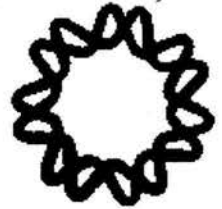




00591



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

*PARTICIPACIÓN DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS CINASAS C
(PKC) EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA
MOLÉCULA CD43 EN CÉLULAS T*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

DOCTORA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

M. EN C. ROXANA DEL RÍO GUERRA

CUERNAVACA, MORELOS

DICIEMBRE 2004



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.

Asesor de Tesis

Dr. Gustavo Pedraza Alva

Comité Tutorial

Dra. Yvonne Rosenstein A.

Dra. Rosario Vera Estrella

Dr. Carlos Rodales Ledezma

**JURADO DE EXAMEN PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

Presidente: Dra. Susana López Charretón

Secretario: Dr. Gustavo Pedraza Alva

Vocal: Dra. Angélica Santana Calderón

Vocal: Dr. Humberto Lanz Mendoza

Vocal: Dra. Martha Robles Flores

Suplente: Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama

Suplente: Dra. Judith González Christen

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por su lucha incansable hacia el conocimiento, la verdad, la libertad.

AI INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM por todos estos años de formación, mi más profundo agradecimiento.

A los miembros de mi comité tutorial por todas sus críticas, sus consejos, sus enseñanzas.

A los miembros del jurado de exámen por las valiosas recomendaciones a mi trabajo.

AI CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACyT) por la beca otorgada durante mi doctorado.

AGRADECIMIENTOS

A LA DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY

Por permitirme formar parte de su grupo...ifué un honor!. Por estos años de aprendizaje-enseñanza tan amenos y por todas las discusiones tan productivas acerca de CD43, de señalización intracelular, de contactos células T-APC y muchas otras cosas más.

A mis compañeros y amigos, que muchas veces los mareé con mis "ensayos de tutorales", por aquellos con quienes pude discutir muchísimas veces mis resultados (quizá no llegabamos a nada, ipero era padrísima la discusión!), por las discusiones en los "Journal Clubs". En especial a: Mario E. Cruz, Norma Olivares, José Luis Montiel, Nora Fierro, Haydeé Ramos, Lily Mérida, Angélica Santana, Denhí Schnabel, Enrique Salas, Laura Ramírez, Veronica Ramos, Ma. del Rayo Sanchez, Aleph Prieto...

Por las idas al cine, al gimnasio, a comer, al tepozteco y a los que hicieron muy amena mi vida durante mi doctorado, va mi agradecimiento sincero. Aparte de los mencionados arriba: Gisela Granados, Angel Flores, Mariana Fregoso, Lucía Perezgasga, Diana Escalante, Rocío Rodríguez, Esther Layseca, Ignacio López, Antonio Martínez, Takuya Nishigaki, Christopher Wood (Chris), Nena Silva...

A mis amigos y hermanos, que aunque no discutí nada con ellos acerca de CD43, señalización, ni nada que ver con Inmunología, siempre estuvieron ahí, apoyándome, hablándome por teléfono para que continuara con ésto: Heberto del Rio, Susana Castro, Gabriel del Rio y Luisa Stelling.

Aquellos a quienes no menciono, pero que estan tatuados en el alma.

!!!GRACIAS!!!

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

Es imposible no agradecerle al DR. GUSTAVO PEDRAZA ALVA.

Y estas son algunas de las razones por las que va mi agradecimiento:

- 1) Por haber dicho que SI aceptabas ser mi asesor de doctorado, sabiendo que podría ser dura la tarea.
- 2) Por todo lo que me quisiste enseñar sobre CD43, señalización, Inmunología, etc., y por todo lo que te aprendí sin que te dieras cuenta.
- 3) Por todo el tiempo que dedicaste para mi formación; por no haberme "defendido" durante mis exámenes tutorales (¡al menos durante las presentaciones!); por las pláticas tan constructivas (y también de "levantada de ánimo") después de cada tutorial; por tener la paciencia de leer una y otra vez mis escritos para tutorales, congresos, etc.
- 4) Por no haber fallado a ninguno de mis tutorales (ni de mis ensayos "pre-tutorales"), pese a que no estabas viviendo en Cuernavaca.
- 5) Por echarme la mano con los marcajes *in vivo*.
- 6) Por todas las discusiones cibernéticas y por teléfono que tuvimos acerca de mi proyecto de doctorado. Por todas tus sugerencias a mi proyecto.
- 7) Por tener la paciencia de leer cada "mail desesperado", diciéndote que estaba atorada en algo, pidiendo tu opinión, cuál podría ser el significado de algún resultado, etc....y por supuesto, por tener la paciencia de "limpiar" tu correo después de haberlo saturado con mis "mails desesperados".
- 8) Por todo el tiempo que invertiste leyendo/analizando y enviándome correos con los PDF's de algún artículo interesante/nuevo relacionado a mi trabajo. Por leer y discutir conmigo "casi" todos los artículos que te envié sobre PKC θ , PKC's y demás.
- 9) Por tu entusiasmo hacia mi trabajo, y por tu entusiasmo hacia la Ciencia en general...¡Es contagioso!
- 10) Gracias por que además de haber sido mi asesor, has sido mi amigo...y creo que esto, no siempre se logra.

¡GRACIAS POR COMPARTIR EL GUSTO DE APRENDER, DE HACER CIENCIA, DE DISFRUTAR CON LA INMUNOLOGIA!!

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mis dos grandes amores: mis dos Alejandro. Sin su ayuda, comprensión, cariño, paciencia, jamás lo hubiera logrado...

Alejandro Jiménez del Rio

Alejandro Jiménez Hernández

Gracias por el tiempo compartido...sin segundos, sin horas, sin días, sin años.....gracias por estar a mi lado en la eternidad.

Roxana del Rio Guerra

A LA MEMORIA DE MI PAPA

Dr. Eustolio del Rio Tapia (1923-2004)

...desde SIEMPRE....y...hasta SIEMPRE....

Gracias papi por haberme enseñado que el conocimiento no siempre implica un razonamiento lógico. Gracias también por haberme enseñado que la comunicación puede prescindir del lenguaje escrito y del oral.....Me conoces tan bién, que te fuiste con la certeza que seguiríamos en comunicación,.....no hizo falta una despedida.

No hacen falta ni la vista ni el oído para saber que estás ahí, que me escuchas...compartimos un lenguaje propio.

Roxana del Rio Guerra

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
GLOSARIO	1
RESUMEN	3
I.- INTRODUCCION	
1.1.- Generalidades del Sistema Inmune y de la Respuesta Inmune	5
1.2.- Activación de células T	7
1.2.1- Diferenciación Th1/Th2	8
1.2.2.- Eventos bioquímicos	9
1.2.3.- Polarización y redistribución de moléculas en la superficie celular durante el reconocimiento antigénico	12
1.3.- Papel de las moléculas co-receptoras	13
1.3.1.- La molécula co-receptora CD43	14
1.3.2.- Ligandos de CD43	15
1.3.3.- Mecanismos de señalización inducidos a través de CD43	17
1.4.- Quiénes son las PKC?	
1.4.1.- Familia y dominios estructurales	20
1.4.2.- Regulación por fosforilación	22
1.4.3.- Regulación por cofactores	24
1.4.4.- Regulación por localización	25
1.5.- Célula T y PKC θ	
1.5.1.- PKC θ regula distintas vías de señalización	27
1.5.2.- PKC θ y el citoesqueleto de células T	29
1.6.- Bibliografía	31
II.- ANTECEDENTES	39
III.- HIPOTESIS DE TRABAJO	41
IV.- OBJETIVOS	
4.1.- Objetivo general	42
4.2.- Objetivos específicos	42
4.2.1.- Determinar cuáles isoformas de PKC son afectadas en células T en respuesta al entrecruzamiento a través	

de CD43	42
4.2.2.- Establecer relaciones funcionales entre CD43 y PKC	43
V.- RESULTADOS	
5.1.- Resultados publicados: PKC θ is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement	44
5.2.- Resultados no publicados: CD43 promueve su relocalización en la membrana plasmática al inducir la fosforilación de ERM por PKC θ	
Resumen	56
Introducción	56
Materiales y Métodos	60
Resultados	65
Discusión	69
Bibliografía	71
Figuras	74
Pies de figuras	78
VI.- CONCLUSIONES GENERALES	
	80
VII.- PERSPECTIVAS	
	81

