



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

00551

6

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

EFFECTO DE SEÑALES CO-ESTIMULATORIAS
GENERADAS A TRAVES DE CD43 Y TCR EN LA
ACTIVACION DE LINFOCITOS T HUMANOS

T E S I S

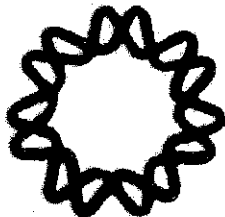
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

NORA ALMA FIERRO GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY



CUERNAVACA, MORELOS

SEPTIEMBRE DEL 2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Genética y fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Yvonne Rosenstein A.

Comité tutorial:

Dra. Martha Vázquez

Dra. Rosana Sánchez

Tutor.

Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay

Comité revisor:

Dra. Alejandra Covarrubias Robles

Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay

Dr. Fernando Ezquivel Guadarrama

Dra. Claudia Treviño Santa Cruz

Dr. Jorge Luis Folch Mallol

Autorizo a la Dirección General de difusión
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso
el contenido de mi trabajo receptivo.

NOMBRE: NOVO ALMO FIERO

González

FECHA: AGOSTO 28, 2002

FIRMA: 

Este trabajo se realizó con el apoyo de las siguientes instituciones

Donativo IN209400. Dirección General de Apoyo al Personal Académico, UNAM.

Donativo G-35943-M. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A...

Dios.

Rodolfo Fierro, mi padre, por ser mi ejemplo, mi fuerza, mi mano, en una palabra... mi héroe.

Nora Alma González, mi mamá... por tu presencia, tu amistad, tus oídos, tus palabras, por no permitir jamás que me sienta sola.

A Juan Carlos, por ser mi hermano, mi amigo, mi ángel, mi confidente, por todo el amor a Al a pesar de Al.

A Rodol, por las diferencias, el coraje, las victorias, la paciencia, por ser tú y permitirme ser yo.

A Alfredo, por recordarme lo hermoso que es ser niño ... "Alma ¿cuando vas a terminar tu tarea para venir a jugar conmigo?."

**Nunca entendí mejor que hoy lo que la esperanza significa:
es la terquedad de vivir imaginando que el próximo segundo
será mejor al presente, es la sensación de que algo maravilloso
nos espera un paso mas adelante de este que damos,
es la risa que emana de un llanto,
es el parpadear con el conocimiento intrínseco
de que al abrir los ojos de nuevo todo estará bien...**

Juan Carlos Fierro
2002

CON CARÍO

A dos seres excepcionales:

Marisol y Tere por respirar tantas sonrisas. GRACIAS.

Aparición urbana

Surgió de bajo tierra?
se desprendió del cielo?
Estaba entre los ruidos,
herido,
malherido,
inmóvil,
en silencio,
hincado ante la tarde,
ante lo inevitable,
las venas adheridas
al espanto,
al asfalto,
con sus crenchas caídas,
con sus ojos de santo,
todo, todo desnudo
casi azul, de tan blanco.

Hablaban de un caballo.
Yo creo que era un ángel.

Oliverio Girondo

A los ángeles que han soñado conmigo.
El eco de sus voces vivirá por siempre en mi corazón

ESPECIALMENTE...

A Paula, Jimmy, Viky, Jaime, Yara, Adelita, Maestra Luisita, Alma Erika, Maestra Margarita, Maestra Emma, Maestra Esther, Maestra Ma. Eugenia, Maestro Urbino; a la Sra. Georgina, el cuate, Rocío, a Vero, a Carolina, Juan Pablo, Mauricio, Edgar, Manzur, Jaime, Gaby, al Padre Octavio, Tere y Poncho... la infancia se colorea con luces.

A Chela, tío Raúl, Mary, Ma. Luisa y Don Chon, Blanca, Flor, Nelly, Aminta, Rebeca Villagrán, Maestro Omar, Madre Delia, Madre Piedad, Profr. Omar, Socorrito, Madre Silvia, Padre Poncho, Paco. A Carlos Myers, a Genaro, Manuel, Fernando, Roberto, Eduardo; a Olivia, a Hechelle. A Lupita soto, a "la polla", a José... crecer es un juego.

Al dire, a Florencio, a Rosas, a Denisse, Franya, Gaby, Ramón Gamma, Padre Ponce, a Lilly... nacemos cada segundo.

A Tere Delgado, Rebeca, Alejandra, Lorena Benitez y David, Betty, Marcela, Claudia, Adriana, Susana y Chiquilin, Lupita, al bodoque, Gerardo, Luis A, Luis F., Pepito, a la maestra Lilia, a Blanquis; a Cinthya, Claudia y Rubén, a Huaracha (mi compadre) y Sandra, Rocío, Leda, Lupita, a Doña Juanita. A Lorena y Eloy, a Hectorín, Pau y Alfredo. A Israel Razo... siempre hay tiempo.

A mis abuelitos: Pedro y Josefina, Joaquín y Belén. A mis tíos: Bertha, César, Lilia y Octavio... perduraré mientras sea un recuerdo.

A Diana, Dr. Roberto González, Lulú, Dr. Moncada, Dr. Victor, Viky, Sarita, Nelly, Juanito, Hortensia, Camen, Perla, Sergio F. y Sergio L... gracias.

A Gregorio, Esther, Laura, Gina, Rubén, a Doña Rosy. A mis médicos... mis manos.

A Josué, Enrique B., el gordis (de Tere), Luis (de Marisol), a Mariana, a Rocío, Savidra, Luisa y Angel. A Mine, Gretel y Tamara. A Ma. Elena, Daniela. A Mauricio Realpe... con cariño reinventando palabras.

A Roxana, Erika, Esthercita, Norma y Toño, José Luis, Judith, Mario y Rayito, Gustavo, Lilly, Angelica, Haydeé, Brenda, Oscar, Mary, Omar, Antonio. A Angel, Vero, Denhi, Diana, Virgilio, Laura, Tacuya Toño, Enrique, Xóchitl... su sonrisa es mi mejor regalo

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora , la Dra. Yvonne Rosenstein por su confianza, paciencia y apoyo.

A los integrantes del laboratorio... por su presencia, su mano y por enseñarme más de lo que pude haber leído.

A Nora por permitirme ser Alma, a Alma por darle esencia a Nora.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMEN	ii
INTRODUCCION	1
1. La vía de las MAP cinasas es un punto de confluencia entre diferentes vías de señalización	2
2. La expresión de CD69 refleja un proceso de activación	6
3. CD43, molécula co-receptora	7
4. Transducción de señales a través de CD43	9
5. El TcR define la especificidad de la respuesta de los linfocitos T	11
6. Las señales de CD43 y el TcR coinciden en diversos puntos	13
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	15
MATERIALES Y METODOS	17
1. Anticuerpos y reactivos	18
2. Aislamiento y purificación de linfocitos T de sangre periférica	18
3. Activación celular	19
4. Evaluación de la fosforilación de ERK	20
5. Citometría de flujo	21
RESULTADOS	22

1. Evaluación del grado de pureza de los linfocitos T aislados	23
2. Determinación de la concentración óptima del anticuerpo anti-CD43 para los ensayos de co-estimulación	24
3. CD43 y el TcR inducen fosforilación de ERK de manera independiente	24
4. CD43 como primer estímulo induce una fosforilación de ERK más sostenida e intensa que el TcR como primer estímulo	25
5. La estimulación simultánea a través de CD43 y el TcR induce efectos similares a la adición de CD43 como primer estímulo a nivel de la fosforilación de ERK pero distintos a los generados por el TcR como primer estímulo	27
6. La estimulación a través de CD43 y el TcR tiene un efecto positivo sobre la inducción de la expresión de CD69	28
DISCUSION	38
CONCLUSIONES	43
PERSPECTIVAS	45
APENDICES	48
REFERENCIAS	51

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	célula presentadora de antígeno
BCS	suero de bovino recién nacido
β GP	β -glicerol fosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen-diamino-tetracético
ERK1/2	cinasa regulada por señales extracelulares-1 y 2
FACS	citofluorometría de flujo
FCS	suero fetal bovino
HAS	albúmina sérica humana
ITAM	motivos de activación basados en tirosinas
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular-1
GDP	difosfato de guanosina
GTP	trifosfato de guanosina
IL-2	interleucina-2
KDa	kilodalton
MAPK	proteína cinasa activada por mitógenos
MAPKK	cinasa de la proteína cinasa activada por mitógenos
MEK1/2	cinasa de MAPK-ERK 1/2
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
NFAT	factor de transcripción de células T activadas
NF κ B	factor nuclear κ B
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PTK	proteína cinasa de tirosina
PI	fosfatidilinositol
PI3K	fosfatidilinositol 3-cinasa
PKC	proteína cinasa C
PLC γ	fosfolipasa
SH2	dominio tipo 2 con homología a Src
SH3	dominio tipo 3 con homología a Src
Src	cinasa de virus de sarcoma
TNF	factor de necrosis tumoral
TPA	12-O-tetradecanoylforbol-13-acetato
TcR	receptor para el antígeno de células T

RESUMEN

La generación óptima de la respuesta de la célula T está mediada por la interacción del TcR con péptidos procesados y expresados sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno, así como por la interacción de moléculas co-receptoras con sus respectivos contra-receptores. Sin embargo, se sabe poco acerca de la temporalidad en la que ocurren estas interacciones. La respuesta final de los linfocitos T dependerá de los primeros contactos establecidos así como de la densidad y forma de las moléculas que participen en ellos. CD43 es una molécula co-receptora abundante sobre la superficie de todas las células linfoides. A través de su porción extracelular, CD43 protruye 45 nm hacia el espacio extracelular. A través de su dominio citoplásmico, CD43 recluta a Fyn y permite la generación de segundos mensajeros, movilización de Ca^{2+} , activación de PKC y MAPK, para finalmente permitir la activación de los factores transcripcionales NFAT, NF κ B y AP-1 regulando así la expresión génica.

Los resultados que se incluyen en el presente trabajo muestran que el pretratamiento de células T humanas con CD43 y la subsecuente activación a través del TcR inducen niveles sostenidos y elevados de la fosforilación de ERK, mientras que el pretratamiento con el TcR y la subsecuente activación a través de CD43 resultaron en una incrementada y transitoria fosforilación de ERK. La co-activación simultánea a través de CD43 y el TcR indujeron incrementos en la fosforilación de ERK semejantes a los obtenidos a través del pre-tratamiento con CD43 y coestimulación con el TcR. Estos resultados sugieren que la pre-estimulación con CD43 probablemente permite una activación más eficiente de la célula T. Con el propósito de determinar si el efecto de la activación de linfocitos T a través de CD43 y el TcR tenía un efecto cascada hacia abajo, se buscó la expresión del marcador temprano de activación celular CD69. La activación simultánea a través de CD43 y el TcR indujo un adelanto en la expresión del marcador de activación CD69 con respecto a la estimulación independiente a través de las mismas moléculas. En conjunto, estos resultados sugieren que las señales de CD43 y el TcR se combinan de manera positiva y son más intensas que las generadas por cada una de las moléculas de manera aislada.

INTRODUCCION

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

La respuesta inmune es el resultado de la reacción de un organismo frente a sustancias extrañas. En esencia, el sistema inmune constituye un mecanismo de protección en contra de organismos patógenos. La generación de una respuesta inmune adquirida requiere del reconocimiento específico del antígeno. En linfocitos T, este reconocimiento se da a través del receptor para el antígeno de la célula T (TcR), que reconoce péptidos antigénicos presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de células presentadoras de antígeno (APCs). Las señales inducidas por el TcR son acompañadas por aquellas generadas a través de la interacción de moléculas co-receptoras como CD2, CD28, CD4, CD8 y CD43 presentes en la superficie de la célula T con sus respectivos contra-receptores en la APC.

En linfocitos T, las moléculas co-receptoras establecen contactos independientes del reconocimiento del antígeno con las APCs. No se conoce el orden específico en el que cada una de las moléculas co-receptoras interactúa con sus contra-receptores en la APC. Sin embargo, debido a que, en ausencia de señales co-estimuladoras, la estimulación a través del TcR induce un estado de no respuesta por parte de la célula T, conocido como anergia (Green *et al* 1994), se propuso el modelo de las dos señales. En este modelo, una señal es generada a partir de la estimulación a través del TcR y la otra señal es proporcionada por moléculas co-estimuladoras (Jenkins *et al* 1987). Se piensa que el linfocito T y la APC se aproximan una a la otra, estableciendo los primeros contactos a través de moléculas que favorecen la adhesión entre dos células y que la respuesta final depende en gran parte de estas primeras interacciones y de las señales generadas a través de ellas. Los experimentos que se describen a continuación fueron realizados con la finalidad de identificar posibles diferencias en las vías de señalización reclutadas por dos moléculas de la superficie de linfocitos T, TcR y CD43, en función del orden en el que se aplicaran los estímulos: de manera consecutiva o simultánea. Debido a que ambas moléculas inciden sobre la vía de las MAP cinasas e inducen la expresión del marcador de superficie CD69, evaluamos el efecto de los diferentes protocolos de estimulación sobre estos parámetros.

1. La vía de las MAP cinasas es un punto de confluencia entre diferentes vías de señalización

El reconocimiento específico del complejo péptido-MHC por parte del TcR y las señales inducidas por la unión de moléculas co-estimuladoras con sus contra-receptores induce

una serie de eventos celulares denominados colectivamente activación celular. La activación de las vías de señalización intracelular conduce a la proliferación, diferenciación, rearrreglos del citoesqueleto y/o funciones efectoras de los linfocitos T. Procesos tales como incremento en la actividad de la proteína cinasa C (PKC), fosforilación en tirosinas de proteínas de membrana y citoplásmicas, incremento en la concentración de calcio intracitoplásmico, activación transcripcional, regulación de la expresión de moléculas de superficie celular y secreción de citocinas; en conjunto, estas señales bioquímicas constituyen diferentes cascadas de señalización intracelular entre las que la vía de las MAP cinasas (proteín cinasas activadas por mitógenos) ocupa un papel central.

