by beta 1 integrin fibronectin receptor cross-linking and association with paxillin in human natural killer cells. *J. Immunol.* 159(10):4729-36.
- Guinebault C.; Payrastra B.; Racaud-Sultan C.; Mazarguil H.; Breton M.; Mauco G.; Plantavid M.; Chap H.** (1995) Integrin-dependent translocation of phosphoinositide 3-kinase to the cytoskeleton of thrombin-activated platelets involves specific interactions of p85 alpha with actin filaments and focal adhesion kinase. *Cell. Biol.* 129(3):831-42.

- Goldsmith M.A.; Weiss A. (1987)** Isolation and characterization of a T-lymphocyte somatic mutant with altered signal transduction by the antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6879.
- Hall (1998)** Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: 509-513
- Hanks S.K.; Polte T.R. (1997)**: Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays* 19(2):137-145.
- Hahn M.C.; Merzin E.; Sato T.; Germain R.N.; Bierer B. E. (1993)**: The complete sequence of plasmids pFneo and pMH-Neo: convenient expression vectors for high-level expression of eukaryotic genes in hematopoietic cell lines. *Gene* 4:267-268.
- Harte M.T.; Hildebrand J.D.; Burnham M. R. and Bouton A.H. (1996)** p130^{Cas}, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. *J.Biol.Cell.* 271(23):13649-55.
- Hildebrand J.D.; Taylor J.M.; Parsons T. (1996)** An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Mol.Cell. Biol.* 16(6):3169-78.
- Hirao M.; Sato N.; Kondo T.; Yonemura S.; Monden M.; Sasaki T.; Takai T.; Tsukita S. (1996)** Regulation mechanism of ERM protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and rho-dependent signaling pathway. *J. Cell. Biol.* 135:37-52.
- Ilíc D., Furuta Y.; Kanazawa S.; Takeda N.; Sobue K.; Nakatsuji N.; Nomura S.; Fujimoto J.; Okada F.; Yamamoto T.; Aizawa S. (1995)** Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377, 539-544.
- Ilíc D.; Kanazawa S.; Furuta Y.; Yamamoto T.; Aizawa S. (1996)** Impairment of mobility in endodermal cells by FAK-deficiency. *Exp. Cell. Res.* 222, 298-303.
- Ilíc D.; Damsky C. H.; Yamamoto T. (1997)** Focal adhesion kinase: at the crossroads of signal transduction. *J. Cell. Sci.* 110, 401-407.
- Kabsch W. and Vanderkerckhove J. (1992)** Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21: 49-76.
- Keller H;U; Niggli V.; Zimmermann. A. (1991)** Diversity in motile responses of human neutrophil granulocytes: functional meaning and cytoskeletal basis. In *News aspects of human* Ed. W.H. Horl and P.J. Schollmeyer. Plenum Press, New York. pp 23-37.
- Kreis T.E. (1990)** Role of microtubules in the organisation of the Golgi apparatus. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 15:67-70.

Korn E.D.; Carrier M.F.; Pantaloni F. (1987) Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* 238:638-44.

Kozma R.; Amhed S.; Best L. (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts *Mol. Cell. Biol.* 15(4):1942-52.

Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature (Lond.)* 227:680-685.

Lawrence M.B., Springer T.A. (1991) Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates, distinction and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65:859-873.

Lee T.Y. and Gotlieb A.I. (1999) Early stages of endothelial wound repair: conversion of quiescent to migrating endothelial cells involves tyrosine phosphorylation and actin microfilament reorganization. *Cell. Tissue Res.* 297(3):435-450.

Lev S.; Moreno H.; Martinez R.; Canoll P.; Peles E.; Musacchio J.M.; Plowman G.D.; Rudy B.; Schlessinger J. (1995) Protein tyrosine kinase PYK-2 involved in Ca²⁺-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376(6543):737-45.

Leevers S.J. (1999) Perspectives: cell biology. All creatures great and small. *Science* 285(5436):2082-3.

Li J.; Avraham H.; Rogers R.A.; Raja S.; Avraham S. (1996) Characterization of RAFTK, a novel focal adhesion kinase, and its integrin-dependent phosphorylation and activation in megakaryocytes. *Blood* 88(2):417-428.

Lipsky B.P.; Beals C.R. Sraunton D.E. (1998) Leupaxillin is a novel LIM domain protein that forms a complex with PYK-2. *J. Biol. Chem.* 273(19):11709-11713.