GLOSARIO

aa	Aminoácido
Ac	Anticuerpo
AcMo	Anticuerpo Monoclonal
APC	Célula Presentadora de Antígeno
BCR	Receptor para Antígenos de Células B
BCS	Suero Bovino de Recién Nacido
DAG	Diacilglicerol
DPC	Complejo Distal Polar
EMSA	Ensayo de Movilidad Electroforética
ERM	Ezrina-Radixina-Moesina
FCS	Suero Fetal Bovino
HRP	Peroxidasa de rábano
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferón
kDa	KiloDaltones
MAPK	Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
NaN ₃	Azida de Sodio
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
PKC	Proteínas Cinasas C
αPKC	PKC atípicas
cPKC	PKC clásicas o convencionales
nPKC	PKC nuevas

PLC Fosfolipasa C
PMA Forbol Miristato Acetato (éster de forbol)
PMSF Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoruro
PS Fosfatidil Serina
p/v Peso/Volumen
SDS-PAGE Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en
condiciones desnaturalizantes
SI Sinápsis Inmunológica
SMAC Complejo Supramolecular de Activación
T amb Temperatura ambiente
TCR Receptor para Antígenos de Células T
TNF Factor de Necrosis Tumoral

RESUMEN

La activación de los linfocitos T está controlada por las señales generadas a través del Receptor para Antígenos de Células T en combinación con las señales inducidas por las moléculas accesorias que interactúan con sus contra-receptores presentes en la superficie de las Células Presentadoras de Antígenos. Esta activación lleva a la reorganización del citoesqueleto de actina que trae consigo la redistribución de proteínas de membrana y de moléculas de señalización. Estos fenómenos tempranos de activación celular promueven la proliferación y la diferenciación celular así como la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune.

La molécula co-receptora CD43 se expresa abundantemente en la superficie de las células T y participa en eventos de proliferación y diferenciación celular, de apoptosis, así como en eventos de adhesión y de migración celular. A nivel molecular, CD43 promueve señales que llevan a la asociación y activación de las cinasas de tirosina de la familia Src, Fyn y Lck. Además, la estimulación de células T a través de CD43 induce el reclutamiento y activación de PLC γ , evento relacionado con la generación de IP $_3$ y de DAG, por consiguiente la elevación de los niveles de Ca $^{+2}$ intracelular y la activación de PKC, entre otros eventos.

En células T, la activación de PKC es esencial en los procesos de activación, diferenciación, adhesión y migración, así como en los eventos relacionados a la sobrevivencia celular.

En este trabajo mostramos que, en células T, el entrecruzamiento de CD43 promueve la translocación a la membrana de PKC α/β , ϵ , θ , ζ y μ , e induce la actividad enzimática de PKC α/β y PKC θ . Además, la activación de PKC θ , pero no la de PKC α/β , se requiere para inducir la expresión de CD69 en respuesta a CD43, al promover la activación de los factores transcripcionales AP-1 y NF- κ B por un mecanismo dependiente de ERK, y a la activación de NFAT por un mecanismo independiente de ERK. En conjunto, estos resultados sugieren que PKC θ tiene un papel crítico en las funciones coestimuladoras de CD43 en células T humanas [1]. Por otra parte, la activación de PKC θ en respuesta al entrecruzamiento de CD43, es necesaria para la fosforilación de ERM y para la relocalización de CD43 a un punto particular de la membrana. Esto sugiere que PKC θ también participa en los procesos de adhesión y migración inducidos por CD43 en linfocitos T.

En resumen, nuestros datos sugieren que la activación de las diferentes isoformas de PKC tienen un papel importante en las funciones de CD43 en linfocitos T humanos y probablemente en otras células del sistema hematopoyético.

I.- INTRODUCCION

1.1.- GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNE Y DE LA RESPUESTA INMUNE

El sistema inmune provee al organismo la capacidad para discriminar entre lo propio y lo extraño, y de responder rápida y específicamente en contra de un sinnúmero de microorganismos potencialmente patógenos que cohabitan en el mismo nicho biológico (virus, bacterias, hongos, parásitos, etc.). Estos mecanismos de protección contra microorganismos patógenos incluyen barreras físicas (piel, mucosas, etc.), sustancias secretadas por diferentes células (cebas, eosinófilos, neutrófilos y macrófagos), y eliminación del patógeno por fagocitos (neutrofilos y macrófagos) o su destrucción por células asesinas naturales. En conjunto, estos mecanismos de defensa son los que constituyen la Inmunidad Natural o Innata. Todos estos sistemas de protección se encuentran en el organismo antes de la exposición al agente patógeno invasor y carecen de selectividad y especificidad.

Además de estos mecanismos protectores, los organismos superiores (a partir de vertebrados) han desarrollado sistemas de protección que son inducidos por la exposición a sustancias extrañas o antígenos, éstos constituyen la Inmunidad Específica o Adquirida, la cuál es exquisitamente selectiva, específica y con "memoria", esto significa que en un segundo encuentro con el agente que la provocó, la velocidad, la intensidad y la especificidad de la respuesta es mayor.

La respuesta inmune específica se ha clasificado en dos grandes grupos con base en los componentes del sistema inmune que ejecutan la respuesta:

1) Inmunidad Humoral, la cual es mediada principalmente por los linfocitos B, que a través de su receptor para antígenos de células B (BCR) expresado en la superficie celular o que es secretado (anticuerpo), es capaz de reconocer a macromoléculas particulares. Esto conduce a la expansión de células plasmáticas secretoras de anticuerpos específicos y a la eliminación del antígeno.

2) Inmunidad Celular, la cual es mediada principalmente por los linfocitos T. Estas células reconocen antígenos particulares a través del receptor para antígenos de células T (TCR). Este reconocimiento induce la producción de citocinas que propician la proliferación y diferenciación de células efectoras (tanto de células B como de células T), así como la lisis de células blanco.

Existen características muy importantes que comparten estos dos tipos de respuesta inmune adquirida: su alto grado de especificidad hacia antígenos particulares, la amplia diversidad en el reconocimiento antigénico, la capacidad de estos sistemas para generar memoria (amplitud y velocidad mayor en posteriores reencuentros antigénicos) y la tolerancia hacia antígenos propios. Los mecanismos responsables para el alto grado de especificidad así como para la gran diversidad en el repertorio de anticuerpos o del TCR encontrados en un organismo son muy similares, y se deben al proceso de recombinación de los genes germinales que codifican tanto para las inmunoglobulinas (BCR) como para el TCR [2, 3].

Por otro lado, existen diferencias significativas en la forma de reconocer antígenos. Mientras que las moléculas de anticuerpo (solubles o ancladas en la superficie celular) son capaces de reconocer epítopes proteicos con estructuras tridimensionales, los linfocitos T a través de su

TCR reconocen principalmente epítopes proteicos lineales así como epítopes provenientes de glicoproteínas y lípidos.