Muchas de las vías de señalización reclutadas a través del TcR y de moléculas co-receptoras convergen en una cascada de las MAP cinasas. Las MAP cinasas constituyen una familia de cinasas de serina/treonina implicadas en diferentes respuestas celulares. Esta familia está organizada en bloques de cinasas que constan de un activador de MAPKK (MAPKKK), un activador de MAP cinasa (MAPKK) y una MAP cinasa (MAPK). La transmisión de señales se realiza a través de fosforilaciones secuenciales. En mamíferos, se ha caracterizado un gran número de MAP cinasas, entre las cuales se encuentran la cinasa regulada por señales extracelulares-1 y 2 (ERK1 y ERK2), la cinasa c-Jun N-terminal (JNK) y p38, cuyas funciones son importantes para diferentes eventos biológicos que van desde el crecimiento celular y diferenciación hasta respuestas a señales de estrés que eventualmente desembocan en apoptosis (figura 1). (Schaeffer *et al* 1999).

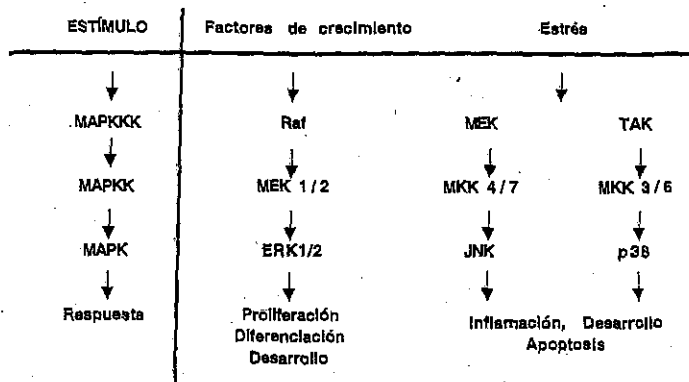


Fig. 1 Activadores de las MAP cinasas. La vía de señalización de las MAP cinasas tiene un papel importante en la regulación de las señales proporcionadas por diferentes estímulos como: citocinas, factores de crecimiento, ambientales y estrés. Estos estímulos activan diferencialmente a las cinasas de la familia MAP, permitiendo la inducción de distintas respuestas por parte de la célula.



La familia de la MAP cinasa ERK consta de dos miembros ERK1 y ERK2 que han sido caracterizadas como cinasas que regulan el crecimiento celular, diferenciación y selección tímica. (Rincón *et al* 2001). ERK se activa al ser fosforilada en residuos de treonina y tirosina, por la acción de enzimas específicas (MEK 1/2). Las cinasas PI3K (fosfatidil inositol 3 fosfato-cinasa) y PKC inciden sobre la vía de las MAP cinasas a nivel de la MEK1/2 que activa a ERK 1/2. Otra molécula importante en la vía de activación de ERK es Ras. Para activar a la GTPasa pequeña Ras, se requiere de la activación de protein tirosin cinasas (PTKs), resultante de la interacción entre las moléculas de la superficie con sus respectivos ligandos. A su vez, las PTKs, entre sus múltiples sustratos, fosforilan a distintas proteínas adaptadoras. La fosforilación de proteínas adaptadoras como Grb2 o Crk favorece su unión con proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina como Sos o Vav, promoviendo la formación de un complejo ternario mediante el cual la proteína de intercambio cataliza la formación de Ras activo. Ras tiene un sitio de unión a GDP/GTP y es activado cuando una molécula de guanosina difosfato (GDP) unida es sustituida por GTP e inactivado cuando el GTP es hidrolizado a GDP. Este intercambio GDP-GTP es catalizado eficientemente sólo cuando Ras se une al complejo de proteínas adaptadoras e intercambiadoras de nucleótidos de guanina (Berridge 1997). Ras recluta a la membrana y activa a una MAPKKK llamada Raf. Ras activado se une a Raf y Raf fosforila a una MAPKK (MEK 1/2) que, a su vez, fosforila a ERK. ERK activo, transloca al núcleo e induce la fosforilación del factor transcripcional Elk, el cual, junto con otros factores transcripcionales, participa en la regulación de la expresión de genes que codifican para proteínas como el marcador de activación de células T CD69, IL-2, TNF α . (figura 2) (Avruch *et al* 2001).

*En el apéndice 1 se describen las principales moléculas de señalización que se mencionan en este trabajo.

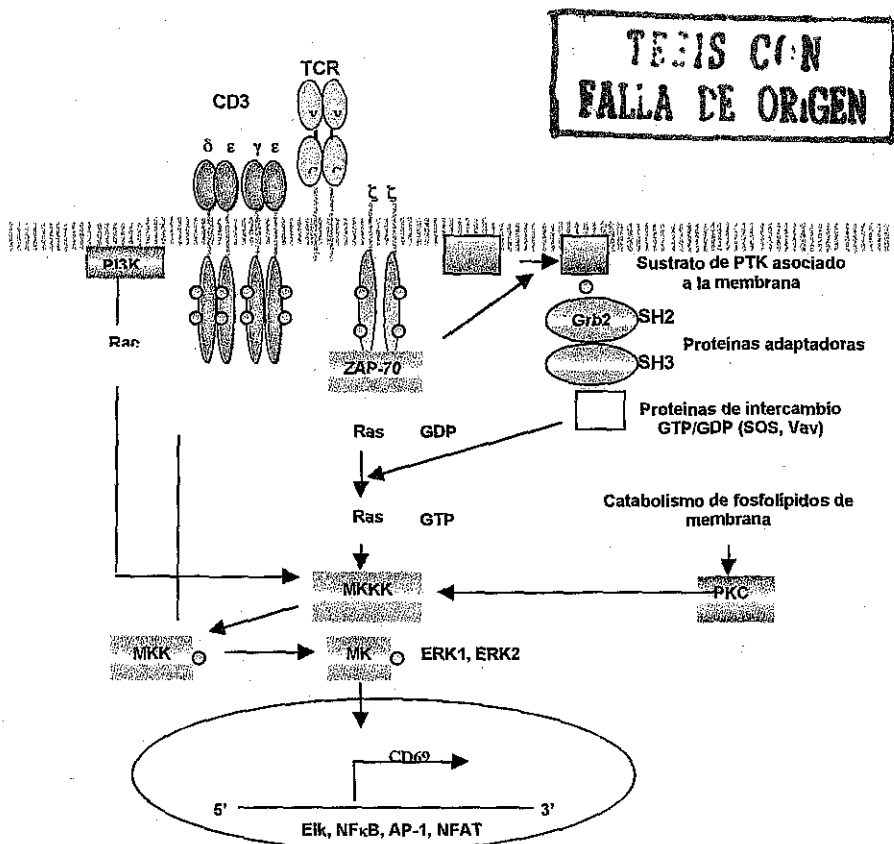


Fig. 2 Activación de la vía de las MAP cinasas. Las PTKs activadas en respuesta a la estimulación de linfocitos T a través de moléculas de la superficie celular fosforilan sustratos asociados a la membrana, lo que permite la asociación de éstos a proteínas adaptadoras y la unión de proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina. Las proteínas de intercambio activan a Ras que a su vez atrae al primer componente de la cascada de las MAP cinasas e inicia una serie de fosforilaciones secuenciales que permiten la activación de la MAP cinasa ERK, la cual participa en la activación de factores transcripcionales que conducirán a la expresión de proteínas importantes en la función de los linfocitos T, como lo es el marcador de activación celular CD69.

2. La expresión de CD69 refleja un proceso de activación.

El antígeno CD69 (Leu-23) se expresa sobre la superficie celular como un homodímero. Las dos cadenas proteicas están unidas a través de enlaces disulfuro, tienen un peso molecular de 28 y 32 kDa respectivamente, y son el resultado de una glicosilación diferencial (Llera *et al* 2001). CD69 se considera como un antígeno de activación celular en una gran variedad de linajes hematopoyéticos, incluyendo linfocitos T y B (Hara *et al* 1986; Cosulich *et al* 1987; Cebrián *et al* 1988; Yokoyama *et al* 1988; Testi *et al* 1989), células NK (Lanier *et al* 1988), neutrófilos (Gavioli *et al* 1992), eosinófilos (Hartnell *et al* 1993) y macrófagos murinos (Marzio *et al* 1997). Sin embargo, CD69 se expresa constitutivamente en monocitos, (De Maria *et al* 1994) plaquetas (Testi *et al* 1990) y algunas poblaciones de linfocitos periféricos, incluyendo células inmunes de la mucosa intestinal (Ibraghimov *et al* 1994).

Los linfocitos T humanos y las células NK no activadas no expresan CD69. Su expresión sobre la superficie celular se induce en respuesta a la estimulación a través de ésteres de forbol, fitohemaglutinina, anticuerpos anti-CD3 (Cosulich *et al* 1987; Cebrián *et al* 1988; Yokoyama *et al* 1988; Testi *et al* 1989), estimulación con IL-2, IFN- α , IL-12, anti-CD16 o anticuerpos anti-CD2 en células NK (Lanier *et al* 1988; Gerosa *et al* 1991). El entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular también induce la expresión de CD69 en la superficie de linfocitos T humanos (Santana *et al* 2000). La expresión de CD69 sobre la superficie de células T es extremadamente rápida (2 horas) y detectable hasta por 72 horas después de la estimulación. (Cosulich *et al* 1987). En un principio, se mostró que su expresión requería la síntesis de novo de proteínas, (Yokoyama *et al* 1988). Sin embargo, existen reportes que describen la presencia de CD69 en el citoplasma de células en reposo. (Risso *et al* 1991). La expresión de la molécula CD69 sobre las superficie de las células T en respuesta a la estimulación es considerada como un marcador fisiológico correspondiente a activación celular.

Si bien no se sabe cual es la función exacta de esta molécula, mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD69, se ha demostrado que la estimulación a través de esta molécula induce respuestas celulares como flujos de calcio en distintos tipos celulares (Testi *et al* 1990; Testi *et al* 1989; de Maria *et al* 1994), agregación plaquetaria (Testi *et al* 1990), proliferación de células T y producción del factor de necrosis tumoral TNF- α (Santis *et al* 1992). En células T, la expresión de CD69 está mediada, entre otros, por los factores transcripcionales NF κ B y por AP-1 (Cosulich *et al* 1987; Yokoyama *et al* 1988).

3. CD43, molécula co-receptora.

a) Características estructurales.

CD43 es una glicoproteína abundante (1.5×10^5 moléculas/célula) que se expresa en la superficie de todas las células hematopoyéticas excepto en eritrocitos. Aproximadamente el 50% de la masa de CD43 está constituida por carbohidratos como ácido siálico, N-acetil-galactosamina y galactosa. Posee un dominio extracelular con 235 aminoácidos que incluyen 80 residuos de serinas o treoninas, la mayoría de los cuales están O-glicosilados y que se extiende hasta 45 nm de la superficie celular, un dominio transmembranal de 23 aminoácidos y un dominio intracitoplásmico con 123 aminoácidos, entre los que destacan 6 treoninas y 11 serinas potencialmente fosforilables (Barclay AN *et al.* 1997, Rosenstein *et al.* 1999). Se han reportado dos isoformas de CD43, una con una masa molecular de 115 KDa la cual se expresa esencialmente en linfocitos T CD4⁺ y monocitos y otra con una masa molecular de 130 KDa que se expresa en células T CD4⁺ activadas, CD8⁺ en reposo y activadas, neutrófilos, plaquetas y linfocitos B activados. Ambas isoformas son el resultado de la glicosilación diferencial de la molécula. Por otra parte, la expresión deficiente de CD43 coincide con estados de inmunodeficiencias severas como el Síndrome de Wiskott-Aldrich (Parkman *et al.* 1981). En pacientes infectados con HIV se ha encontrado una forma aberrante en glicosilación de CD43, lo cual a su vez genera la producción de auto anticuerpos dirigidos contra esta molécula (Giordanengo *et al.* 1995).

A la fecha, se han identificado cuatro contra-receptores para CD43: ICAM-1, (Rosenstein *et al.* 1991) cuya interacción con CD43 puede regular la adhesión entre la célula T y la APC a través de integrinas. Galectina-1 (Baum *et al.* 1995), que es abundante en superficie de células epiteliales tímicas y de esta interacción se sugiere la participación de CD43 en procesos de selección negativa de timocitos. A través del análisis de adhesión espontánea entre células T y APCs se encontró que CD43 es capaz de interactuar con moléculas MHC-I (Stöckl *et al.* 1996). En neutrófilos, se ha reportado que CD43 es capaz de interactuar con albúmina sérica humana (HSA). Así mismo, CD43 actúa como receptor para el virus de influenza y participa en la disfunción de leucocitos polimorfonucleares asociada a esta infección (Abramson *et al.* 1995). CD43 promueve una interacción estable entre micobacterias y receptores sobre las membrana de macrófagos y facilita la respuesta específica de la célula frente a la infección (Fratazzi *et al.* 2000).

b) Papel fisiológico de CD43.

Las funciones de CD43 parecen ser múltiples y a veces opuestas. Esta abundante molécula participa en la regulación de la adhesión de células linfoides a otras células así como en la generación y transmisión de señales de activación. Es de llamar la atención que cada una de las moléculas que han sido identificadas como ligandos de CD43, son a su vez ligandos de otras moléculas co-receptoras de la superficie de linfocitos T. CD8 interactúa con MHC-I, LFA-1 con ICAM-1, galectina con CD45. Esto sugiere que CD43 podría tener un papel regulador de las interacciones celulares de linfocitos T. Además, es posible que dependiendo de la isoforma de CD43 y del ligando al que se una se induzcan señales diferenciales (Ellies *et al* 1996).

Al estimular células CD43⁺ con diversos ligandos de integrinas, CD43 se redistribuye en la superficie celular, en el extremo de la célula opuesto al punto de contacto entre la integrina y su ligando y se ha sugerido que, al relocalizarse, CD43 modifica la carga neta negativa en una región de la superficie celular (Sánchez-Mateos *et al* 1995). Los resultados obtenidos con células transfectadas con el gene humano de CD43 o células deficientes en la expresión de CD43 (CD43^{-/-}), se interpretaron en su momento como que la carga negativa conferida por el alto contenido de ácido siálico de CD43 proporciona a la célula fuerzas repulsivas que contribuyen a regular de manera negativa la adhesión de linfocitos T con células blanco o APCs (Manjunath *et al* 1993; Manjunath *et al* 1995). Sin embargo, trabajos mas recientes demuestran que la presencia de CD43 en el sitio de contacto entre un linfocito T y una APC no interfiere con las señales generadas por el TcR lo que descarta la posibilidad de que CD43 represente un impedimento estérico en la transmisión de señales intracelulares (Allenspach *et al* 2001). Los experimentos realizados *in vivo* con ratones CD43^{-/-} han arrojado resultados opuestos en cuanto a la importancia de CD43 en los fenómenos de migración de los linfocitos a los órganos linfocitarios secundarios y a los tejidos. Por un lado, se encontró que las células linfoides migran con mayor facilidad a los órganos linfoides secundarios de la periferia (Stockton *et al* 1998). Paradójicamente, usando el mismo modelo experimental, se ha encontrado que la expresión de CD43 es un requisito para una migración adecuada de los linfocitos (Woodman *et al* 1998).