Manjunath N. and Ardam B. (1995): CD43 regulates tyrosine phosphorylation of a 93-Kd protein in T lymphocytes. *Blood* 86:4194-4198.

Mentzer S.J.; Remold-O'Donnell E.; Crimmins M.A.V.; Bierer B.E.; Rosen F.S. and Burakoff S.J. (1987): Sialophorin, a surface sialoglycoprotein defective in the Wiskott-Aldrich syndrome, is involved in human T-lymphocyte proliferation. *J. Exp. Med.* 165:1383-1392.

Miller MD. and Krangel M.S. (1992) Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *CRC Crit. Rev. Immunol.* 12:17-46.

Montagne J.; Stewart M.J.; Stocker H.; Hafen E.; Kozma S.C.; Thomas G. (1999) Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size. *Science* 285(5436):2126-9.

- Murakami H.**; Iwashita T.; Asai N.; Iwata Y.; Narumiya S.; Takahashi M. (1999) Rho-dependent and -independent tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, paxillin and p130^{Cas} mediated by Ret kinase. *Oncogene* 18(11):1975-82.
- Nathan C.**; Xie Q.W.; Mecarelli-Hawlbachs L.; Jin W.W. (1993) Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43. *J. Cell. Biol.* 122:243-256
- Nobes C.D.** and Hall A. (1995) Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81(1):53-62.
- Nojima Y.**; Morino N.; Mimura T.; Hamasaki K.; Furuya H.; Sakai R.; Sato T.; Tachibana K.; Morimoto C.; Yazaki Y.; et al. (1995) Integrin-mediated cell adhesion promotes tyrosine phosphorylation of p130^{Cas}, a Src homology 3-containing molecule having multiple Src homology 2-binding motifs. *J. Biol Chem* 270 (25):15398-402 .
- Núñez-Cruz S.G.** (1997) CD43 una molécula de linfocitos T, estudio de su estructura y función. Tesis de licenciatura en biología. Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. Mex.
- Oceguera Y. F.** (1998) Vías de transducción de señales mediadas por CD43, una molécula co-receptora de células linfoides. Tesis de maestría en Cs. Bioquímicas. UNAM. Cuernavaca, Mor. Mex.
- Offringa R.** and Bierer B.E. (1993) Association of CD2 with tubulin. Evidence for a role of the cytoskeleton in T cell activation. *J. Biol. Chem.* 268(7):4979-4988.
- Owens L.V.** (1995) Overexpression of the focal adhesion kinase (p125^{FAK}) in invasive human tumors. *Cancer Res.* 55:2752-55.
- Pallant A.**; Eskenazi A.; Mattei M.G.; Fournier R.E.K.; Carlsson S. R.; Fukuda M. and Frelinger J.G. (1989) Characterization of cDNAs encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1328-1332.
- Parcey M.V.**; Lewis G.K. (1993) Actin polymerization and pseudopod reorganization accompany anti-CD3-induced growth arrest in Jurkat T Cells. *J. Immunol.* 151(4):1881-1893.
- 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.
- Parsons J.T.** (1996) Integrin mediated signaling-regulation by protein tyrosine kinases and small GTP binding proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8:146-152.

- Phatak P.D.; Packman C.H.; Lichman M.A. (1988):** Protein kinase C modulates actin conformation in human T lymphocytes. *J. Immunol.* 141:2929.
- Pedraza-Alva G.; Mérida L.B.; Burakoff S. J.; Rosenstein Y. (1996):** CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to fyn kinase. *J. Biol. Chem.* 44:27564-29568.
- Pedraza-Alva G.; Mérida L.B.; Burakoff S. J.; 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.* 44:27564-27568.
- Perillo N.L.; Pace K.E.; Seihamer J.J. Baum L.G. (1995)** Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378:736-738.
- Piller V.; Piller F.; Fukuda M. (1989):** Phosphorylation of the major leukocyte surface sialoglycoprotein, leukosialin, is increased by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J. Biol. Chem.* 31:18824-18831.
- Polte T.R. and Hanks S.K. (1995).** Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130^{Cas}. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(23):10678-82.
- Qian D.; Lev S.; van Oers N.S.; Dikic I.; Schlessinger J.; Weiss A. (1997)** Tyrosine phosphorylation of Pyk2 is selectively regulated by Fyn during TCR signaling. *J. Exp. Med.* 185(7):1253-9.
- Ratner S.; Sherrod W.S.; Lichlyter D. (1997)** Microtubule retraction into the uropod and its role in T cell polarization and motility. *J. Immunol.* 159:1063-1067.
- Remold-O'Donnell E.; Davis III A.; Kenney D.; Ramakrishnan B.K.; Rosen F.S. (1986)** Purification and chemical composition of gpL115, human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Biol. Chem.* 16: 7526-7530.
- Remold-O'Donnell E.; Kenney D.; Rosen F. (1987)** Biosynthesis of human sialophorins and analysis of the polypeptide core. *Biochemistry*, 26: 3908-3913.
- Remold-O'Donnell E.; Rosen F. (1991)** Sialophorin (CD43) and the Wiskott-Aldrich syndrome. *Immunodef. Rev.* 2:151-161.
- Ridley A.J. and Hall A. (1992)** The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesion and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70:389-399.
- Ridley A.J.; Paterson H.F.; Johnston C.L.; Diekmann D.; Hall A. (1992)** The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70(3):401-10.