1.2.- ACTIVACION DE CELULAS T

Como ya se mencionó en el capítulo anterior, tanto la inmunidad innata como la adaptativa son muy importantes para que un organismo se mantenga sano. Sin embargo, en lo subsiguiente de éste trabajo me enfocaré en la respuesta inmune específica inducida por células T. Esta preferencia (o menosprecio hacia la inmunidad innata y a las células B) se debe a las siguientes razones:

1) Las células T son fundamentales en la eliminación de células infectadas con virus (como el virus de la inmunodeficiencia humana, gripe, etc.), con parásitos intracelulares (como los responsables del paludismo, tripanosomiasis, leishmaniasis, etc.) y de células tumorales. Así como de jugar un papel crítico en el rechazo de órganos trasplantados.

2) La activación de estas células trae como consecuencia la secreción de gran cantidad de citocinas que son requisito esencial para orquestar la respuesta inmune en general (tanto la respuesta inmune celular como la respuesta inmune humoral).

3) Por último, pero no menos importante, en el laboratorio en el cual realicé el trabajo experimental que me llevó a escribir esta tesis tiene como objetivo principal entender los mecanismos a nivel molecular, por los cuales, la molécula co-receptora CD43 influye en la respuesta inmune de células T.

La activación de células T se define como el conjunto de eventos posteriores al reconocimiento antigénico, que llevan al linfocito T al rearreglo

del citoesqueleto, a la expresión de genes (por ejemplo citocinas y nuevos receptores de superficie celular), a la proliferación y a la diferenciación celular, con el consiguiente establecimiento de una respuesta inmune adecuada. El TCR es la molécula responsable de reconocer principalmente péptidos antigénicos proteolíticamente procesados (8-30 aa) y presentados en el contexto de las moléculas clase I ó II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC). Además del TCR, existen otras moléculas llamadas co-receptores o coestimuladoras que contribuyen de manera importante en la activación celular. Entre las funciones de estas moléculas co-receptoras se encuentran el darle selectividad al tipo de MHC reconocido y por tanto al tipo de antígeno a reconocer (ejem. CD4⁺-MHC II y CD8⁺-MHC I); también, incrementar la avidéz por el antígeno o la interacción con la APC (ejem. LFA-1); o por inducir señales intracelulares que influyan en la respuesta final (ejem. CD28, CD43, CD45, etc.).

1.2.1.- Diferenciación Th1/Th2. Aunque el establecimiento de una respuesta inmune es un proceso altamente complejo, podemos decir que cierto tipo de microorganismos desencadenan preferentemente una respuesta inmune de tipo humoral (orquestrada principalmente por células B) y otros una respuesta inmune celular (orquestrada principalmente por células T). En general, estas diferencias están dadas por el tipo de citocinas que son liberadas en el microambiente en donde ocurre la activación de los linfocitos T. Se han identificado dos tipos de subpoblaciones de células T CD4⁺ (también llamadas "cooperadoras" o "helper") cuyo fenotipo está dado por el patrón de citocinas que secretan: las células T CD4⁺ "Th1" y las células "Th2"

[4]. La diferenciación hacia una respuesta Th1 ó Th2 está regida tanto por el tipo de APC que presenta el antígeno como por el tipo de antígeno a reconocer, por las citocinas presentes en el momento de la activación así como por las señales generadas por la interacción de las moléculas co-receptoras con sus ligandos. Las células Th1 secretan principalmente $INF\gamma$ y $TNF\beta$, por lo que cooperan para el establecimiento de una respuesta de tipo celular (por ejemplo citotoxicidad y producción de citocinas); este tipo de respuesta se establece frente a microorganismos intracelulares, tales como virus, algunos tipos de bacterias y protozoarios. Por otro parte, las células T $CD4^+$ "Th2", secretan preferencialmente IL-4, IL-5 e IL-10, y de esta forma cooperan para la proliferación de células B y para el cambio de clase de inmunoglobulinas; este tipo de respuesta es efectiva contra patógenos extracelulares, como es el caso de infecciones con algunos helmintos.

El balance adecuado entre estos dos tipos de poblaciones celulares, Th1 y Th2, darán como resultado una respuesta inmune efectiva. El desbalance entre estos dos tipos de poblaciones favorecen diversos estados patológicos, tal como ocurre en los procesos asmáticos, infecciones parasitarias crónicas, inflamación crónica, etc.

1.2.2. - Eventos bioquímicos. Uno de los eventos principales en el inicio de la respuesta de células T es la fosforilación de proteínas. El TCR no posee actividad de cinasa intrínseca ni residuos para ser fosforilados; sin embargo, forma un complejo con las cadenas invariantes llamadas CD3 (formadas por los dímeros $CD3\epsilon\delta$ y $CD3\epsilon\gamma$) y con el dímero de la cadena ζ . Este complejo CD3- ζ es el responsable de unir al TCR con la maquinaria de señalización intracelular [5-7] (Figura 1). Las cadenas CD3- ζ son fosforiladas (en sus

motivos de activación basados en tirosina ó ITAMs) poco después de la interacción del TCR con su ligando. Se ha reportado que las cinasas de tirosina Lck y/o Fyn (miembros de la familia de Src) son las principales responsables de esta fosforilación, la cual provee de sitios de unión para proteínas con dominios SH2 (se ha sugerido que el co-receptor CD4 favorezca la asociación de Lck al complejo TCR/CD3, permitiendo así su fosforilación). Tal es el caso del reclutamiento y activación de la cinasa de tirosina ZAP-70 (miembro de la familia Syk) y posteriormente la fosforilación de la proteína adaptadora LAT, la cual es de especial importancia para coordinar los eventos cascada abajo indispensables para la activación celular. A través de LAT se recluta a la proteína adaptadora Grb2 que une y promueve la activación de Sos (un factor intercambiador de nucleótidos) y consecuentemente la activación de la vía de Ras-MAPK, importante para la activación de factores transcripcionales como NF- κ B y AP-1. Por otro lado, LAT permite el anclaje y activación de la cinasa de lípidos PI3K, cuyos productos son importantes para la unión de proteínas con dominios de plextrina (PH), como la cinasa Akt relacionada con proliferación celular. Además, PI3K juega un papel esencial en los rearrreglos del citoesqueleto. Adicionalmente, se sabe que LAT recluta a la membrana celular a la fosfolipasa C_γ (PLC γ), y posteriormente su activación. PLC γ permite la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP $_2$) generando los segundos mensajeros inositol-1,4,5-trifosfato (IP $_3$) y diacilglicerol (DAG). Estos segundos mensajeros son los responsables del flujo rápido y sostenido del calcio intracelular ($[Ca^{+2}]_i$) y de la activación de Proteínas Cinasas C (PKC), respectivamente, que se observa en respuesta al TCR. En tanto que el aumento de $[Ca^{+2}]_i$ lleva a la activación de la fosfatasa calcineurina,