Anticuerpos anti-CD43 inhiben el rodamiento de linfocitos T sobre las células epiteliales de vénulas altas (McEvoy *et al* 1997), así como fenómenos de agregación homotópica, independientes de la participación de integrinas leucocitarias (de Smet *et al* 1993; Rosenkranz *et al* 1993). Así mismo, datos experimentales recientes demuestran que un anticuerpo anti-CD43 retarda significativamente el establecimiento de diabetes e inhibe el

reclutamiento de linfocitos T a los islotes del páncreas, así como a glándulas salivales y lacrimales, bloqueando los procesos inflamatorios. Estos resultados sugieren que CD43 podría participar en el establecimiento de padecimientos autoinmunes mediados por linfocitos T y que este anticuerpo podría tener usos terapéuticos (Johnson *et al* 1999).

En trabajos de nuestro laboratorio, se ha demostrado que la estimulación de linfocitos T con esferas recubiertas con anticuerpos anti-CD43 inducen la polarización de moléculas de señalización hacia el sitio de contacto entre la esfera y el linfocito T (Cruz sometido), sugiriendo que CD43 participa activamente en la redistribución de moléculas de señalización intracelular favoreciendo la activación de la célula. Estos datos concuerdan con reportes que muestran que CD43 actúa como molécula co-estimuladora potenciando las señales del TcR al inducir un aumento en la proliferación celular (Bagriacik *et al* 2001).

Aunado a la participación de CD43 en polarización (Serrador *et al* 1998), quimiotaxis, adhesión, y proliferación, (Manjunath *et al* 1993; Manjunath *et al* 1995; Miura Y *et al* 2002), se ha reportado que esta molécula también participa en eventos fisiológicos como diapédesis (Seveau *et al* 1997), y agregación (Axelsson *et al* 1988); así como en la regulación del crecimiento, diferenciación celular y apoptosis (Cermák *et al.* 2002). En conjunto, estos datos sugieren que CD43 participa de manera importante en múltiples funciones de los linfocitos T. Por otra parte, debido a su estructura alargada y a su abundancia, CD43 podría mediar las primeras interacciones entre los linfocitos T y las APCs, modulando las señales inducidas a través del TcR y las otras moléculas de la superficie celular.

4. Transducción de señales a través de CD43.

Las señales generadas a través de CD43 son numerosas. Aunque a la fecha, no se sabe exactamente como están constituidas las cascadas de señalización reclutadas por esta molécula, a continuación se hace una breve reseña de las principales vías que han sido identificadas.

Los eventos intracelulares más tempranos en respuesta a la estimulación de linfocitos T a través de CD43 incluyen la asociación del dominio citoplásmico de CD43 con la cinasa de la familia Src, Fyn y la fosforilación de esta cinasa en residuos de tirosina (Pedraza-Alva *et al* 1996; Alvarado *et al* 1995). El entrecruzamiento de CD43 con el anticuerpo L10, permite la fosforilación mediada por PTKs (protein tirosin cinasas) de la familia Src

(Lck y Fyn) en los ITAMs de la cadena ζ (Cruz M. sometido). Una vez que los ITAMs de la cadena ζ son fosforilados en tirosinas, se convierten en sitios específicos de acoplamiento, que se asocian a proteínas citoplásmicas con dominios SH2, los cuales se unen de manera específica a tirosinas fosforiladas. ZAP-70 es una de estas proteínas.

Las PTKs reclutadas en respuesta a la activación mediada por CD43 fosforilan y activan diversos sustratos, entre los que se encuentra las proteínas adaptadoras LAT y Shc. Las proteínas adaptadoras desempeñan un papel importante en la activación celular, ya que actúan como un andamiaje que permite la formación de complejos de señalización, facilitando así la transducción de señales intracelulares. Entre sus múltiples funciones, LAT se une a la fosfolipasa C γ -2 (PLC- γ -2) (Anzai *et al* 1999), permitiendo el reclutamiento de esta última. PLC- γ -2 se activa al ser fosforilada por las PTKs reclutadas y cataliza la hidrólisis de un fosfolípido de membrana llamado fosfatidil inositol bifosfato (PIP2), lo que conduce a un aumento en los niveles citoplásmicos de los productos de la hidrólisis de PIP2: inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). IP3, estimula la liberación de calcio de los depósitos intracelulares, con lo que se induce un incremento de Ca^{2+} intracelular. El calcio se une a la proteína calmodulina y el complejo que resulta de esta unión activa a la fosfatasa calcineurina, la cual defosforila al factor transcripcional NFAT, lo que induce la translocación de este último al núcleo. Por otra parte, DAG junto con Ca^{2+} , activa diferentes isoformas de la proteína cinasa C (PKC), la cual a su vez participa en la activación de la vía de las MAP cinasas y en la activación de factores transcripcionales como NFAT, NF κ B y AP-1 (Pedraza-Alva *et al* 1998, Santana *et al* 2000).

La estimulación a través de CD43, promueve la activación de otras moléculas tales como Vav y Cbl. Vav es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) para GTPasas de la familia Rac y es fosforilado en tirosinas como resultado del entrecruzamiento de CD43 sobre la superficie de los linfocitos T. Este evento resulta en la formación de complejos moleculares que incluyen moléculas adaptadoras como SLP-76 y Grb2, implicados en la síntesis de IL-2 y rearrreglos de citoesqueleto (Pedraza-Alva *et al* 1998). Cbl es una proteína adaptadora que también participa en la regulación de las señales inducidas por el TcR. Sin embargo, Cbl es fosforilada en residuos de serina como resultado de la estimulación de linfocitos T a través de CD43 y en residuos de tirosina en respuesta a la estimulación con el TcR y participa en la regulación de la activación de la vía de las MAP cinasas (Pedraza-Alva *et al* 2001).

PI3K (fosfatidil inositol 3 cinasa) parece tener un papel muy importante en el control de las señales generadas por CD43. Dentro de las funciones descritas para esta cinasa destacan, su participación en el metabolismo de fosfolípidos, la fosforilación de la cinasa Syk, la activación de PLC- γ y subsecuente activación de la cascada de las MAP cinasas; la activación de isoformas nuevas de PKC y remodelación de citoesqueleto.

Las señales inducidas a través de CD43 conducen a la activación de la vía de las MAP cinasas. En particular, se sabe que CD43 activa a las MAP cinasas: p38, JNK y ERK. La inducción de la activación de los factores de transcripción NFAT, NF κ B y AP-1, en respuesta a la estimulación a través de CD43 desemboca en la regulación de la expresión de genes que codifican para proteínas importantes para el desarrollo y función de la célula T, como IL-2, así como de proteínas de superficie marcadoras de activación CD25 y CD69.

5. El TcR define la especificidad de la respuesta de los linfocitos T.

a) Características estructurales.

El TcR es un heterodímero que se extiende 11 nm sobre la superficie celular. Está formado por dos cadenas polipeptídicas transmembranales, llamadas α y β , unidas covalentemente a través de puentes disulfuro (Abbas *et al* 2000). Como las cadenas de las inmunoglobulinas, las cadenas α y β del TcR presentan regiones variables y constantes (Jorgens *et al* 1992). Las regiones variables del TcR poseen secuencias con una gran variabilidad entre las diferentes clonas de células T, acorde con su papel en el reconocimiento específico del antígeno. Debido a que las cadenas α y β del TcR poseen un dominio citoplásmico sumamente pequeño, no participan activamente en la generación de señales intracelulares, por lo que requiere de otras moléculas asociadas (complejo CD3) que funcionen como transductoras de señales. El conjunto funcional TcR-CD3 es un complejo macromolecular compuesto de una unidad de reconocimiento del antígeno (TcR) y de un complejo proteico que permite la interacción del receptor con la maquinaria de señalización intracelular (CD3) (Germain *et al* 1999). CD3 consta de las cadenas γ , δ y ϵ , así como de un homodímero unido por puentes disulfuro de una proteína denominada cadena ζ . La fosforilación de estas proteínas en residuos de tirosina generan señales esenciales para la el proceso de activación celular. Estos residuos de tirosina se encuentran en secuencias específicas, conocidas como ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (Abbas *et al* 2000).

b) Señales inducidas a través del TcR.

Uno de los primeros eventos que resultan del reconocimiento específico del complejo MHC-antígeno por el TcR, es la activación de las cinasas Lck y Fyn, que a su vez fosforilan residuos de tirosina de los ITAMs presentes en el complejo CD3 y en la cadena ζ (Nel *et al* 2002). Esto promueve el acoplamiento de moléculas efectoras y adaptadoras que contienen dominios SH2 (dominios proteicos que reconocen residuos de tirosinas fosforiladas) como Syk y ZAP-70 (Samelson *et al* 2002). Zap-70 a su vez, fosforila en residuos de tirosina a la molécula adaptadora Shc. Shc fosforilado interactúa con los dominios SH2 de la molécula adaptadora Grb2 la cual contiene dominios SH3 que se unen a secuencias ricas en prolina del amino terminal de SOS, un factor intercambiador de guanina, formando el complejo Grb2-SOS (Clements *et al* 1999; Baldar *et al* 1999). Este complejo permite la activación de Ras quien a su vez recluta a la cinasa de serina/treonina Raf (MAPKKK) dando inicio a la activación de la cascada de las MAP cinasas (Avruch *et al* 2001).

A semejanza de lo que describimos para CD43, las señales generadas por el TcR activan a proteínas adaptadoras como LAT y SLP-76 (Samelson *et al* 2002). Estas moléculas son esenciales en la formación de complejos moleculares que reclutan y activan diversos sustratos entre los que se encuentran PLC γ -1 y PLC γ -2. La activación de PLC γ induce el catabolismo de fosfolípidos de membrana generando IP3 y DAG (Reynolds *et al* 2002). Este último activa a PKC, generando flujos de calcio intracelular (Gardner *et al* 1989). Otra proteína adaptadora regulada en respuesta al entrecruzamiento del TcR sobre la superficie celular es Cbl. Aunque el mecanismo de acción de Cbl aún no ha sido totalmente dilucidado, hay evidencias de que la fosforilación de Cbl en residuos de tirosina ejerce un efecto regulador negativo de las señales inducidas por el TcR (Thien *et al* 2001).

La velocidad con la que se regula el metabolismo de los lípidos intracelulares parece hacer de este un punto de control para la regulación de la transducción de señales generadas a través de múltiples moléculas. Enzimas como PI3K y PI4K que regulan las concentraciones de segundos mensajeros están involucradas en eventos que van desde el metabolismo de fosfolípidos hasta la activación de la cascada de las MAP cinasas y la activación de Akt, que es una cinasa que regula negativamente la apoptosis (Reynolds *et al* 2002).

La activación de los factores transcripcionales NFAT, NF κ B, Elk y AP-1, en respuesta a las señales inducidas por el TcR conduce a la regulación de genes que codifican para

proteínas importantes en la función de la célula T como lo son IL-2 e IFN- γ , así como marcadores de activación celular como CD25 y CD69 (Kane *et al* 2000).

6. Las señales de CD43 y del TcR coinciden en diversos puntos.

En base a lo anterior, queda claro que las cascadas de señalización de la vías de CD43 y el TcR poseen numerosos puntos de convergencia. La fosforilación de ζ en respuesta a la activación a través de CD43 y el TcR, conduce al reclutamiento de cinasas de tirosinas y a la formación de complejos que permitirán la activación de cascadas de señalización como lo es la vía de las MAP cinasas. La MAP cinasa ERK representa un punto importante de convergencia representativo de señales inducidas a través de CD43 y el TcR. El reclutamiento de ERK a su vez conduce a la activación de factores transcripcionales, para finalmente dar lugar a la expresión de proteínas marcadoras de activación celular como CD69, así como citocinas.

Cabe señalar que la mayor parte de la información disponible sobre las señales inducidas a través de CD43 y el TcR ha sido obtenida estimulando a las células sólo a través de una u otra molécula (figura 3). El presente trabajo es el inicio de un estudio que pretende comparar diferentes niveles de regulación de la respuesta de linfocitos T humanos, generada por la co-estimulación a través de distintos pares de moléculas de la superficie celular como CD2, CD28, CD43 y el TcR. En el presente estudio, se compararon las diferencias en tiempo e intensidad de las vías inducidas a partir de la co-estimulación de linfocitos T a través de CD43 y el TcR, a nivel de la fosforilación de ERK y la inducción de la expresión de CD69.