Rodriguez-Viciano P.; Warne P.H.; Khwaja A.; Marte B.M.; Pappin D.; Das P.; Waterfield M.D.; Ridley A.; Downward J. (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* 89(3):457-67.

Rodriguez-Fernandez J.L.; Gomez M.; Luque A.; Hogg N.; Sanchez-Madrid F.; Cabañas C. (1999) The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes. *Mol. Biol. Cell.* 10(6):1891-907.

Rosenstein Y.; Park J.K.; Hahn W.C.; Rosen F.S.; Bierer B.E.; Burakoff S.J. (1991) CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* 354:233-235.

Rosenstein Y.; Park J.K.; Bierer B.E. and Burakoff S. (1993): New concepts in immunodeficiency diseases. Gupta S. and Griscelli C. Eds., John Wiley and Sons Ltd, England, Chap. 12. pag. 249-267.

Rosenstein Y.; Santana A.; Pedraza-Alva G. (1999) CD43, a molecule with multiple functions. *Immunol. Res.* 20:1-11.

Rot A. (1992) Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol. Today* 13:291-294.

Rozengurt E. (1995) Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth factors and oncogenes. *Cancer Surveys* 24:81-96.

Ryser J.E.; Rungger-Brandle; Chaponnier C.; Gabianni G.; Vasalli P. (1982) The area of attachment of cytolytic T lymphocytes to their target cells shows high motility and polarization of actin, but no myosin. *J. Immunol.* 128:1159.

Sabe H.; Hata A.; Okada M.; Nakagawa H.; Hanafusa H. (1994) Analysis of the binding of the Src homology domain of Csk to tyrosine-phosphorylated proteins in the suppression and mitotic activation of c-Src. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91:3984-3988.

Sánchez-Madrid F. and del Pozo M.A. (1999) Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 18(3):501-511.

Sánchez-Mateos P.; Campanero M.R.; del Pozo M.A.; 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.

Schaller M.D.; Hildebrand J.D.; Shannon J.D.; Fox J.W.; Vines R.R. and Parsons J.T. (1994). Autophosphorylation of focal adhesion kinase pp125^{FAK}, directs SH2-dependent binding of pp60^{Src}. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1680-1688.

- Schaller M.D.; Otey C.A.; Hildebrand J.D.; Parsons J.T. (1995)** Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J. Cell. Biol.* 130(5):1181-7.
- Schlaepfer D.D.; Hanks S.K.; Hunter T.; Van der Geer P. (1996)** Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* 16(10):5623-33.
- Schuebel K.E.; Movilla N.; Rosa J.L.; Bustelo X.R. (1998)** Phosphorylation-dependent and constitutive activation of Rho proteins by wild-type and oncogenic Vav-2. *EMBO J.* 16;17(22):6608-21.
- Schwartz M.A.; Schaller M.D.; Ginsberg M.H. (1995)** Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 11:549-99
- Serrador J.M.; Nieto M.; Alonso-Lebrero J.L.; del Pozo M.A.; Calvo J.; Furthmayr H.; Schwartz-Albeiz R.; Lozano F.; Gonzalez-Amaro R. Sanchez-Mateos P.; Sanchez-Madrid F. (1998)** CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* 91(12):1-14.
- Seveau S.; Lopez S.; Lesavre P.; Guichard J.; Cramer E.; 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
- Shelley S.C.; Remold-O'Donnell E.; Davis III A.E.; Bruns G. A. P.; Rosen F.S.; Carroll M. C.; Whitehead A.S. (1989)** Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:2819-2823.
- Siefken R.; Klein-Hessling S.; Serfling E.; Kurrle R.; Schwinger R. (1998)** A CD28-associated signaling pathway leading to cytokine gene transcription and T cell proliferation without TCR engagement. *Cancer Immunol.* 45(6):299-305.
- Silverman L.B.; Wong R.C.K.; Remold-O'Donnell E.; Vercelli D.; Sancho J.; Terhorst C.; Rosen F. S.; Geha R.; Chatila T. (1989)**: Mechanism of molecular cell activation by an anti-CD43 (sialophorin) agonistic antibody. *J. Immun.* 142:4194-4200.
- Stöckl J.; Majdic O.; Kohl P.; Pickl F. W; Manzel E. J.; Knapp W. (1996)** Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class 1 molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation. *J. Exp. Med.* 184:1769-1779.
- Songyang Z.; Shoelson S.E.; Chaudhuri M.; Gish G.; Pawson T.; et al (1993)** SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72:767-78.