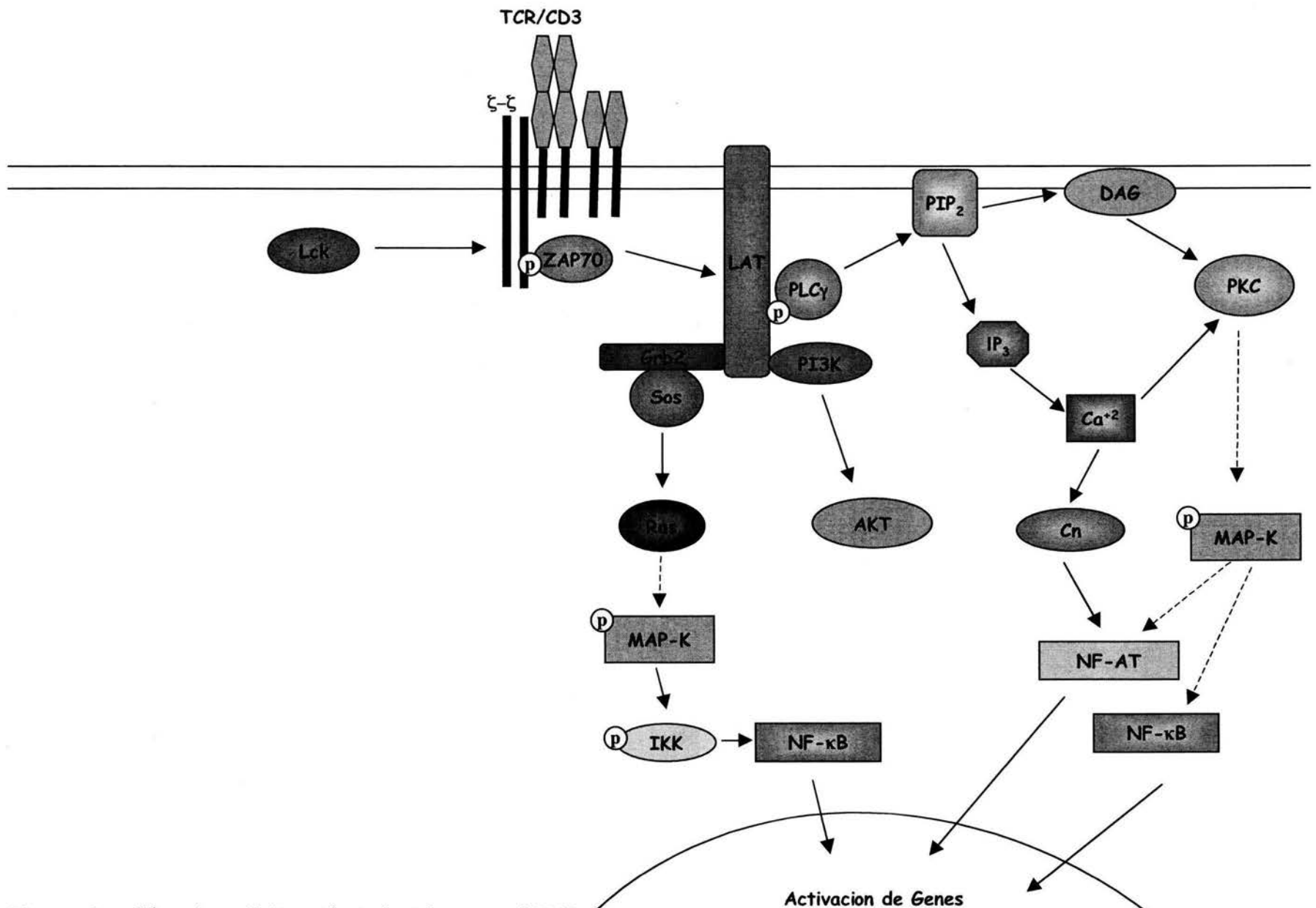


Figura 1.- Vías de señalización inducidas por el TCR

responsable de la activación del factor transcripcional NFAT; PKC lleva a la activación de la MAP cinasa JNK, y coopera junto con calcineurina para inducir la activación de NFAT. Además, la activación de PKC se ha implicado en la activación de la vía de Ras-MAPK y de ciertos factores transcripcionales (como NF- κ B y AP-1) importantes para la expresión de genes que codifican para diferentes citocinas requeridas para proliferación y diferenciación celular.

1.2.3.- Polarización y redistribución de moléculas en la superficie celular durante el reconocimiento antigénico. Como ya se mencionó, la activación de los linfocitos T requiere una interacción sostenida del TCR con el complejo péptido antigénico-MHC presente en la superficie de la APC. Una interacción productiva induce cambios bioquímicos (como los descritos en el inciso 1.2.2) y de reorganización de dominios específicos de la membrana, lo cual lleva a la formación de una estructura altamente organizada en el sitio de contacto que se le ha denominado Sinápsis Inmunológica (SI) o Complejo Supramolecular de Señalización (SMAC) [8, 9]. La formación de la SI es un proceso rápido por el cual las células T adoptan una polaridad con respecto a la APC y en donde se concentran el TCR y moléculas co-receptoras como CD4/CD8, CD28 y LFA-1, así como moléculas intracelulares de señalización (Lck, Fyn y PKC θ) y moléculas del citoesqueleto (actina y moléculas asociadas a actina). La alta densidad de moléculas señalizadoras en el sitio de contacto antigénico permiten una unión estable y prolongada, asegurando que los eventos cascada abajo del TCR se lleven a cabo con éxito.

Inicialmente se pensó que la formación de la SI sólo permitía el reclutamiento de moléculas indispensables para el reconocimiento antigénico

(como CD4/CD8, CD28 y LFA-1) y excluía a las moléculas "no necesarias", por ejemplo las moléculas de gran tamaño en su región extracelular, ya que al permitir la exclusión de estas moléculas se aseguraba el contacto y reconocimiento antigénico.

Sin embargo, se demostró recientemente que a la par de la formación de la SI se establece otra estructura membranal distinta a ésta, a la cual se le ha denominado "complejo distal polar" (DPC) y está caracterizada por la presencia del co-receptor CD43 (una molécula larga y con una carga negativa alta), la molécula Rho-GDI (regulador de la actividad de GTPasa de la familia Rho), y proteínas de la familia de ezrina-radixina-moesina (ERM) [10], estas últimas involucradas en conectar receptores de la membrana celular con el citoesqueleto (actina). Talina es el principal componente del citoesqueleto que organiza a la SI, mientras que la familia de ERM juega un papel crucial en el establecimiento del DPC. La sobre-expresión de formas inactivas de ERM (incapacidad de unirse a actina, y por tanto de reorganizar adecuadamente el citoesqueleto), ha llevado a sugerir que el DPC tiene un papel funcional relevante para la activación de células T [11, 12]. Si bien es cierto que la sobre-expresión de estas formas aberrantes de ERM no desordenan a la SI, el resultado de la activación celular es alterado ya que se disminuye la capacidad de estas células para producir IL-2 e INF γ .

1.3.- PAPEL DE LAS MOLECULAS CO-RECEPTORAS

La activación de las células T no solo requiere de la interacción del TCR con el antígeno, sino también la interacción de las moléculas co-receptoras con sus contrarreceptores o ligandos. Estas señales pueden incidir con las del TCR (vía dependiente), o bien, seguir su propio camino (vía independiente). La

suma de la intensidad y duración de estos dos tipos de señales (TCR y moléculas co-receptoras), llevan a un linfocito T a responder adecuadamente hacia un antígeno en particular (activación celular), y la falta de señales co-receptoras llevan al linfocito T a un estado de anergia ("falta" de respuesta).