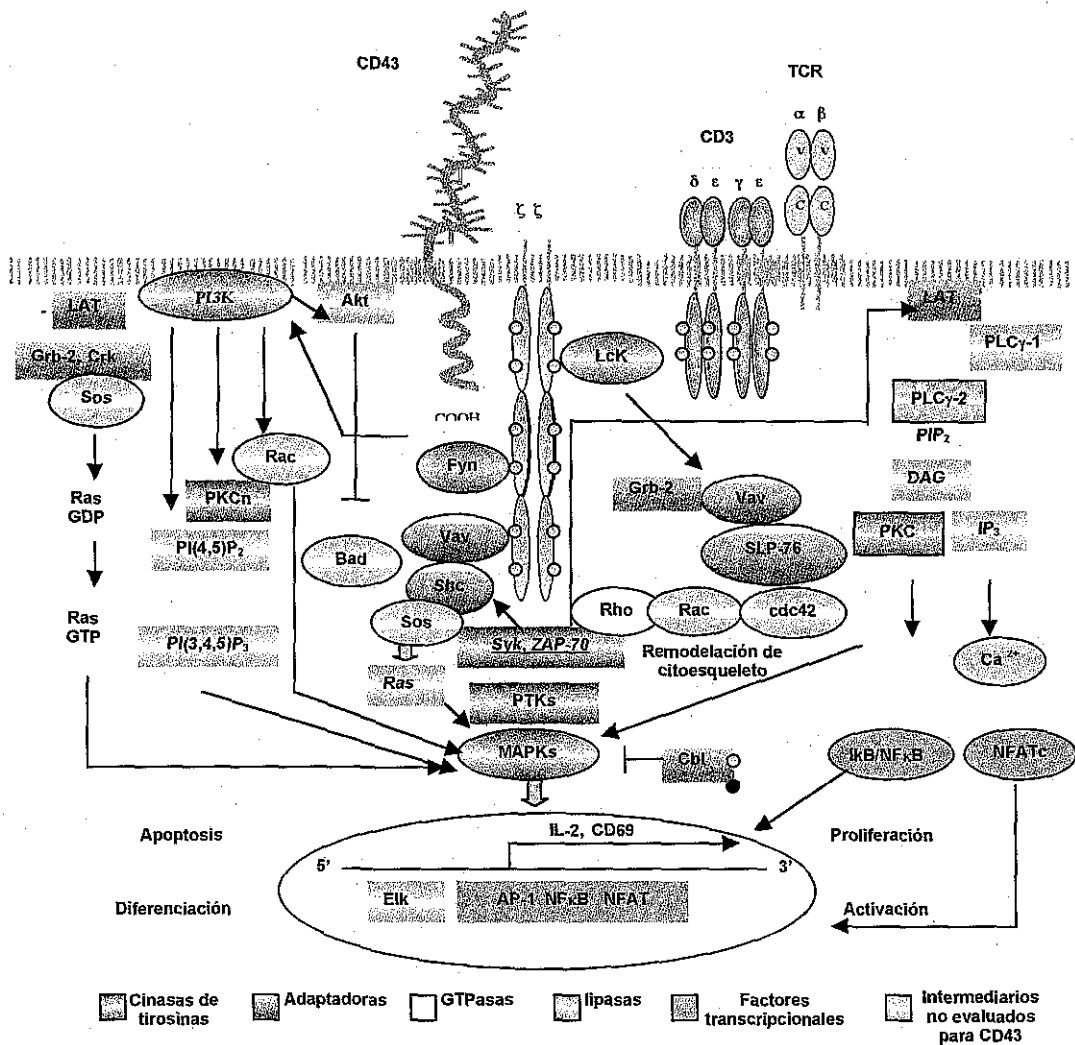


Fig. 3 Esquema general de las vías de señalización reclutadas por estimulación a través de CD43 y el TcR.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

Una célula percibe las señales del medio a través de moléculas de su superficie celular e integra para generar una respuesta. Se considera que para que un linfocito T se comprometa frente a un antígeno, son necesarias las señales específicas del TcR y las señales de, por lo menos, una molécula co-receptora. Tomados individualmente, CD43 y el TcR inducen señales intracelulares que generan una gama de respuestas por parte de la célula. Nuestra hipótesis es que la co-estimulación de linfocitos T a través de CD43 y el TcR resulta en la modulación diferencial de las vías de señalización intracelular.

OBJETIVO GENERAL

Comparar las posibles diferencias en tiempo, espacio e intensidad de las vías reclutadas a partir de la co-estimulación de linfocitos T humanos a través de CD43 y el TcR.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la fosforilación de ERK y la expresión del marcador temprano de activación celular CD69, en respuesta a distintos protocolos de activación de linfocitos T humanos a través de CD43 y el TcR.

MATERIALES Y METODOS

III. MATERIALES Y METODOS

1. Anticuerpos y reactivos.

Se usó el anticuerpo monoclonal L10, IgG1 (Remold O'Donnel et al, 1986) que reconoce a la molécula CD43 y un anticuerpo monoclonal anti-CD3/TcR, OKT3, IgG2a (American Type Culture Collection). Se utilizaron como entrecruzadores, anticuerpos clase específicos anti-IgG1 y anti-IgG2a de FisherBiotech. Los anticuerpos anti-pERK (que reconoce la forma fosonilada de ERK 1 y ERK2) y anti-ERK2 son de Santa Cruz Biotechnology y los anticuerpos secundarios para inmunoblot de Biomeda. TPA (12-O-tetradecanoylforbol-13-acetato 50 ng/ml) y los inhibidores de proteasas y fosfatasas: [PMSF (1 mM), β GP (10 mM), NaF (10 mM), DTT (0.5 mM), Na_2VO_4 (200 μM), leupeptina (1 μM)] son de Sigma.

2. Aislamiento y purificación de linfocitos T de sangre periférica.

Los experimentos aquí descritos se realizaron en linfocitos T aislados de concentrados linfocitarios de sangre humana obtenida de donadores voluntarios, adultos y sanos. El aislamiento de los linfocitos, se hizo sobre un colchón de ficoll-hypaque (Ficoll 1983). El ficoll permite, en base a la densidad de los eritrocitos y los linfocitos, separar ambas poblaciones. Los concentrados celulares diluidos, volúmen/volúmen en PBS 1x (amortiguador salino de fosfatos: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, KH_2PO_4 15 mM pH 7.3), se depositaron lentamente sobre un colchón de ficoll-hypaque y se centrifugaron a 350 x g a 4°C por 30 min. Los linfocitos quedan en la interfase entre el PBS y el ficoll, de donde se extrajeron. Estos se lavaron dos veces con PBS, centrifugándose a 350 x g por 15 min, para eliminar el exceso de ficoll. Una vez lavados, los linfocitos se resuspendieron en el medio de cultivo RPMI 1640 (Rosvelt Park Memorial Institute) completo [5% de suero fetal bovino (FCS), 5% de suero de bovino recién nacido (BCS), 2 mM de L-glutamina, 100 U de penicilina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycinina y 50 μM de β -mercaptoetanol], se contaron y se dejaron en cajas de Petri toda la noche a 37°C, 5% CO_2 para permitir la adhesión de células monocíticas.

Las células no adherentes a las placas se tomaron y se centrifugaron a 350 x g por 7 min, se resuspendieron en RPMI 1640 completo y se incubaron por 1 hr a 37°C, 5% CO_2 en columnas de lana de nylon. Posteriormente se eluyeron las células T de las columnas con RPMI 1640 completo (37°C) (Boyum *et al* 1968). Los linfocitos B permanecen pegados

a la lana de nylon. Con el propósito de tener linfocitos no activos, las células T se incubaron por 24 hrs a 37°C, 5% CO₂ en RPMI 2% FCS. El grado de pureza y actividad de las células T obtenidas se analizó por citometría de flujo como se describe en la sección correspondiente.

3. Activación celular

En todos nuestros experimentos, los anticuerpos anti-CD43 (L10), anti-TcR (OKT3) y los anti-IgG1 y anti-IgG2, se utilizaron a una concentración de 4µg/ml.

a) Pre-activación de células T a través de CD43 y co-activación a través del TcR o pre-activación de células T a través del TcR y co-activación a través de CD43.

Para semejar la interacción de CD43 y el TcR con sus respectivos ligandos, las moléculas se entrecruzaron con anticuerpos específicos. Este procedimiento ha sido validado en varios trabajos para diferentes moléculas de superficie y se sabe que las señales intracelulares que se generan de esta manera son equivalentes a aquellas resultantes de la interacción receptor-contra-receptor (De Smet *et al* 1993; Jhonson *et al* 1999). Se incubaron 1X10⁷ células durante 15 minutos en hielo con el anticuerpo dirigido contra la molécula CD43 (L10, IgG1) o con el anticuerpo dirigido contra el TcR (OKT3, IgG2a). El entrecruzamiento de L10 (CD43) o TcR (OKT3) se realizó con la adición de anticuerpos monoclonales anti-IgG1 o anti-IgG2a y se inició la cinética de activación, incubando las células por diferentes periodos de tiempo a 37°C. Posteriormente, se lavaron las células con el propósito de eliminar el exceso de anticuerpo. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 500 µl de RPMI para dar el segundo estímulo (TcR o CD43), adicionando el anticuerpo dirigido contra una u otra de estas moléculas, incubando las células durante 2 minutos a temperatura ambiente para posteriormente entrecruzar e incubar las células por un tiempo fijo de 5 minutos a 37°C. Una vez concluida la co-activación, se detuvo la reacción con PBS frío, se centrifugaron las células a 10000 rpm durante 10 segundos, se descartó el sobrenadante y se lisaron las células en 100 µl de buffer de lisis (25 mM Hepes pH 7.5, 0.5% Tritón x-100, 1.5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.2 mM EDTA y con los inhibidores PMSF 1 mM, βGP 10 mM, NaF 10 mM, NaVO₄ 200 µM, leupeptina 1 mg/ml, antipaína 5 mg/ml, aprotinina 10 mg/ml, DTT 0.5 mM) durante 30 minutos a 4°C. Los lisados celulares se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se conservó a -20°C hasta ser analizado.

b) Activación simultánea de células T a través de CD43 y el TcR.

A diferencia del protocolo anterior, en este caso, se incubaron 1×10^7 células durante 15 minutos en hielo con los anticuerpos dirigidos contra CD43 (L10) y contra el TcR (OKT3). Ambos anticuerpos se adicionaron simultáneamente. Una vez concluido el periodo de incubación se adicionaron los anticuerpos clase específicos, IgG1 para entrecruzar el anticuerpo L10 (anti-CD43) e IgG 2a para el anticuerpo OKT3 (anti-TcR) y se inició la cinética de activación a través de CD43 y el TcR incubando las células por diferentes periodos de tiempo a 37°C. Se detuvo la reacción con PBS frío, se centrifugaron las células a 10000 rpm durante 10 segundos, se descartó el sobrenadante y se lisaron las células como se describe en la sección anterior.

4. Evaluación de la fosforilación de ERK.

Los lisados obtenidos a partir de las células activadas siguiendo cada uno de los protocolos descritos anteriormente se analizaron por SDS-PAGE e inmunoblot. De los lisados celulares totales se ocupó el equivalente a 1×10^6 células (ceqs) por punto y se sometieron a un campo electroforético en geles de SDS-poliacrilamida a 100 mAmp. Las proteínas se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó con 5% de leche descremada en polvo, disuelta en TBS-T 1x (10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl y 0.05% Tween) 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó con anti-pERK (1:1000 en TBS-T 1x, 5% leche) toda la noche a 4°C. Se lavó la membrana 3 veces con TBS-T 1x y se incubó con un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (anti-IgG de ratón 1:5000 en TBS-T 1x, 5% leche) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas se visualizaron en film utilizando la técnica de quimioluminiscencia [ECL, siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham)]. Con el propósito de verificar que todos los carriles tuvieran la misma cantidad de proteína, se evaluó la presencia de ERK. Para ello, se eliminó el anticuerpo dirigido contra la forma fosforilada de ERK y se verificó la remoción del mismo por ECL. Para esto, se lavaron las membranas 2 veces a 37°C durante 30 minutos cada lavado con glicina 0.1 M pH 3. Una vez eliminado el anticuerpo, se incubó la membrana con el anticuerpo anti-ERK2 (1:2000 en TBS-T 1x 5% leche) toda la noche a 4°C y se evaluó la presencia de esta molécula siguiendo el mismo protocolo que para p-ERK.

5. Citometría de flujo.

Se utilizaron 1×10^6 células por punto, las cuales se lavaron con la solución de lavado (PBS 1x, 0.02% de azida de sodio y 2% de FCS), centrifugando a $350 \times g$ a $4^\circ C$ por 5 min; se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 50 μl de solución de lavado y 50 μl del primer anticuerpo [anti-CD43 (L10, ascitis 1:100)], anti-CD3 (OKT3 1 $\mu g/ml$) o un anticuerpo irrelevante (3D6, ascitis 1:100), y se incubaron 30 min a $4^\circ C$. Posteriormente se les adicionaron 4 ml de solución de lavado, se centrifugaron a $350 \times g$ a $4^\circ C$, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 50 μl de solución de lavado y se incubaron con un segundo anticuerpo fluoresceinado (IgG de conejo anti-IgG de ratón) (1:25 en solución de lavado) por 30 min a $4^\circ C$ en oscuridad. El exceso de anticuerpo se eliminó lavando las muestras con 4 ml de solución de lavado, centrifugando a $350 \times g$ por 5 min a $4^\circ C$. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 50 μl de solución de lavado y 50 μl de paraformaldehído 2% en PBS. Se adicionó solución salina a las muestras en el momento de ser analizadas en un citómetro de flujo (FACSsort) utilizando el programa Cellquest (Becton Dickinson).

La evaluación de la presencia de la molécula de superficie CD69 en los linfocitos T activados se realizó mediante tinciones con un anticuerpo dirigido contra la molécula CD69 acoplado a fluoresceína. Las muestras se analizaron por citometría de flujo.

RESULTADOS

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Evaluación del grado de pureza de los linfocitos T aislados.

En los experimentos descritos en este trabajo, se utilizaron linfocitos T aislados de múltiples donadores sanos. Con el fin de comparar los resultados de distintos donadores, fue preciso evaluar el grado de pureza de cada preparación de linfocitos T.

En la figura 4 se muestra un perfil típico del proceso de purificación de los linfocitos T aislados como se describe en la sección de materiales y métodos. Se muestran los histogramas obtenidos al incubar las células con anticuerpos anti-CD43 (L10), anti-CD3 (OKT3) o bien, empleando un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo. En la figura 4A se muestra en primer lugar, el histograma de granularidad (en el eje y) contra tamaño (en el eje x) correspondiente a las células mononucleares obtenidas del colchón de ficoll. Se observa la presencia de tres poblaciones que corresponden a linfocitos (las más pequeñas y menos granulosas, población 1), monocitos (las siguientes en tamaño, población 2) y granulocitos (las más grandes y granulosas, población 3). Así mismo, se presentan los niveles de expresión de CD43 y el TcR sobre la superficie de estas células en los histogramas donde se grafican los eventos analizados (en el eje y) contra la fluorescencia (en el eje x). En rojo, se muestra la expresión de CD43, en azul la del TcR y en verde la fluorescencia del anticuerpo irrelevante empleado. El análisis global de las 3 poblaciones muestra un 60% de expresión de CD43 y 49% del TcR en células mononucleares totales.

Las células mononucleares obtenidas del primer paso de purificación, se incubaron en placas con el propósito de adherir a las mismas la población de monocitos y así obtener las células no adherentes que incluyen esencialmente linfocitos T y B. En la figura 4B se muestra el análisis de la expresión de CD43 y el TcR en células no adherentes a placas. En el histograma de granularidad contra tamaño, se observa un enriquecimiento en la población de linfocitos como resultado de la eliminación de monocitos. El análisis global de la población muestra un 89% de CD43 y 65% del TcR.