- Springer T.A** (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emmigration: The multistep paradigm. *Cell* 76, 301-14.
- Steinert P.M.** and Roop D.R. (1988) Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem.* 57:593-625.
- Symons M.; Derry J. M.; Karlak B.; Jiang S.; et al** (1996) Wiskott-Aldrich Syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 84: 723-734.
- Tachibana K.; Sato T.; D'Avirro N.; Morimoto C.** (1995). Direct association of pp125^{FAK} with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125^{FAK}. *J. Exp. Med.* 182(4):1089-99.
- Tada J. I.; Omine M.; Suda T.; Yamaguchi N.** (1999) A common signaling pathway via Syk and Lyn tyrosines kinases generated from capping of the sialomucins CD34 and CD43 in immature hematopoietic cells. *Blood* 93(11):3723-3735.
- Tkaczuk J.; Al Saati T.; Escargueil-Blanc I.; Salvayre A.; Horejsi V.; Durand M.; de Preval C.; Ohayon E.; Delsol G.; Abbal M.** (1999) The CBF.78 monoclonal antibody to human sialophorin has distinct properties giving new insights into the CD43 marker and its activation pathway. *Tissue Antigens.* 54(1):1-15.
- Tanaka Y.; Adams d.h.; Hubscher S.; Hirano H.; Siebenlist U.; and Shaw S.** (1993) T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1B. *Nature* 361:79-82.
- Thomas D.; Patterson S.D.; Bradshaw R.** (1995) Src homologous and collagen (Shc) protein binds to F-actin and translocates to the cytoskeleton upon nerve growth factor stimulation in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 270(48):28924-31.
- Thuillier L.; Hivroz C.; Fagard R.; Andreoli C.; Mangeat P.** (1994) Ligation of CD4 surface antigen induces rapid tyrosine phosphorylation of the cytoskeletal protein ezrin. *Cell. Immunol.* 156:322-331.
- Tsukita S.; Yonemura S.; Tsukita S.** (1997) ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr. Op. Cell. Biol.* 9:70-75.
- Turner C.E.** and Miller J.T. (1994). Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp 125 FAK- binding region. *J. Cell Sci.* 107:1583-1591.
- Whitehead T.P.** (1979): Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* 25:1531- 1546
- Wong R.; Remold-O'Donnell E.; Vercelli D.; Sancho J.; Terhorst C.; Rosen F. S.; Geha R.; Chatila T.** (1990): Signal transduction via leukocyte antigen CD43 (sialophorin) *J. Immunol.* 144:1455-1460.

Wood C.K.; Turner C.E.; Jackson D.; Critchley D.R. (1994) Characterization of the paxillin-binding site and the C-terminal focal adhesion targeting sequence in vinculin. *J. Cell. Sci.* 107:709-717.

Yamada K.M. and Geiger B. (1997) Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9:76-85.

Yonemura S.; Nagafuchi A.; Sato N. and Tsukita S. (1993): Concentration of an integral membrane protein, CD43 (leukosialin, sialophorin) in the cleavage furrow through the interaction of its cytoplasmic domain with actin-based cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 120:437-499.

Yu H.; Chen J.K.; Feng S.; Dalgarno D.C.; Brauer A.W.; Schreiber S.L. (1994) Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 Domains. *Cell* 76:933-945.