1.3.1.- La molécula co-receptora CD43. A esta molécula también se le conoce como leucosialina, sialoforina, glicoproteína abundante de leucocitos ó gpL115 [13, 14]. CD43 es una mucina cuya expresión está restringida al linaje de células hematopoyéticas, exceptuando a eritrocitos y a algunas poblaciones de células B [13]. Esta proteína se extiende 45 nm al exterior de la membrana celular, siendo así una de las moléculas más largas de la superficie de células T [15]. Por su tamaño grande y su abundancia, CD43 cubre aproximadamente el 28% de la superficie de las células T, formando así un glicocáliz alrededor de la membrana celular

El gene que codifica para CD43 se encuentra localizado en el cromosoma 16 en humanos y en el cromosoma 7 en ratones [16, 17]. Este gene comprende una región de 12 kilobases aproximadamente (en humanos), consta de dos exones y solo el segundo de éstos codifica a la proteína [18]. Esta pesa entre 113-135 kDa y está formada por tres dominios: el dominio extracelular constituido por 235 aa que es abundante en residuos de serina y treonina, lo que le confiere sitios potenciales para *O*-glicosilación; además tiene una arginina en la posición 220 que la hace candidato para ser *N*-glicosilada. El dominio transmembranal está formado por 23 aa y su secuencia es típica de proteínas integrales de membrana Tipo I. El dominio citoplásmico tiene 123 aa con un alto contenido en residuos de serina (11) y treonina (6) y varios de ellos se encuentran en regiones consenso para la fosforilación por

proteínas de la familia de PKC, de hecho, esta región se encuentra constitutivamente fosforilada y se ha identificado a la serina de la posición 332 como el principal sitio de fosforilación [19-21]. Este dominio tiene una región rica en residuos de prolina que se ha propuesto ser sitio de unión para proteínas con dominios SH3 [22]. La región intracitoplásmica de CD43 tiene alta homología entre humanos y roedores lo que sugiere que este dominio tiene un papel importante en las funciones de CD43 [23].

Esta molécula se encuentra altamente glicosilada y dependiendo del tipo celular y del estado de diferenciación es el tipo de oligosacáridos unidos a la estructura proteica de CD43. Los principales azúcares detectados en esta proteína son galactosa, N-acetilgalactosamina y ácido siálico [13]. De acuerdo con este criterio, se han identificado dos glicofomas principales de CD43: una de 113-123 kDa que posee principalmente tetrasacáridos [NeuNAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3(NeuNAc α 2 \rightarrow 6)GalNAc], esta forma se expresa preferentemente en timocitos, en células T CD4⁺ en reposo y en monocitos. La otra glicofoma de CD43 tiene un peso aproximado de 130-135 kDa, posee principalmente hexasacáridos [NeuNAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3(NeuNAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6)GalNAc] y su expresión es preferencial en linfocitos T CD4⁺ activados, en linfocitos T CD8⁺ en reposo o activados, en células plasmáticas, neutrófilos y plaquetas. La isoforma de alto peso molecular lleva una estructura de O-glicanos (tipo 2), la cual depende de la actividad enzimática de la β 1 \rightarrow 6-N-acetilglucosaminiltransferasa [24].

1.3.2.- Ligandos de CD43. Se ha demostrado que CD43 une a ICAM-1, a moléculas clase I del MHC, a galectina-1, a albúmina de suero humano, al virus de la influenza tipo A, a micobacterias ó a sialoadhesina, que es un receptor

de adhesión a macrófagos [25-31]. La interacción de CD43 en células T con ICAM-1 podría contribuir al contacto célula-célula y a la activación celular [29]. Por otro lado, la adhesión espontánea de células T inactivas a cierto tipo de células presentadoras de antígenos (como las células dendríticas) posiblemente es mediada por la interacción de CD43 con las moléculas clase I del MHC; además, esta unión regula la unión de CD2 con su ligando CD58 [28].

Galectina-1 es una lectina que une a proteínas con residuos de β -galactósidos y está expresada en órganos linfoides periféricos y centrales [32]. La isoforma de alto peso molecular de CD43 (130-135 kDa) es uno de los principales ligandos de galectina-1. Esta isoforma de CD43 se expresa en los timocitos corticales y en células T periféricas que han sido activadas, y su unión con galectina-1 induce apoptosis dependiente de la presencia de la fosfatasa CD45 [26, 33]. Esto sugiere la participación de CD43 en los procesos de selección y maduración de células T en el timo, así como en la regulación de la respuesta inmune periférica [25, 26, 33]. CD43 también interactúa con la albúmina de suero humano (ASH). En neutrófilos, esta unión evita el "spreading" e inhibe las funciones relacionadas con este proceso (como por ejemplo la liberación de compuestos reactivos de oxígeno). Asimismo, la interacción ASH-CD43 previene el corte de CD43 de la superficie celular que se observa durante la activación de neutrófilos impidiendo así su activación [34]. Por otro parte, el virus de la influenza (tipo A) interactúa específicamente con CD43 en la superficie de células polimorfonucleares. Al incubar estas células con el virus o con anticuerpos anti-CD43 y exponiéndolas posteriormente a un estímulo secundario (como PMA o fMLP), se observó una disminución en la degranulación de

mieloperoxidasa, lo cual está relacionado con la disminución de la actividad antibactericida de las células [35].

Asimismo, la región extracelular de CD43 es importante para la unión y/o entrada de micobacterias a macrófagos, además de la producción de TNF α en respuesta a esta infección. La producción de TNF α afecta la sobrevivencia de micobacterias al inducir apoptosis en macrófagos infectados [27]. Finalmente, CD43 también es el contra-receptor de sialoadhesina (receptor de adhesión a macrófagos) lo que sugiere que CD43 promueve las interacciones de macrófagos con diferentes células del sistema inmune [30].

En conjunto estos datos sugieren la participación de CD43 en procesos de adhesión celular, así como en eventos de señalización que modulan diferentes funciones celulares en respuesta a la interacción con sus ligandos. Sin embargo, no existen evidencias directas que demuestren cómo es que la interacción de CD43 con estos ligandos regula las funciones biológicas de los linfocitos T.

1.3.3.- Mecanismos de señalización inducidos a través de CD43. Las señales generadas por el entrecruzamiento de CD43 en la superficie de linfocitos T inducen la activación y proliferación celular, la producción de citocinas y la adhesión con otras células o con componentes de la matriz extracelular [36-40]. Además, se ha sugerido la participación de CD43 en procesos de sobrevivencia celular y apoptosis [41, 42]. Estos eventos inducidos por CD43 son independientes de las señales generadas por el co-receptor CD28 [37, 43] y estrictamente dependientes de la región citoplásmica de CD43, la cual es hiperfosforilada durante la activación de las

células T [19, 39]. En estas células, el entrecruzamiento de CD43 (usando anticuerpos monoclonales) promueve la asociación del dominio citoplásmico de CD43 con las cinasas de la familia de Src, Lck [44] y Fyn, esta última a través de su dominio SH3 que interactúa con la región rica en prolina de CD43 [22] (Figura 2). Estas interacciones inducen la actividad catalítica de ambas cinasas de tirosina [45], permitiendo así la fosforilación de varias moléculas de señalización importantes para la activación celular. Una de estas moléculas es la cadena ζ del complejo de activación CD3, que es fosforilada en residuos de tirosina, lo que a su vez permite el acoplamiento de la cinasa ZAP-70 [45]. Este reclutamiento y activación promueve la fosforilación de las moléculas adaptadoras Shc y SLP76 y del intercambiador de nucleótidos de guanina, Vav. La fosforilación de estas proteínas permite la formación de complejos macromoleculares como Shc-Grb2-Vav y Vav-SLP76 [45, 46]. Estos eventos son importantes para la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas), la activación de los factores transcripcionales AP-1, NF- κ B y NFAT y la expresión de genes de interleucinas como IL-2 e INF- γ , así como del gene temprano de activación, CD69 [46, 47](Olivares, N. Datos no publicados).