Finalmente, las células no adherentes se pasaron por columnas de lana de nylon a las que se adherieron los linfocitos B. Mediante elución, se recuperó la población de linfocitos T. En la figura 4C se muestran los histogramas correspondientes a los linfocitos T purificados. Se observa un claro enriquecimiento de linfocitos T en el histograma de granularidad contra tamaño, en el que prácticamente se pierde la población de monocitos y granulocitos, esto resulta en un 95% de expresión de CD43 y 85% de expresión del TcR.

2. Determinación de la concentración óptima del anticuerpo anti-CD43 para los ensayos de co-estimulación.

Por datos previos obtenidos en el laboratorio, sabíamos que las señales resultantes del entrecruzamiento de CD43 en la superficie de linfocitos T humanos aislados de sangre periférica de individuos sanos, inducía la fosforilación de la MAP cinasa ERK después de 3 a 5 minutos de activación y utilizando una concentración de 1 a 4 $\mu\text{g/ml}$ de L10 (Pedraza-Alva *et al* 1998). Así mismo, datos previos del laboratorio y de la literatura (Zhong *et al* 2002), indicaban que concentraciones de entre 1-10 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo anti-CD3 (OKT3) inducen también una fuerte fosforilación de ERK.

Con el propósito de determinar las condiciones óptimas de co-estimulación con L10 y OKT3, se realizó una curva dosis-respuesta y se evaluó la respuesta a nivel de la fosforilación de la MAP cinasa ERK. 2×10^7 células fueron estimuladas con diferentes concentraciones del anticuerpo anti-CD43 (L10) por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se lavaron y se estimularon por 5 minutos con una cantidad constante del anticuerpo anti-TcR (OKT3) a 37°C . Los extractos celulares totales (2×10^6 ceqs) se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con los anticuerpos anti-pERK o anti-ERK2. La intensidad de las bandas detectadas se determinó por densitometría y los resultados se expresan en función de la relación pERK/ERK. En los experimentos descritos para la determinación de la fosforilación de ERK en este trabajo, mostramos un experimento representativo. Las tendencias de los resultados obtenidos son las mismas entre los diferentes donadores, las diferencias en intensidad se evaluaron por densitometría. Como se muestra en la figura 5, concentraciones desde los 0.5 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo anti-CD43 y la posterior co-estimulación con el anticuerpo anti-TcR inducen una mayor fosforilación de ERK, con respecto a las células no estimuladas y aquellas estimuladas exclusivamente a través del TcR. Sin embargo, el efecto mas claro se observa en concentraciones de 4 y 8 $\mu\text{g/ml}$ de L10 por lo que se decidió usar una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ de L10 en los experimentos posteriores. Por otra parte, tomando en cuenta que en nuestro laboratorio y en numerosos reportes de co-estimulación a través del TcR con otras moléculas co-receptoras incluyendo CD43, se utilizan concentraciones del anticuerpo anti-TcR, OKT3, de 1-10 $\mu\text{g/ml}$ decidimos emplear una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ de este anticuerpo. (Pedraza-Alva *et al* 1996; Heyde H. 2000; Meini E 2000).

3. CD43 y el TcR inducen la fosforilación de ERK de manera independiente.

Una vez establecidas las concentraciones de cada uno de los anticuerpos para los ensayos subsecuentes, se realizaron cinéticas que nos permitieran valorar el efecto individual de la estimulación a través de CD43 y del TcR. Se estimularon 1×10^7 linfocitos T humanos con los anticuerpos anti-CD43 y anti-TcR por diferentes periodos de tiempo a 37°C. En la figura 6A se muestra el efecto de la estimulación de los linfocitos T a través de CD43. Se observa que la inducción en la fosforilación de ERK sigue un patrón bimodal. El primer pico inicia a partir de los 2 minutos y alcanza un máximo a los 30 minutos y un decremento a los 60 minutos. A los 120 minutos se observa un nuevo incremento. En las células sin estimular no se observa fosforilación de ERK ni a los 10 minutos de incubación a 37°C ni aun después de dos horas de incubación, como se puede apreciar en las siguientes figuras.

En la figura 6B se presenta el efecto de la estimulación a través del TcR. Con este tratamiento se observa la inducción en la fosforilación de ERK a partir de los 2 minutos de estimulación. Estos niveles de fosforilación de ERK se mantienen relativamente constantes hasta 60 minutos, observando un pico máximo a los 120 minutos.

Estos resultados muestran que la estimulación de linfocitos T a través de CD43 o el TcR de manera independiente inducen una respuesta a nivel de la MAP cinasa ERK. La estimulación a través de CD43 induce la fosforilación de ERK1 y ERK2, mientras que la estimulación a través del TcR induce preferencialmente la fosforilación de ERK2. La cinética de fosforilación de ERK así como la intensidad es muy diferente según se estimulen las células a través de CD43 o el TcR.

4. CD43 como primer estímulo induce una fosforilación de ERK más intensa que el TcR como primer estímulo.

Una vez demostrado que tanto CD43 como el TcR inducen la fosforilación de ERK, y en base a los objetivos que nos planteamos originalmente, evaluamos si el orden en el que se aplicara cada uno de estos estímulos tendría una repercusión sobre el nivel de la fosforilación de ERK.

En la figura 7 se muestra la fosforilación de ERK en respuesta a la pre-estimulación de linfocitos T humanos a través de CD43 o el TcR y la subsecuente co-activación a través del TcR o CD43. Se adicionó el primer estímulo (anti-CD43, L10 o anti-TcR, OKT3) para incubar a 37°C por periodos de tiempo de 0 a 120 minutos. Una vez concluida la

pre-activación (primer estímulo), se adicionó el segundo estímulo (anti-CD43, L10 ó anti-TcR, OKT3) y se incubaron todos los tubos por 5 minutos a 37°C. Los linfocitos T sin estimular se trataron de la misma forma pero sin la adición de anticuerpos. Una vez concluida la co-activación, las células se lisaron y los lisados celulares se separaron por SDS-PAGE y las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se evaluó la fosforilación de ERK (blot pERK) en función de cada uno de los protocolos de activación, verificando que todos los carriles tuvieran la misma cantidad de proteína (blot ERK2). Se muestra la figura representativa de tres experimentos realizados independiente. En cada uno de los experimentos todos los puntos corresponden a las células de un mismo individuo. En los paneles B y D, el carril 9 muestra la fosforilación de ERK, en respuesta a TPA (control positivo).

En linfocitos T sin estimular (figura 7A) no se indujo la fosforilación de ERK a 37°C; en este caso, solo a los 120 minutos se observa un pequeño incremento en la fosforilación de ERK. Este resultado indica que la manipulación a la que se someten las células durante el experimento no induce la fosforilación de la MAP cinasa ERK.

En la figura 7B se presenta la cinética de la fosforilación de ERK en respuesta a la pre-estimulación a través de CD43 y co-activación con el TcR. El aumento en la fosforilación de ERK1 y 2 es inmediato y alcanza un primer pico a los 2 minutos, para luego bajar entre los 5 y 15 minutos. Se nota un nuevo incremento a partir de los 30 minutos, con un máximo a los 60, para finalmente tener una reducción a los 120 minutos. En todos los casos se observa la fosforilación tanto de ERK1 como de ERK2.

En la figura 7C se muestra la fosforilación de ERK resultante del protocolo inverso, es decir, de la pre-estimulación con el TcR y la co-activación con CD43. En este caso, se observa solo una modesta inducción en la fosforilación de ERK2 a partir de los 2 minutos de estimulación, alcanzando un máximo a los 10 minutos, donde también se observa a ERK1 fosforilado. A los 15 minutos hay un decremento notorio en la fosforilación de ambas isoformas de ERK. A semejanza de lo que sucede estimulando primero a través de CD43 (Fig. 7B), cuando las primeras señales son aquellas generadas por el TcR se observa un segundo pico de fosforilación de ERK1 y 2 que se extiende de los 30 a los 60 minutos, para finalmente decrecer a los 120 minutos.

Con el propósito de verificar que en cada experimento las células del individuo respondieran a los estímulos individuales de manera semejante a lo descrito en la figura 6, se incluyeron células activadas únicamente a través de CD43 o el TcR. Como se observa en la Fig. 7D, la estimulación a través de CD43 induce la fosforilación de ERK 1 y 2 a partir de los 2 minutos de estimulación con un máximo a los 30 minutos, un

decremento a los 60 minutos y un aumento a los 120 minutos. En el caso de la estimulación individual través del TcR (figura 7E), el TcR solo induce la fosforilación de ERK2; dicha respuesta inicia a los 2 minutos de estimulación y se sostiene hasta los 120 minutos pero es menos intensa a la observada por la estimulación individual inducida por CD43 (comparar figuras 7D y 7E). Estos resultados son consistentes con los que se muestran en la figura 6.

Al comparar la fosforilación de ERK en respuesta al tratamiento individual con CD43, con la inducida por la pre-estimulación con CD43 y co-activación con el TcR (comparar figuras 7B y 7D), se observa un claro efecto positivo de la co-estimulación: la intensidad de la respuesta es mayor en el caso de la co-activación. Estos resultados sugieren que las señales co-estimuladoras generadas por el TcR favorecen a aquellas inducidas a través de CD43. Así mismo, la intensidad de las señales generadas por la pre-estimulación a través del TcR aumenta al adicionar el co-estímulo de CD43 (comparar figuras 7C y 7E), aunque cabe señalar que la intensidad de la fosforilación de ERK es mayor y más sostenida cuando el primer estímulo es CD43.

En conjunto, estos resultados muestran claras diferencias en cinética e intensidad de señales a nivel de la fosforilación de ERK en respuesta a dos protocolos de estimulación, lo que sugiere que la célula responde de manera diferencial, dependiendo del orden de adición de los estímulos.

5. La estimulación simultánea a través de CD43 y el TcR induce efectos similares a la adición de CD43 como primer estímulo a nivel de la fosforilación de ERK pero distintos a los generados por el TcR como primer estímulo.

Los resultados mostrados en la figura anterior fueron obtenidos estimulando linfocitos T con dos estímulos secuenciales. Sin embargo, también es cierto que no tenemos una noción exacta de cuales son los tiempos que una célula maneja para llevar a cabo todos estos contactos, por lo que, realizamos experimentos de activación simultánea a través de CD43 y el TcR para evaluar el efecto de dicha estimulación sobre la fosforilación de ERK (figura 8). Los linfocitos T fueron estimulados mediante la adición simultánea de los anticuerpos dirigidos contra CD43 y contra el TcR e incubados a 37°C por diferentes periodos de tiempo. Se evaluó la fosforilación de ERK y se verificó que hubiera cantidades equivalentes de proteína en todos los carriles con el blot anti-ERK.

En el caso de este individuo, las células sin estimular (figura 8A) mostraron un ligero aumento en la fosforilación de ERK como resultado de la manipulación experimental, muy inferior al obtenido cuando las células fueron estimuladas (comparar figuras 8A, B, C y D). En cambio, cuando los linfocitos T son estimulados simultáneamente a través de CD43 y el TcR (figura 8B), el incremento en la fosforilación de ERK2 es inmediato y se observa un pico máximo en la fosforilación de ERK 1 y 2 a los 2 minutos y 5 minutos, con una ligera reducción a los 10 y 15 minutos. A partir de los 30 minutos se observa un nuevo incremento en los niveles de fosforilación que también se observa a los 60 minutos para finalmente reducir a los 120 minutos. Este patrón de respuesta es muy semejante al que observamos cuando el primer estímulo está proporcionado por CD43 (Fig. 7B).

En las figuras 8C y 8D, se presentan las cinéticas de fosforilación de ERK que resultaron de la estimulación independiente a través de CD43 y el TcR. De manera similar a lo que observamos en las figuras 6 y 7 la estimulación de linfocitos T a través de CD43 induce la fosforilación de ERK 1 y 2 a partir de los 2 minutos y esta se sostiene hasta los 60 minutos para mostrar un decremento a los 120 minutos (figura 8C). En cambio, la estimulación a través del TcR solo induce la fosforilación de ERK2, a partir de los 2 minutos de estimulación y se sostiene hasta los 120 minutos (figura 8D), con una ligera tendencia a aumentar en función del tiempo.

Al comparar la fosforilación de ERK en respuesta al tratamiento individual con CD43 (figura 8C) o el TcR (figura 8D), con la inducción de la fosforilación de ERK por la estimulación simultánea a través de las mismas moléculas (figura 8), se nota un efecto positivo de la estimulación simultánea con respecto a la estimulación independiente, puesto que la intensidad en la fosforilación de ERK aumenta cuando los linfocitos T son estimulados simultáneamente a través de CD43 y el TcR con respecto a los estímulos independientes.

6. La estimulación simultánea a través de CD43 y el TcR tiene un efecto positivo sobre la inducción de la expresión de CD69.

a) Determinación de la dosis mínima de TPA necesaria para la inducción de CD69.

Trabajos previos de nuestro laboratorio mostraron que la estimulación de linfocitos T a través de CD43 induce la expresión de CD69 en presencia de TPA (Santana *et al* 2000). Sin embargo en esos experimentos no se determinó la dosis mínima de TPA necesaria para complementar las señales de CD43. Para definir las concentraciones mínimas a las cuales TPA no induce por si solo la expresión de CD69, se realizó una curva dosis-

respuesta estimulando 1×10^6 células con 0.01 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml y 50 ng/ml de TPA durante 18 horas a 37°C, después de lo cual, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-CD69 acoplado a fluoresceína y se analizaron por citometría de flujo. En la figura 9A, se observa que concentraciones de TPA de 0.01 ng/ml son incapaces de inducir la expresión de CD69, mientras que a partir de concentraciones de 1 ng/ml hasta 50 ng/ml se encuentran elevados los porcentajes de células positivas para CD69 (figuras 9B, C y D). Con base a estos resultados, los experimentos en los que se evaluó la expresión de CD69 en respuesta a CD43, el TcR o a la estimulación simultánea a través de ambas moléculas se realizaron adicionando TPA 0.01 ng/ml.

b) La estimulación simultánea a través de CD43 y el TcR acelera la inducción de la expresión de CD69.