APENDICES

TABLA 1. Proteínas señalizadoras

MOLECULA	TIPO DE MOLECULA	FUNCION
Actina	Proteína estructural de citoesqueleto	Importante en la formación de microfilamentos y estructuras secundarias del citoesqueleto.
CD2	co-receptora	Aumenta la adhesión y señalización de la célula T al reconocer a su ligando CD58.
CD4	co-receptora	Miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas; se une a MHC clase II y se asocia con Lck.
CD8	co-receptora	Miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas; se une a MHC clase I y se asocia con Lck.
CD34	co-receptora	Mucina sulfatada que se une a selectinas como CD62-L, CD62-E. Pertenecer a las familia de las mucinas.
CD43	co-receptora	Tiene un dominio extracitoplásmico altamente glicosilado; regula adhesión y señalización.
CD44	co-receptora	Tiene un dominio tipo mucina, se une a ácido hialurónico, media extravasación de linfocitos activados y de memoria.
CD54	co-receptora	Pertenecer a la superfamilia de las inmunoglobulinas, se une a integrinas, contribuye a la extravasación en áreas de inflamación.
CD11-CD18	co-receptora	Pertenecer a la familia de las integrinas; media la adhesión de los linfocitos a otras células.
Cas	Proteína adaptadora	Tiene SH3 y sitios de unión por dominios SH2, se une FAK. Su fosforilación en tirosinas es dependiente de integrinas.
Ezrina (Familia ERM)	Proteína de unión a membrana y a actina	Estimula la polimerización de actina, interactúa con ICAM-2 en la formación de urópodos. Se une a fosfoinosítidos. Se fosforila en Treoninas, serinas ó tirosinas.
Moesina (Familia ERM)	Proteína de unión a membrana y a actina	Se localiza hacia el capping y actúa en la inhibición de la polimerización de actina
Radixina (Familia ERM)	Proteína de unión a membrana y a actina	Se encuentra principalmente en células endoteliales y plaquetas, tiene funciones similares a ezrina.
ERK	MAPcinasa	Regula factores de transcripción.
FAK	Tirosina-cinasa	Cinasa de adhesiones focales, que se asocia a diferentes proteínas de la familia Src y a proteínas adaptadoras para generar modificaciones de citoesqueleto.
Fyn	Tirosina-cinasa	Miembro de la familia de Src. Tiene un dominio SH3 y un SH2; se asocia con el complejo TcR.
Galectina-1	Lectina tipo S	Participa en la selección de timocitos.
Graf	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina.	Es un GEF de Rho y se une a proteínas adaptadoras como Cas.
Grb2	Proteína adaptadora	Tiene un dominio SH3 carboxilo-terminal y uno amino-terminal y un SH2 central; se une a Shc y Sos regulando la vía de Ras.
Lck	Tirosina-cinasa	Miembro de la familia de Src; tiene un dominio SH3 y un SH2. Se asocia a los co-receptores CD4 y CD8, entre otros.
PI3K	Cinasa de lípidos	Contiene dos subunidades: p110 (catalítica) y p85 (reguladora); p85 tiene un dominio SH3, un dominio rico en prolina y dos dominios SH2.
Paxilina	Proteína de unión a citoesqueleto	Proteína adaptadora que tiene dominios de unión a actina, se une a FAK y regula modificaciones del citoesqueleto.
PYK-2	Cinasa de tirosinas	Cinasa de la familia de FAK.
Ras	GTPasa.	Hidroliza GTP. Activada por Sos, activa la vía de Raf/MAPK.
Rac	GTPasa.	Al activarse genera lamelopodios, los cuales son estructuras secundarias del citoesqueleto.
CdC42	GTPasa.	Al activarse produce filopodios o prolongaciones de actina polimerizada dispuestas en una misma orientación.
Rho	GTPasa.	Al activarse genera fibras de estrés.
Sos	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina.	Tiene dominios ricos en prolina; es un GEF de Ras y se une a Grb2.
Syk	Tirosina-cinasa	Miembro de la familia de Syk; tiene dos dominios SH2 en tándem. Se une a ITAMs fosforilados del BcR.
TcR/CD3	Receptora	Específico para el antígeno; se expresa en linfocitos T.
Vav	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina.	Es un GEF de Rac.

CONSTRUCCIONES EN EL PLASMIDO pFneo A PARTIR DEL cDNA DE CD43.