Además de inducir señales intracelulares que dependen de la fosforilación en tirosinas, CD43 está funcionalmente acoplada a la vía de fosfolipasa $C\gamma$ (PLC- γ) y a la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana, dando como resultado la translocación a la membrana de PKC y a la movilización de calcio intracelular [21, 48]. Estos datos son consistentes con lo reportado por Pedraza-Alva y cols. [49] en donde inhibidores de PKC previenen la fosforilación en residuos de serina de la molécula Cbl, inducida por CD43. También previenen la asociación de Cbl con la isoforma τ de la proteína 14-3-

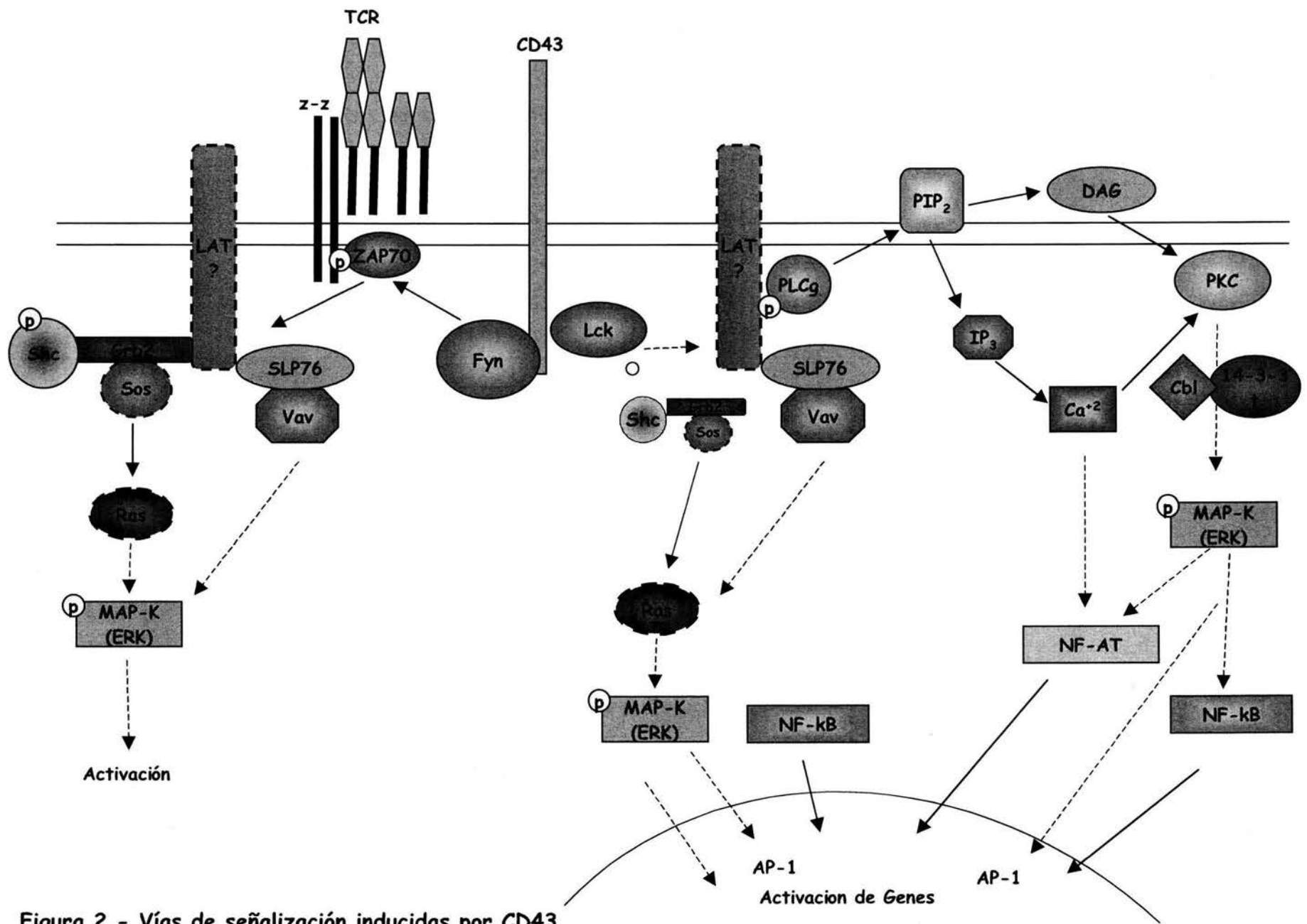


Figura 2.- Vías de señalización inducidas por CD43

3 y la activación de la MAP cinasa ERK, en respuesta al entrecruzamiento de CD43. Sin embargo, no existen evidencias directas que demuestren que las señales intracelulares generadas a través de CD43 lleven a la activación de PKC, ni tampoco cuáles isoformas de PKC pudieran ser activadas por CD43 en células T.

1.4.- ¿QUIENES SON LAS PKC?

1.4.1.- Familia y dominios estructurales. La familia de PKC fué definida inicialmente como un grupo heterogéneo de cinasas dependientes de fosfolípidos [50]. En mamíferos, se han identificado 10 genes que codifican para 11 isoenzimas diferentes de PKC (en el caso de PKC β , es el mismo gene que por "splicing alternativo" da como resultado dos productos: PKC β I y PKC β II) [51]. Cada una de estas isoenzimas está formada por una sola cadena polipeptídica, compuesta por un dominio amino-terminal con capacidad de unirse a la membrana celular (dominio regulador) y un dominio carboxilo-terminal que tiene la actividad de cinasa (dominio catalítico) (Figura 3). El dominio catalítico contiene dos módulos funcionales, uno de unión a ATP (C3) y el otro de unión al sustrato (C4). Este dominio permanece en un estado inactivo debido a que el sitio activo se encuentra impedido estéricamente por el pseudosustrato ("ps", amino-terminal de C1) [52]. La fosforilación en algunos residuos del dominio catalítico y la unión de cofactores específicos al dominio regulador permiten la liberación del pseudosustrato del sitio activo y la activación de la PKC [53, 54]. En el dominio regulador se encuentran dos regiones llamadas C1 (C1a y C1b), las cuales poseen secuencias ricas en cisteínas que coordinan la unión de dos átomos de Zn^{+2} . Las regiones C1 son las responsables de la interacción con diacilglicerol (DAG) o con ésteres de

forbol (ejem. PMA). En las PKC atípicas existe un solo dominio C1 (homólogo a C1a) el cual es insuficiente para la interacción con DAG/PMA [54-56] Adyacente a la región carboxilo-terminal de C1 se encuentra una región denominada C2 cuya característica esencial es la presencia de cinco residuos conservados de ácido aspártico que se requieren para la unión de dos átomos de Ca^{+2} ; en las PKC nuevas uno o más de estos residuos no están conservados y por lo tanto no unen a Ca^{+2} . Asimismo, la región $-NH_2$ terminal de C2 posee un sitio de interacción con fosfatidilserina indispensable para la activación de PKC [57, 58].