Tanto las señales generadas por la estimulación a través de CD43 como del TcR conducen a la activación de los factores transcripcionales NFAT, NFκB y AP-1 entre otros, que a su vez están implicados en la regulación de genes que codifican para la expresión del marcador de activación CD69 (Santana *et al* 2000., Nel *et al* 2002). Una vez elegida la concentración mínima de TPA (0.01 ng/ml), se realizaron experimentos con el propósito de observar el efecto de la co-estimulación sobre la inducción de la expresión de CD69.

Los linfocitos T fueron estimuladas a través de CD43, el TcR ó estimulados simultáneamente a través de CD43 y el TcR para evaluar la inducción de la expresión de CD69. Se incluyeron células sin estimular y en todos los casos se suplementaron las células con TPA 0.01 ng/ml. Los linfocitos T se incubaron por diferentes periodos de tiempo a 37°C y se tiñeron con anti-CD69-FITC.

Como se observa en la figura 10, mediante el análisis de citometría de flujo de 3 experimentos se encontró que en las células sin estimular, suplementadas solo con TPA 0.01 ng/ml e incubadas desde 2 hasta 48 horas, no se indujo expresión de CD69. Esto confirma que el estímulo con TPA a esta concentración no es suficiente para activar a las células a nivel de la expresión de un marcador de activación en la superficie celular. La tendencia en los linfocitos T estimulados durante 2 horas a través de CD43, mostró que un 6% de la población analizada expresó el marcador de activación CD69 sobre la superficie celular. La estimulación a través del TcR, por el mismo periodo de tiempo, indujo un 8% de expresión y la estimulación simultánea con CD43 y el TcR resultó en un 71% de expresión de CD69. A las 12 horas, en respuesta al estímulo de CD43, el 22% de las células analizadas expresaban CD69. La estimulación con el TcR durante el mismo periodo de tiempo resultó en un 40% de expresión y la estimulación simultánea a las 12

horas permitió que el 80% de las células expresaran este marcador de activación. A las 24 horas, CD43 indujo un 32% de expresión de CD69 y el TcR un 54%, mientras que, la estimulación simultánea con ambas moléculas indujo un 98%. Finalmente, a las 48 horas de estimulación, los 3 tratamientos indujeron porcentajes similares en la expresión de CD69, ya que la mayor parte de las células mostraron este marcador de activación (97%, 96% y 98% por la estimulación con CD43, el TcR y la co-estimulación simultánea a través de las dos moléculas). Estos resultados muestran una cinética de expresión de CD69 más rápida en respuesta a dos estímulos adicionados simultáneamente (CD43 y el TcR), con respecto a la estimulación independiente a través de las mismas moléculas. La estimulación independiente a través del TcR induce porcentajes mayores a los inducidos por CD43. Por otra parte, a las 48 horas, independientemente del estímulo, la mayoría de las células expresan CD69. En conjunto, estos resultados sugieren que las señales de CD43 y el TcR se combinan de manera positiva y son más intensas que las generadas por cada una de las moléculas de manera aislada.

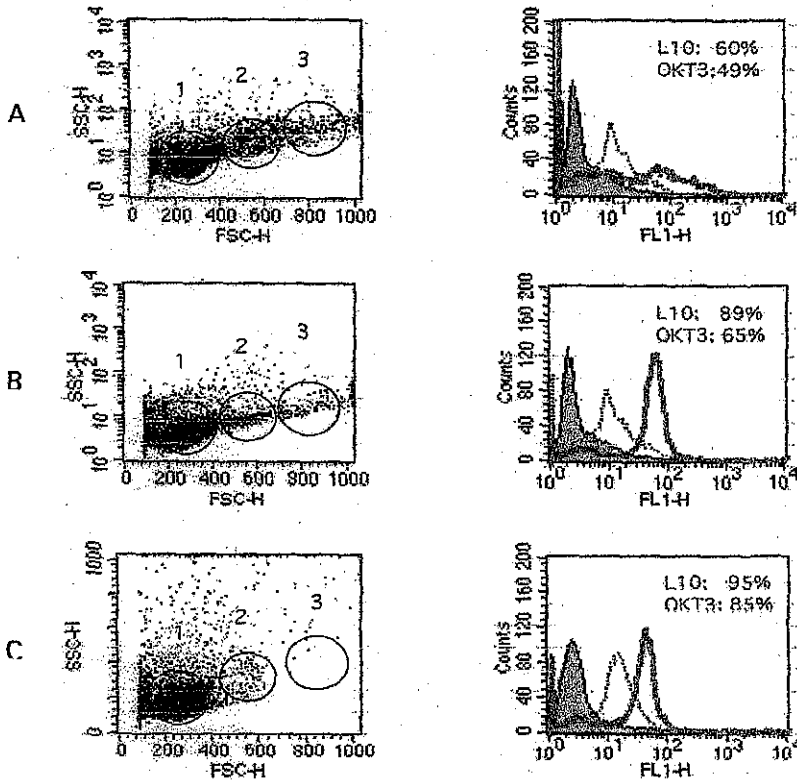


Fig. 4 Purificación de linfocitos T humanos a partir de concentrados linfocitarios. Concentrados linfocitarios se sometieron a un gradiente de ficoll para obtener células mononucleares (A), las células mononucleares se incubaron en placas durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂, las placas se lavaron y se obtuvo la población de células no adherentes (B), las células no adherentes a placas se incubaron durante 1 hora en columnas de lana de nylon pre-humedecidas en RPMI a 37°C y 5% de CO₂, se eluyó la población de linfocitos T con RPMI a 37°C (C). En todos los casos se muestra el histograma de granularidad (y) contra tamaño (x). En círculos se presentan las 3 poblaciones presentes en el inicio de la purificación: linfocitos (1), monocitos (2) y granulocitos (3). El análisis se realizó tomando la población total. Se muestra también el histograma de eventos (y) contra fluorescencia (x), donde se indica en verde la fluorescencia del control de isotipo, en rojo la de L10 y en azul la de OKT3.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

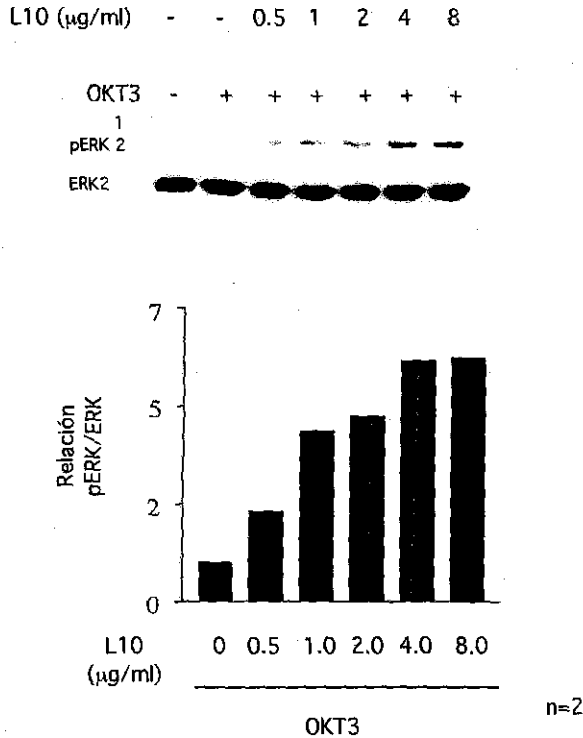
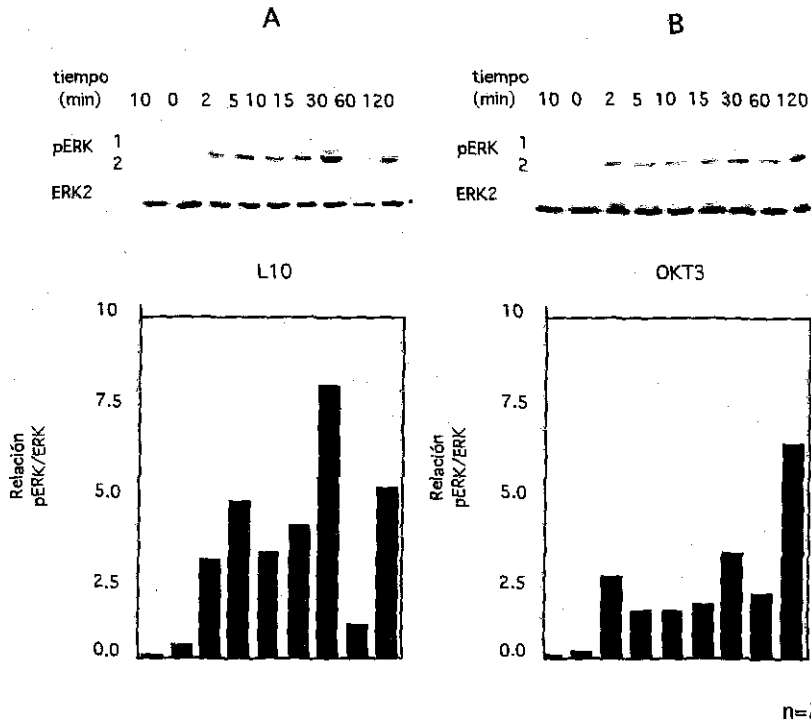


Fig. 5 La pre-estimulación de células T a través de CD43 incrementa la activación mediada por el TcR. 2×10^7 células T humanas fueron tratadas o no tratadas con diferentes concentraciones del anticuerpo anti-CD43, L10, por 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron y se estimularon por 5 minutos con el anticuerpo anti-CD3, OKT3, ($4 \mu\text{g/ml}$) a 37°C . Los extractos celulares totales (2×10^6 ceqs) se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con los anticuerpos anti-p-ERK o anti-ERK2. La intensidad de las bandas detectadas se determinó por densitometría. Se muestra la relación pERK/ERK de un experimento representativo de 2 realizados.



n=2

Fig. 6 La estimulación de linfocitos T humanos con CD43 o con el TcR induce la fosforilación de ERK. 1×10^7 células T humanas fueron tratadas con los anticuerpos (A) L10 y (B) OKT3 por diferentes periodos de tiempo a 37°C. El carril 1 corresponde a células sin estimular. Los extractos celulares totales (1×10^6 ceqs) fueron separados por SDS-PAGE, transferidos a membranas de nitrocelulosa e incubados con los anticuerpos anti-pERK y anti-ERK2. La intensidad de las bandas detectadas se determinó por densitometría. Se muestra la relación pERK/ERK de un experimento representativo de 2 realizados.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

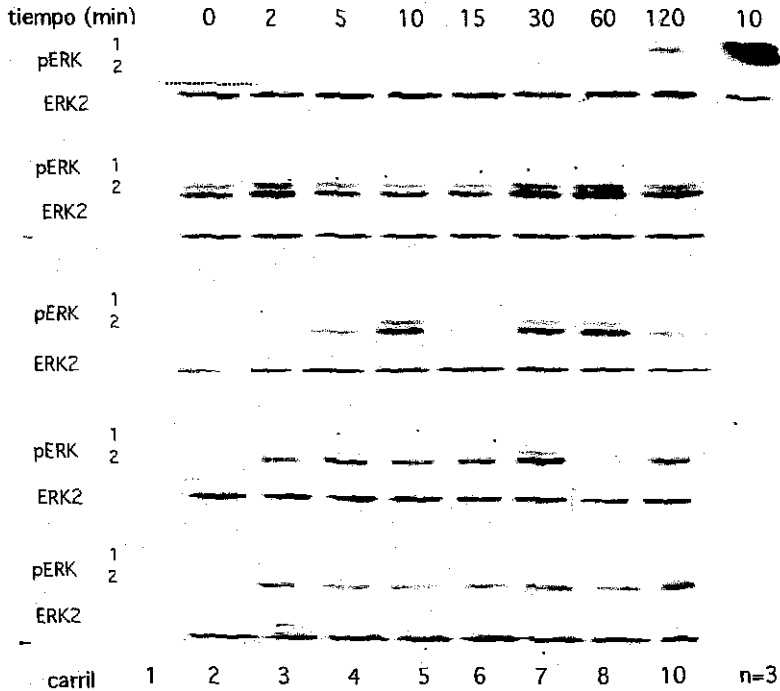


Fig. 7 El reclutamiento de CD43 previo a la estimulación a través del TcR induce una fosforilación de ERK más sostenida e intensa que el reclutamiento del TcR previo a la estimulación a través de CD43. 1×10^7 células T humanas fueron (A) no estimuladas, (B) pre-estimuladas con el anticuerpo L10 por diferentes periodos de tiempo a 37°C, lavadas y estimuladas por 5 min con el anticuerpo OKT3 a 37 °C, (C) pre-estimuladas con el anticuerpo OKT3 por diferentes periodos de tiempo a 37°C, lavadas y estimuladas por 5 min con el anticuerpo L10 a 37 °C, (D) pre-estimuladas con el anticuerpo L10 por diferentes periodos de tiempo a 37°C, lavadas e incubadas por 5 min sin estímulo a 37 °C, (E) pre-estimuladas con el anticuerpo OKT3 por diferentes periodos de tiempo a 37°C, lavadas e incubadas por 5 min sin estímulo a 37 °C. El carril 9 corresponde a células estimuladas con TPA. Los extractos celulares totales (1×10^6 ceqs) fueron separados por SDS-PAGE, transferidos a membranas de nitrocelulosa e incubados con los anticuerpos anti-pERK y anti-ERK. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.