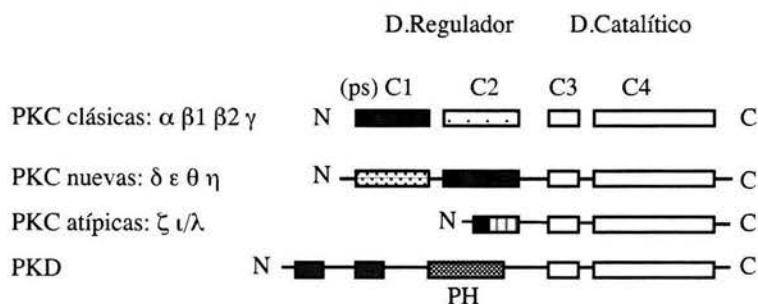


Figura 3 . - Estructura de las diferentes isoenzimas de PKC

Las proteínas de la familia de PKC se han agrupado en tres categorías dependiendo del tipo de cofactores necesarios para su activación [59]. Además del lípido de membrana fosfatidilserina, las PKC clásicas o convencionales (α , βI , βII y γ) requieren de calcio (Ca^{+2} , unión a C2) y de diacilglicerol (DAG; unión a C1) o ésteres de forbol (unión a C1), mientras que las PKC nuevas (δ , ϵ , θ y η) solamente requieren DAG o ésteres de forbol. Un tercer grupo de PKC, llamadas PKC atípicas (ζ , ι/λ) no requieren calcio ni DAG

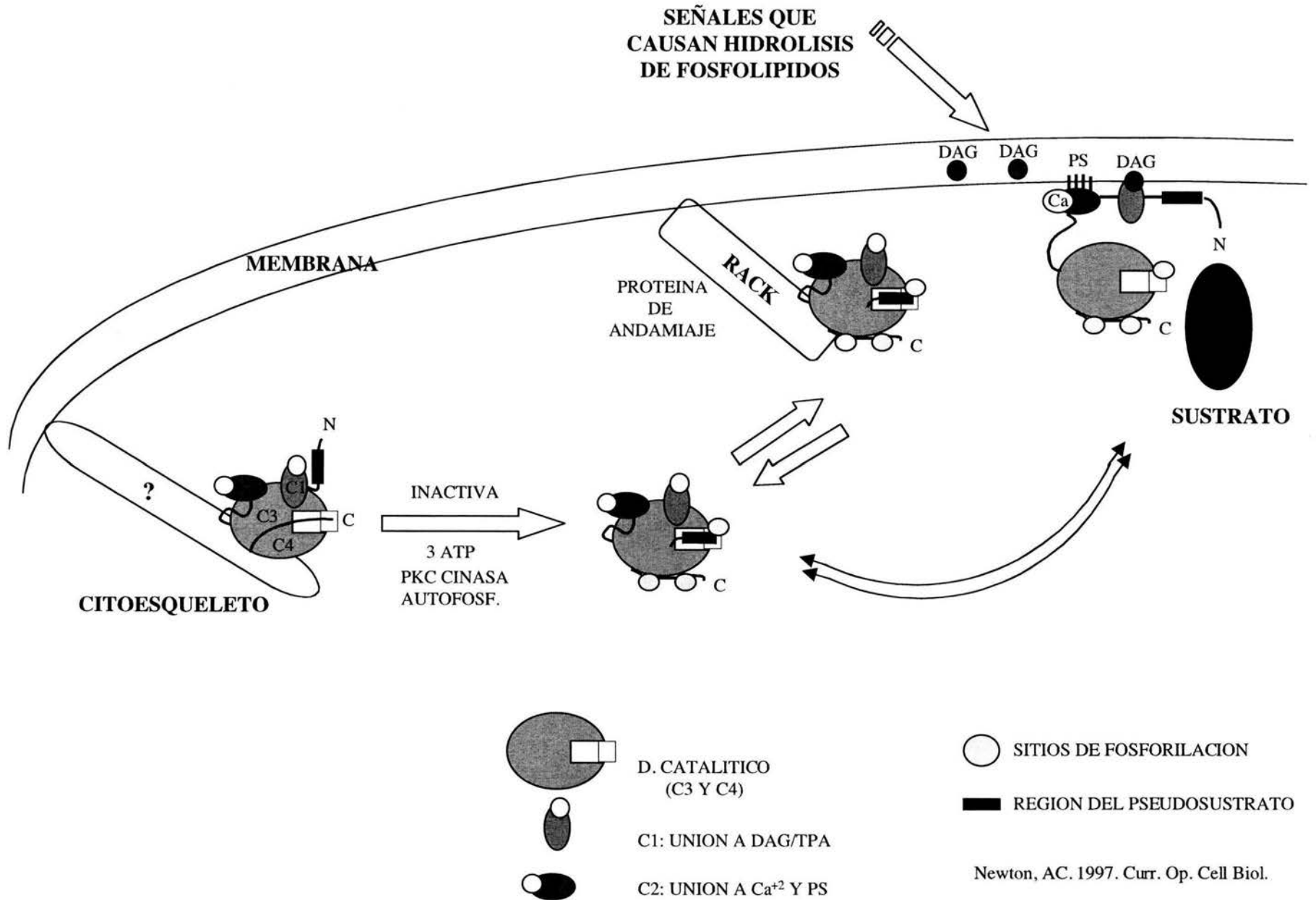
para su máxima actividad [57, 60] y aún se desconoce el mecanismo de activación de estas isoformas.

Un nuevo grupo de cinasas fué identificado e inicialmente se clasificó dentro de la familia de PKC. Este nuevo grupo de serina/treonina cinasas es llamado PKD, y está formado por tres miembros: PKC μ /PKD, PKD2 y PKC ν /PKD3. Esta familia es dependiente de fosfolípidos, insensible a concentraciones de Ca²⁺ y activada por ésteres de forbol. Además, contiene un dominio hidrofóbico con homología a plextrina (PH) en la región aminoterminal, y un dominio catalítico distinto a PKC [61-63].

1.4.2.- Regulación por fosforilación. Estas enzimas son sintetizadas en el ribosoma como precursores inactivos y se asocian con la fracción celular insoluble en detergente. La fosforilación de la familia de PKC es necesaria para inducir un cambio estructural que permita la máxima actividad enzimática (Figura 4). En PKC β II, la translocación a la membrana (a través del dominio regulador) y la activación enzimática es precedida por tres eventos de fosforilación [56, 64, 65]. La enzima es inicialmente fosforilada en la treonina T500 del asa de activación, probablemente por la proteína cinasa-1 dependiente de inosítidos fosforilados en la posición 3' (PDK1) [66]. Se cree que esta fosforilación alinea a los residuos de aminoácidos del sitio catalítico para permitir a la enzima ser catalíticamente competente [67]. Como consecuencia de esto, se induce la autofosforilación en la treonina T641. La adición de un grupo fosfato en esta posición, reemplaza la necesidad de la carga negativa en el asa de activación.

Posteriormente, la desfosforilación selectiva en la treonina T500 del asa de activación le permite a PKC β II retener su actividad enzimática. El

Figura 4.- PKC es regulada por fosforilación



tercer sitio de fosforilación es la serina S660 localizada en la región carboxilo-terminal de la proteína, y esta es una reacción de autofosforilación. Este evento permite la localización subcelular de la enzima permitiéndole liberarse al citosol como una proteína madura capaz de responder a cofactores (por ejemplo PS y DAG) necesarios para su máxima actividad enzimática.

En las PKC clásicas, estos tres sitios de fosforilación sirven como "interruptores" que controlan interacciones intra- e inter-moleculares. Y aunque estos sitios de fosforilación son conservados en las isoformas no convencionales de PKC, no se sabe si este mismo orden se lleva a cabo para que las PKC no convencionales respondan a los cofactores presentes en la membrana celular (tales como PS y/o DAG).

Asimismo, se ha demostrado que existen otros sitios de fosforilación, en residuos que no están conservados entre los miembros de la familia de PKC. El hecho de que las diferentes isoformas de PKC sean fosforiladas en residuos no conservados en respuesta a estímulos específicos, sugiere que la fosforilación de estos sitios provee de mecanismos de regulación adicionales para cada isoforma de PKC. Ejemplo de esto son la fosforilación en residuos de tirosina de PKC δ y θ inducidos por cinasas de la familia de Src, esto en respuesta a diferentes estímulos [68, 69].

1.4.3.- Regulación por cofactores. Las enzimas de PKC usan las dos regiones del dominio regulador para interaccionar con segundos mensajeros, los cuales son indispensables para localizar a PKC en la membrana y regular alostericamente la actividad de estas enzimas. Estas dos regiones son el

dominio C1, el cual une a DAG y a ésteres de forbol, y el dominio C2 que une a lípidos ácidos (PS) y a Ca^{+2} .