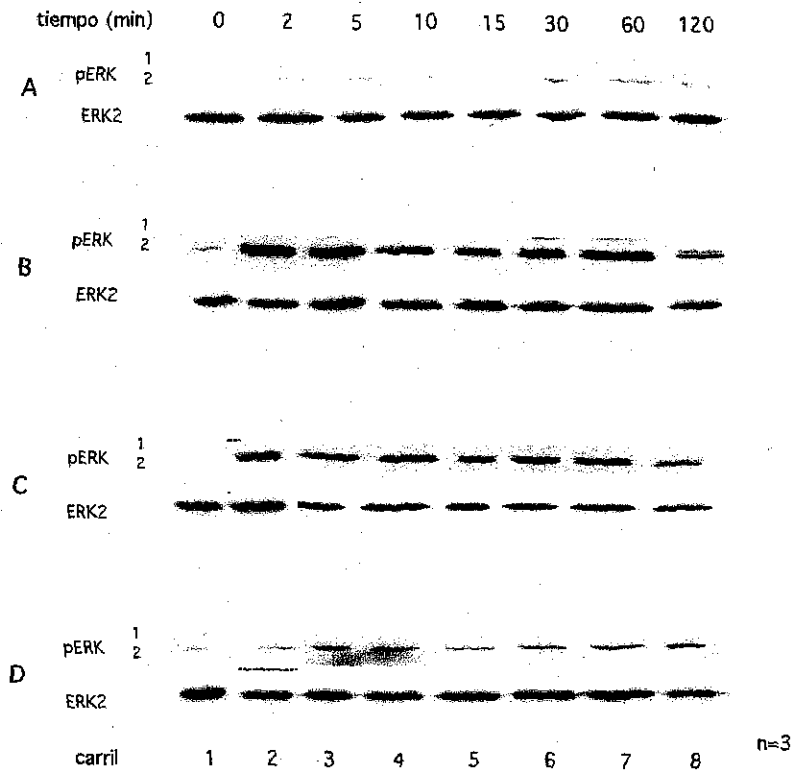
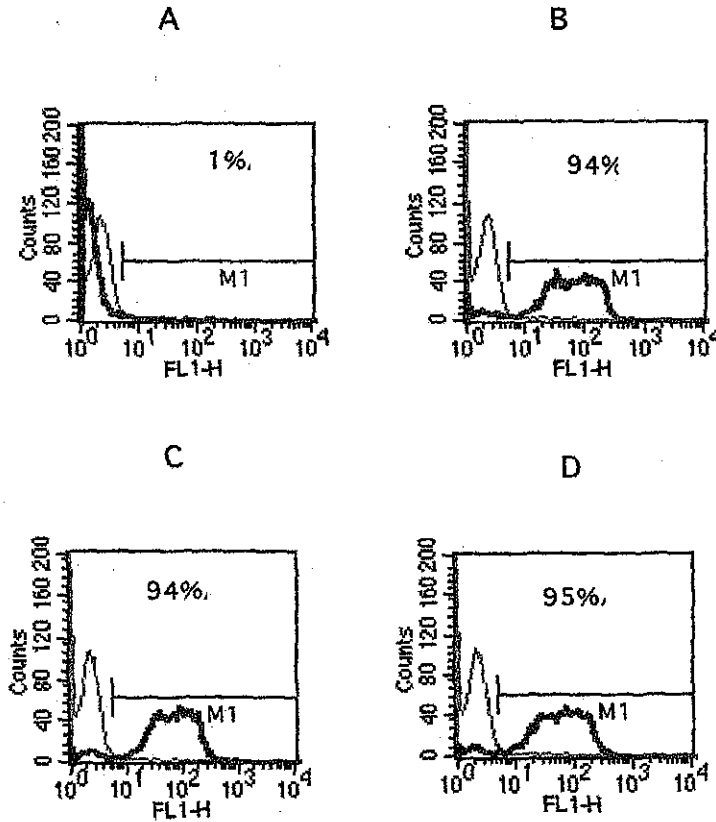


Fig. 8 La co-estimulación simultánea a través de CD43 y el TcR potencia la fosforilación de ERK. 1×10^7 células T humanas fueron (A) no estimuladas, (B) estimuladas simultáneamente con los anticuerpos L10 y OKT3 por diferentes periodos de tiempo a 37°C , (C) estimuladas con el anticuerpo L10, (D) estimuladas con el anticuerpo OKT3. Los extractos celulares totales (1×10^6 ceqs) fueron separados por SDS-PAGE, transferidos a membranas de nitrocelulosa e incubados con los anticuerpos anti-pERK y anti-ERK2. Se muestra un experimento representativo de 3 realizados.



n=2

Figura 9 Inducción de la expresión de CD69 en respuesta a la estimulación con TPA. 1×10^6 linfocitos T se activaron con (A) 0.01 ng/ml, (B) 1 ng/ml, (C) 10 ng/ml y (D) 50 ng/ml de TPA durante 18 horas a 37 °C, se tiñeron con un anticuerpo anti-CD69-FITC y se analizaron por citometría de flujo. Se presentan los histogramas de fluorescencia, en verde se indica la fluorescencia del control de isotipo y en azul la del anticuerpo anti-CD69-FITC. Se muestra un experimento representativo de 2 realizados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

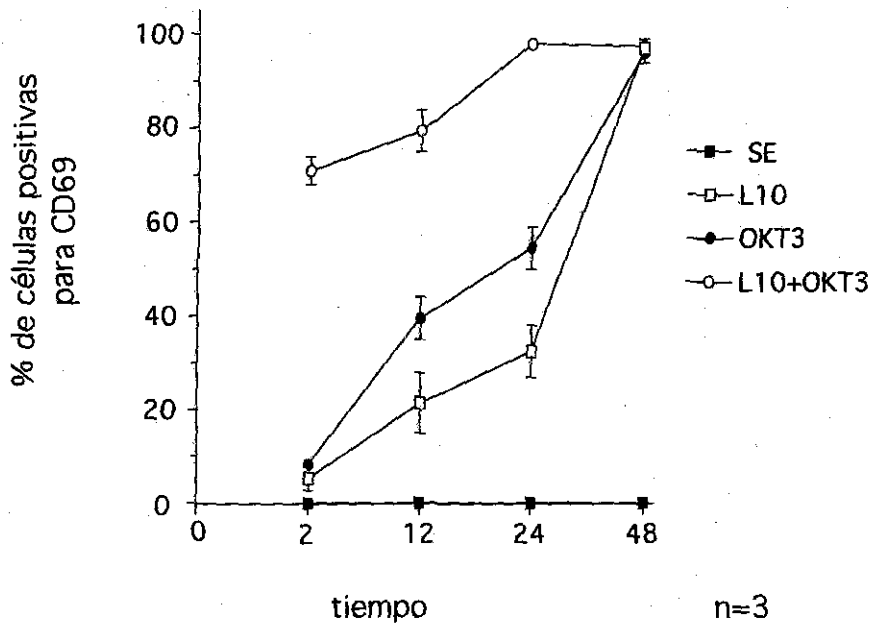


Fig. 10 La co-estimulación simultánea a través de CD43 y el TcR adelanta la inducción en la expresión de CD69. Se estimularon 1×10^6 células a través de CD43, el TcR o se co-estimularon simultáneamente a través de CD43 y el TcR por diferentes periodos de tiempo a 37°C y se tiñeron con un anticuerpo anti-CD69-FITC. Las células se analizaron por citometría de flujo. La gráfica muestra la media del porcentaje de células que expresaron CD69 en su superficie en 3 experimentos analizados. Se incluyeron células sin estimular. En todos los casos, las células se suplementaron con TPA 0.01 ng/ml.

DISCUSSION

DISCUSSION

V. DISCUSION

Los contactos entre dos células son de gran importancia ya que permiten desencadenar respuestas específicas dirigidas contra un agente patógeno particular. La activación de los linfocitos T es el resultado de la interacción del TcR con péptidos antigénicos presentados en la superficie de las APCs a través del MHC. La afinidad del TcR por los péptidos que le son presentados en el contexto de las moléculas MHC por la APC es baja ($K_a 10^4-10^7 M$) (Abbas *et al* 2000) y esta es una de las razones por las que es necesaria una segunda señal para generar una activación celular eficiente. Esta segunda señal está dada por la interacción de moléculas co-estimuladoras como CD2, CD4, CD8, CD28 y CD43 con sus contra-receptores sobre la APC (Bierer *et al* 1989).

Durante los primeros minutos de contacto con la APC, el linfocito T utiliza las moléculas accesorias o co-estimuladoras para adherirse a la APC (Yamada *et al* 1997). De manera concomitante, las interacciones entre las moléculas accesorias y sus contra-receptores generan señales que desencadenan la activación de cascadas de señalización intracelular que pueden o no convergir sobre algunos puntos como por ejemplo, la vía de las MAP cinasas. El reconocimiento específico de los péptidos antigénicos por el TcR así como las señales de las moléculas co-estimuladoras aumentan la concentración de intermediarios intracelulares como la MAP cinasa ERK, así como el reclutamiento de proteínas adaptadoras que funcionarán como plataforma para la formación de complejos de señalización eficientes (Tomlinson *et al* 2000).

Se sabe poco acerca de las señales que se generan previo al reconocimiento del antígeno por el TcR y se desconoce el orden y temporalidad en el que las moléculas co-estimuladoras interaccionan con sus contra-receptores. Se puede pensar que los primeros contactos entre el linfocito T y la APC se establecen a través de moléculas que participen en adhesión. El dominio extracelular de CD43 protruye 45 nm sobre la superficie celular por lo que es considerada la molécula más sobresaliente de la célula T, esto aunado al hecho que CD43 es la molécula más abundante de la superficie de los linfocitos T sugiere que los primeros contactos entre el linfocito T y la APC pudiesen ser establecidos a través de esta molécula. (Ostberg *et al* 1998).

En los experimentos que reportamos en esta tesis, evaluamos el reclutamiento de la MAPK, ERK y la expresión del marcador de activación CD69 en función de varios esquemas de activación de linfocitos T humanos purificados de sangre periférica de donadores sanos, activados a través de CD43 y el TcR.

La purificación de los linfocitos T humanos nos permitió trabajar con poblaciones celulares homogéneas (figura 4) y así facilitar la comparación de los resultados obtenidos de un donador a otro. Por otra parte, las concentraciones elegidas para la activación celular de los anticuerpos L10 y OKT3 concuerdan con las reportadas para la activación de linfocitos T a través de las mismas moléculas (figura 5) y la afinidad de estos anticuerpos se encuentra en el mismo rango ($K_a 10^9$). Cabe destacar que las diferencias en la intensidad de la fosforilación de ERK1/2 en los distintos experimentos pueden deberse a que las células con las que se realizaron cada uno de estos (figura 6 vs figura 7) provienen de donadores diferentes pero las tendencias en las respuestas observadas son similares de un donador a otro.

En conjunto, los resultados de los distintos protocolos de activación que mostramos, sugieren que en general, dos señales son mejor que una sola señal, tanto al nivel de la fosforilación de ERK1/2 como de la expresión de CD69. Las señales generadas a través de CD43 y el TcR son de una manera general, más elevadas en intensidad y prolongadas en el tiempo que aquellas inducidas a través de cada una de estas moléculas de manera independiente. Estos resultados confirman la teoría según la cual una célula necesita de por lo menos una segunda señal aunada a la estimulación mediada por el TcR

Los resultados que obtuvimos muestran claramente que los linfocitos T responden de manera diferencial dependiendo del orden en el que se induzca su activación. Al analizar la fosforilación de la MAP cinasa ERK, observamos que la pre-estimulación a través de CD43 y la subsecuente co-estimulación a través del TcR resulta en una fosforilación más sostenida y más rápida comparada con el procedimiento inverso, es decir, la pre-estimulación a través del TcR y como segundo estímulo CD43. En este caso, las respuestas son más transitorias a nivel de la fosforilación de ERK. Resulta interesante observar que si las señales del TcR y CD43 son suministradas simultáneamente, el efecto sobre el nivel de fosforilación de ERK1/2 es semejante al que se observa cuando las células son estimuladas primero a través de CD43 y luego con el TcR. En conjunto, lo anterior nos conduce a pensar que una función de CD43 como molécula co-estimuladora pudiese ser disminuir el umbral de señales requeridas para lograr una activación más eficiente a través del TcR.

ERK1 y ERK2 presentan diferentes velocidades de acumulación dependiendo de la molécula a través de la cual la célula T esté siendo activada. Existen datos que sugieren que diferencias cuantitativas en la cinética de acumulación y fosforilación de ERK inducen respuestas biológicas cualitativamente distintas. Al estimular linfocitos T a través del TcR con elevadas dosis de antígeno se induce un incremento en la expresión de CD69 y en la secreción de IL-2, mientras que dosis bajas de antígeno permiten la

secreción de IL-5 (Borovsky *et al* 2002). Se ha reportado que en timocitos de ratones deficientes de ERK1 (ERK1^{-/-}) con expresión normal de ERK2 se presenta una disminución en la proliferación inducida a través de la estimulación con el TcR, lo que indica un papel importante de ERK2 en la maduración de los timocitos (Pages G *et al* 1999). En este trabajo mostramos que la pre-activación a través de CD43 y co-activación con el TcR induce la fosforilación de ERK1 y 2 de manera inmediata, mientras que la pre-activación a través del TcR induce preferencialmente la fosforilación de ERK2 pero a tiempos más largos y con menor intensidad a la inducida con el tratamiento inverso. De manera semejante, la estimulación individual a través de CD43 induce la fosforilación de las dos isoformas de ERK y la estimulación con el TcR induce preferencialmente la fosforilación de ERK2 pero con una menor intensidad a la inducida a través de CD43. En conjunto, los datos que presentamos en este trabajo, podrían efectivamente desembocar en respuestas celulares distintas. Esta perspectiva será evaluada en experimentos futuros.

Las moléculas de superficie celular en respuesta a un estímulo dado se consideran como marcadores de activación. La molécula de superficie CD69 se expresa sobre la superficie de linfocitos T y B, células NK, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos en respuesta a diferentes estímulos, entre los que se incluyen la estimulación a través del TcR y de CD43 (Pedraza *et al* 1998; Testi *et al* 1989). La expresión de CD69 requiere la activación de PKC y de las MAP cinasas como ERK1/2, así como elevadas concentraciones de calcio intracelular y la activación de factores transcripcionales como NFκB, NFAT y AP-1. (Villalba *et al* 2000).

Los experimentos en los que evaluamos la fosforilación de ERK fueron realizados en función de protocolos de activación en los que las células fueron activadas por dos horas con el primer estímulo y posteriormente por 5 minutos con el segundo estímulo. Este protocolo es seguramente muy arbitrario, pero se basa en el hecho de que actualmente se piensa que un linfocito T puede establecer una serie de contactos casuales de los cuales percibe las señales del medio circundante y acumula información. En función de las señales generadas por las distintas moléculas co-receptoras y del TcR, así como de la intensidad de estas, el linfocito T "decide" activarse o no. Basándonos sobre el hecho que en los experimentos en los que evaluamos la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a diferentes protocolos de activación (figuras 7 y 8), encontramos que el patrón de fosforilación de esta MAPK cuando el primer estímulo estaba proporcionado por CD43 y el segundo por el TcR (figura 7) era muy semejante al obtenido al aplicar ambos estímulos simultáneamente (figura 8), evaluamos la expresión de CD69 en respuesta a este último protocolo de activación. Los resultados mostrados en cuanto a la expresión de CD69 en respuesta al estímulo simultáneo a través de CD43 y el TcR, corroboran los resultados obtenidos a nivel de la fosforilación de ERK1/2. La cinética de expresión de

CD69 es más rápida en aquellas células que fueron estimuladas a través del TcR y CD43 simultáneamente comparada con células estimuladas a través del TcR o CD43 de manera independiente. De una manera general, las células estimuladas a través del TcR responden más rápidamente que las células estimuladas a través de CD43, en lo que se refiere a la expresión de CD69 (en promedio dos veces más células comprometidas en cada tiempo estudiado), sin embargo, a las 48 horas, independientemente del estímulo, todas las células expresan CD69. El retraso en la cinética de expresión de esta molécula marcadora de activación en respuesta a la estimulación con CD43 y el TcR de manera independiente podría ser un reflejo del tiempo requerido para la acumulación de intermediarios de señalización que disminuyan el umbral necesario para la activación. De manera que los eventos de señalización generados por CD43 y el TcR se acumulan gradualmente. Otra posibilidad es que la estimulación individual induzca activación diferencial en las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, de manera que a las 48 horas se logre comprometer a la población total.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que:

- Para el caso de la estimulación a través de CD43 y el TcR dos señales inducen un nivel de respuesta más elevado que una señal sola.
- El orden en el que son aplicados los estímulos incide sobre la magnitud y duración de la respuesta y muy probablemente sobre la respuesta celular.
- El hecho que dos señales incidán sobre un mismo punto (ERK1/2, CD69) no significa necesariamente que la respuesta por parte de la célula sea la misma cuando las dos señales son aplicadas consecutiva o simultáneamente.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

VII. PERSPECTIVAS DE ESTE TRABAJO

- Evaluar nuevamente la expresión de CD69 en respuesta a distintos protocolos de activación, ya que los resultados que se presentan en este trabajo fueron obtenidos estimulando a las células con dos estímulos aplicados simultáneamente.
- Evaluar el reclutamiento de factores transcripcionales como NFAT y NFκB en respuesta a los distintos protocolos de activación.
- Evaluar los mismos protocolos de activación en diferentes subpoblaciones de linfocitos T (CD4⁺ vs CD8⁺).
- Evaluar la respuesta de linfocitos T a las señales generadas a través de otros pares de moléculas de la superficie celular como CD28 y CD2.

APENDICE

Proteínas señalizadoras mencionadas en este trabajo

MOLECULA	TIPO DE MOLECULA	FUNCION
CD2	Co-receptora	Aumenta la adhesión y señalización de la célula T al reconocer a su ligando.
CD4	Co-receptora	Miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas; se une a MHC II y se asocia con Lck.
CD8	Co-receptora	Miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas; se une a MHC I y se asocia con Lck.
CD43	Co-receptora	Posee un dominio extracelular altamente glicosilado, regula adhesión y señalización.
ERK	MAP cinasa	Regula factores de transcripción
Fyn	Cinasa de tirosinas	Miembro de la familia Src. Tiene un dominio SH3 y SH2, se asocia al complejo TcR
Galectina-1	Lectina	Participa en la selección de timocitos.
Grb2	Proteína adaptadora	Tiene un dominio SH3 carboxilo-terminal y un SH2 central; se une a Shc y Sos y regula la vía de Ras.
Lck	Cinasa de tirosinas	Miembro de la familia Src; tiene un dominio SH3 y uno SH2. Se asocia con 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 un dominio SH2.
Ras	GTPasa	Hidroliza GTP. Activada por Sos, activa la vía de Raf/MAPK.
Rac	GTPasa	Al activarse genera lamelopodios.
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 GEF de Ras y se une a Grb2.
Syk	Cinasa de tirosinas	Miembro de la familia Syk, tiene dos dominios SH2
TcR/CD3	Receptor de linfocitos T	Específico para el antígeno.
Vav	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina	Es GEF de Rac.
ZAP-70	Cinasa de tirosinas	Se asocia con los ITAMs de la cadena ζ .

REFERENCIAS

REFERENCIAS

VIII. REFERENCIAS

- Abbas A. *et al.* 2000. Cellular and molecular immunology. 4th. Edition. Saunders Company. Pp.42, 107.
- Abramson J. *et al.* 1995. Role of the sialophorin (CD43) receptor in mediating influenza a virus-induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction. *Blood*. 85:1615.
- Alvarado M. *et al.* 1995. MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation. *Eur J Immunol*. 5:1051.
- Allenspach EJ. *et al.* 2001. ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity*. 15: 739.
- Anzai N. *et al.* 1999. Modulation of integrin function in hematopoietic progenitor cells by CD43 engagement: possible involvement of protein kinase and phospholipase C-gamma. *Blood*. 93: 3317.
- Avruch J. *et al.* 2001. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Resent Prog Horm Res*. 56: 127.
- Axelsson B. *et al.* 1988. Induction of aggregation and enhancement of proliferation and IL-2 secretion in human T cells by antibodies to CD43. *J Immunol*. 141: 2912.
- Baclay A. N. *et al.* 1997. The leucocyte antigen. Facts book. 2nd edit. By Academy Press. 238-239.
- Bagriacik E. *et al.* 2001. CD43 potentiates CD3-induced proliferation of murine intestinal intraepithelial lymphocytes. *Immunol Cell Biol*. 79: 303.
- Baldar CT. *et al.* 1999. Lymphocyte antigen receptor signal integration and regulation by the SHC adaptor. *Biol Chem*. 380: 129.
- Baum LG. *et al.* 1995. Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, wich binds the core 2-O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J Exp Med*. 181: 877.
- Berridge A. *et al.* 1997. Lymphocyte activation in health and disease. *Crit Rev Immunol*. 17:155.

Bierer B. *et al.* 1989. The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Annu Rev Immunol.* 7:579.

Borovsky Z. *et al.* 2002. Serial triggering of T cell receptors results in incremental accumulation of signaling intermediates. *J. Biol. Chem.* 277: 21529.

Boyum A. *et al.* 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 21: 77.

Cebrián M. *et al.* 1988. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med.* 168: 1621.

Cermák L. *et al.* 2002. Molecular mechanism involved in CD43-mediated apoptosis of TF-1 cells. *J Biol Chem.* 277: 7955.

Clements JL. *et al.* 1999. Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins. *Annu Rev Immunol.* 17: 89.

Cosulich ME. *et al.* 1987. Functional characterization of an antigen involved in early steps of T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 4205.

De Maria R. *et al.* 1994. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *J Exp Med.* 180:1999.

De Smet W. *et al.* 1993. A new monoclonal antibody induces homotypic aggregation of human leukocytes through a CD11a/CD18-dependent and independent mechanism. *Immunology.* 79: 46.

Ellies L. *et al.* 1996. The CD43 130-KDa peripheral T-cell activation antigen is downregulated in thymic positive selection. *Blood.* 88: 1725.

Ficoll-Paque: For in vitro isolation of lymphocytes (booklet). Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden. 1983

Fratuzzi C. *et al.* 2000. A macrophage invasion mechanism for mycobacteria implicating the extracellular domain of CD43. *J Exp Med.* 192: 183.

- Gardner P. *et al.* 1989. Calcium and T lymphocyte activation. *Cell*. 59: 15-20.
- Gavioli R. *et al.* 1992. CD69 molecule in human neutrophils: its expression and role in signal-transducing mechanisms. *Cell Immunol*. 142: 186.
- Germain R. *et al.* 1999. The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol*. 17: 467.
- Gerosa F. *et al.* 1991. Interferon alpha induces expression of the CD69 activation antigen in human resting NK cells, while interferon gamma and tumor necrosis factor are ineffective. *Int J Cancer*. 48: 473.
- Giordanengo V. *et al.* 1995. Autoantibodies directed against CD43 molecules with an altered glycosylation status on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected CEM cells are found in all HIV-1+ individuals. *Blood*. 86: 2302.
- Green JM. *et al.* 1994. Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity*. 1:501.
- Hara T. *et al.* 1986. Rapid induction of a phosphorylated 28 KDa/32 KDa disulfide-linked early activation antigen (EA1) by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. *J Exp Med*. 164:1988.
- Hartnell A. *et al.* 1993. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology*. 80: 281.
- Heyde H. *et al.* 2000. CD2 (OKT11) augments CD3-mediated intracellular signaling events in human T lymphocytes. *J Inv Med*. 48: 102.
- Ibraghimov. AR. *et al.* 1994. Heterogeneity and biased T cell receptor alpha/beta repertoire of mucosal CD8+ cells from murine large intestine: implications for functional state. *J Exp Med*. 180: 433.
- Jenkins M. *et al.* 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med*. 165: 302.
- Jhonson G. *et al.* 1999. Anti-CD43 monoclonal antibody L11 blocks migration of T cells to inflamed pancreatic islets and prevents development of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 163: 5678.

- Jorgens. *et al.* 1992. Molecular components of T-cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 10: 835.
- Kane L. *et al.* 2000. Signal transduction by TCR for antigen. *Curr Op Immunol.* 12:242.
- Lanier LL. *et al.* 1988. Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu23 activation antigen. *J Exp Med.* 167: 1572.
- Llera A. *et al.* 2001. Crystal structure of the C-type lectin-like domain from the human hematopoietic cell receptor CD69. *J Biol Chem.* 276:7312.
- Manjunath N. *et al.* 1993. Targeted disruption of CD43 gene enhances T lymphocyte adhesion. *J Immunol.* 151: 1528.
- Manjunath N. *et al.* 1995. Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature.* 377: 535.
- Marzio R. *et al.* 1997. Expression and function of the early activation antigen CD69 in murine macrophages. *J Leuk Biol.* 62: 349.
- McEvoy LM. *et al.* 1997. Anti-CD43 inhibition of T cell homing. *J Exp Med.* 185: 1493.
- Meinl E. *et al.* 2000. Differential requirement of ZAP-70 for CD2-mediated activation pathways of mature human T cells. *J Immunol.* 165: 3578.
- Miura Y. *et al.* 2001. Adhesion via CD43 induces Syk activation and cell proliferation in TF-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 288: 80.
- Nel AE. *et al.* 2002. T cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *J Allergy Clin Immunol.* 109: 758.
- Ostberg J. *et al.* 1998. The roman god Janus: a paradigm for the function of CD43. *Immunol today.* 19: 546.
- Pages G. *et al.* 1999. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science.* 286: 1374.

- Parkman R. *et al.* 1981. Surface protein abnormalities in lymphocytes and platelets from patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet*. ii: 1387.
- Pedraza-Alva G. *et al.* 1996. CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to fyn kinase. *J Biol Chem*. 271: 27564.
- Pedraza-Alva G. *et al.* 1998. T cell activation through the CD43 molecule leads to vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation. *J Biol Chem*. 273: 14218.
- Pedraza-Alva G. *et al.* 2001. Regulation of Cbl molecular interactions by the coreceptor molecule CD43 in human T cells. *J Biol Chem*. 276: 729.
- Remold-O'Donnell E. *et al.* 1997. Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*. 70:104.
- Reynolds LF. *et al.* 2002. Vav 1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C-gamma 1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and independent pathways. *J Exp Med*. 195: 1103.
- Rincón M. *et al.* 2001. MAP-kinase signaling pathways in T cells. *Curr Opin Immunol*. 13: 339.
- Risso A. *et al.* 1991. CD69 in resting and activated T lymphocytes. Its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. *J Immunol*. 146: 4105.
- Rosenkranz AR. *et al.* 1993. Induction of neutrophil homotypic adhesion via sialophorin (CD43), a surface sialoglycoprotein restricted to haemopoietic cells. *Immunology*. 80: 431.
- Rosenstein Y. 1999. *et al.* CD43 a molecule with multiple functions. *Immunol Res*. 20:89.
- Rosenstein Y. *et al.* 1991. CD43, a molecule defective in the Wiskott-Aldrich syndrome, bind ICAM-1. *Nature*. 354-233.
- Samelson LE. *et al.* 2002. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu Rev Immunol*. 20: 371.

- Sánchez Mateos P. *et al.* 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.
- Santana A. *et al.* 2000. CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NF κ B transcription factors in human T lymphocytes. *J Biol Chem*. 275: 31460.
- Santis AG. *et al.* 1992. Tumor necrosis factor α induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway. *Eur J Immunol*. 22: 1253.
- Schaeffer H. *et al.* 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol and Cell Biol*. 19(4): 2435.
- Serrador J. *et al.* 1998. CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood*. 91: 1.
- Seveau S. *et al.* 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 Sc*. 110: 1465.
- Stöckl J. *et al.* 1996. Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class 1 molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation. *J Exp Med*. 184: 1769.
- Stockton BM. *et al.* 1998. Negative regulation of T cell homing by CD43. *Immunity* 9: 373.
- Testi R. *et al.* 1989. Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering: requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca⁺⁺] and activation of PKC. *J Immunol*. 142: 1854.
- Testi R. *et al.* 1990. CD69 is expressed on platelets and mediated platelet activation and aggregation. *J Exp Med*. 172:701.
- Thien C. *et al.* 2001. Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases. *Nature*. 2: 294.

Tomlinson M. *et al.* 2000. Lymphocytes with a complex: adapter proteins in antigen receptor signaling. *Immunol Today*. 21: 584.

Villalba M. *et al.* 2000. Vav modulation of the Ras/MEK/ERK signaling pathway plays a role in NFAT activation and CD69 up-regulation. *Eur. J. Immunol.* 30:1587.

Wong R. *et al.* 1990. Signal transduction via leukocyte antigen CD43 (sialophorin) feedback regulation by protein kinase C. *J Immunol.* 144: 1455.

Woodman RC. *et al.* 1998. The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice. *J Exp Med.* 188: 2181.

Yamada K. *et al.* 1997. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Op Cell Biol.* 9: 76.

Yokoyama W.M. *et al.* 1988. Characterization of a cell surface expressed disulfide-linked dimer involved in murine T cell activation. *J Immunol.* 141:369.

Zhong XP. *et al.* 2002. Regulation of T cell receptor induced activation of the Ras-ERK pathway by diacylglycerol kinase zeta. *J. Biol. Chem.* press