La translocación a la membrana y la activación de las isoformas clásicas de PKC se lleva a cabo en dos pasos [57, 70]. El primer paso, involucra la unión de la región C2 a Ca^{+2} la cual es favorecida por un incremento en las concentraciones intracelulares de este catión. Esta unión induce un cambio conformacional en la proteína y promueve su asociación a la membrana. Esta asociación favorece la interacción de la región C1 a DAG presente en la membrana celular lo cual induce una inserción parcial de PKC a la membrana y desestabiliza las interacciones autoinhibitorias entre el dominio regulador (pseudosustrato) y el dominio catalítico, permitiéndole finalmente el acceso al sustrato. La unión de C1 a DAG reduce considerablemente las concentraciones de Ca^{+2} necesarias para la activación de PKC. Los ésteres de forbol, que son análogos no hidrolizables de DAG, no necesitan de la unión de C2 con Ca^{+2} e inducen una fuerte asociación de PKC a la membrana celular.

En contraste a las PKC clásicas, en las PKC nuevas la translocación a la membrana y la activación alostérica de estas isoformas se cree que es iniciada por la unión de DAG (o ésteres de forbol) a la región C1 [57, 70]. Después de la inserción a la membrana las PKC pueden interactuar con distintos sustratos o proteínas adaptadoras antes de que sean inactivadas por el metabolismo de DAG o por el corte proteolítico por calpaína [71].

1.4.4.- Regulación por localización. El uso de técnicas inmunohistoquímicas ha permitido establecer que las diferentes isoenzimas de PKC se localizan en diferentes compartimientos dependiendo del tipo celular que se analice [60,

72]. Los cambios de localización de estas enzimas, inducidos por la diferenciación y transformación celular, sugieren que los mecanismos moleculares que determinan la localización subcelular son modificados durante estos procesos.

Se han encontrado dos tipos de proteínas que unen a PKC, aquellas que además de unirse a PKC son sustratos de ésta, y las que únicamente se unen a PKC pero no son sus sustratos. Entre las primeras encontramos a vinculina, talina, las MARCKS (Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate), proteínas relacionadas a MARCKS, proteínas de la familia de ERM, α -aducina, γ -aducina, anexinas I/II y desmoyokina. Estas proteínas unen a componentes de la membrana celular con el citoesqueleto y, además de ser sustratos de PKC, son también proteínas de unión a fosfatidilserina (PS) [60, 72]. Esto ha llevado a proponer que un componente importante en la activación de PKC es regular las interacciones membrana-citoesqueleto.

Otro tipo de proteínas que se unen a PKC son los "receptores para PKC activas" (RACKs) [60, 72, 73]. A diferencia de las descritas anteriormente, las RACKs no son sustratos para PKC ni dependen de PS. Debido a que estas proteínas solo interactúan con PKC activas/fosforiladas, pudieran regular la localización específica de las PKC y por tanto su función. Tal es el caso de la unión de la cadena β del receptor para IgE que se asocia con PKC δ , de ésta manera le permite fosforilar a la cadena γ de ese mismo receptor, modificando los eventos cascada abajo [60].

Por tanto, las proteínas de unión a PKC regulan la eficiencia y la especificidad de la reacción PKC-efector (sustrato) al coordinar su interacción con el citoesqueleto o su distribución, de una forma espacial y temporal.

En suma, los mecanismos que regulan a PKC son muy complejos. Los principales mecanismos que regulan su actividad son: 1) la fosforilación, la cual es necesaria para la competencia catalítica de la enzima; y 2) los segundos mensajeros, los cuales son necesarios para regular alostericamente la actividad enzimáticamente. Además, aquellos mecanismos que regulan su localización celular y la especificidad de sustrato. Por tanto, las señales que dependen de la activación de PKC se han encontrado ser muy versátiles.

1.5. - CELULAS T Y PKC θ

Las isoenzimas de PKC se expresan en una gran variedad de células y tejidos. En las células T se expresan todas las isoenzimas de PKC con excepción de PKC γ [74, 75]; aunque la contribución específica de las distintas isoformas de PKC en los mecanismos de señalización en células T solo se conoce parcialmente. Sin embargo, es necesario señalar que entre todas las isoenzimas de PKC presentes en las células T, PKC θ tiene un papel importante en los mecanismos de señalización inducidos por el TCR y por tanto para las funciones de estas células.

1.5.1. - PKC θ regula distintas vías de señalización. En los últimos años, varios grupos de investigación se han enfocado en esclarecer la participación de PKC θ en la activación de células T inducida por antígenos o por el entrecruzamiento con anticuerpos anti-TCR/anti-CD28. Como se mencionó anteriormente, la interacción del TCR con su antígeno induce la formación de la SI (ó SMAC), la cual requiere de rearrreglos en las proteínas del citoesqueleto y del ensamblaje de varias moléculas intracelulares indispensables para la activación de las células T. Se ha demostrado que PKC θ

se sitúa junto con el TCR en la región central del SMAC (cSMAC) y esta localización requiere de la reorganización del citoesqueleto de actina, la cual a su vez depende de la funcionalidad de las proteínas Vav1 y Rac. La localización de PKC θ en la SI es importante para activar al factor transcripcional NF- κ B y para la activación de las células T [76-78]. Asimismo, PKC θ promueve la activación de manera selectiva del factor transcripcional AP-1 y junto con calcineurina induce la activación transcripcional de NFAT y la expresión del gene de IL-2 [79-81]. Se ha visto también que PKC θ integra las señales generadas a través de la activación del TCR y de CD28 por inducir la unión de factores transcripcionales a la secuencia conocida como "secuencia de respuesta a CD28" (CD28RE), en el promotor de IL-2 [82]. Por otra parte, la activación de PKC θ iniciada por el entrecruzamiento de TCR/CD28 en la superficie de las células T, lleva a la activación de NF- κ B y a la producción de INF γ por una vía dependiente de la cinasa de serina/treonina dependiente de PI3K, Akt [83, 84]; también, bajo las mismas condiciones de estimulación PKC θ regula la expresión del gene de IL-4 por una vía de señalización que depende de Vav/LAT/SLP76 y de componentes que conducen a la activación de JNK y NF- κ B [85]. Además de la participación de PKC θ en regular la expresión de citocinas necesarias para la proliferación y diferenciación de células T, participa en la inducción de la expresión de CD69 (antígeno de activación temprano) probablemente al activar la vía ERK/Ras [86-88]. Otro aspecto importante en las vías de señalización que son reguladas por PKC θ es el requerimiento de ésta para activar a JNK en células T [79, 89-91]. Sin embargo, la trascendencia biológica de este hecho ha sido cuestionada ya que, células T obtenidas de ratones carentes de las cinasas JNK1 y JNK2 producen una cantidad mayor

de IL-2 y tienen un índice mayor de proliferación en comparación a células obtenidas de ratones normales [92]. La importancia de PKC θ en la activación y proliferación de células T inducidas por el TCR se corroboró cuando se activaron a las células T provenientes de ratones deficientes de PKC θ y se observó que había una reducción en el índice de proliferación debido a defectos en la activación de los factores transcripcionales AP-1, NF- κ B y NFAT y un decremento en la expresión de CD69 y CD25 e IL-2 [81, 93].

1.5.2.- PKC θ y el citoesqueleto de células T. Como ya he mencionado, la activación de las células T requiere una reorganización especial de la membrana celular al sitio de contacto con el antígeno. La formación de este módulo requiere de una compleja interacción de los receptores de la superficie de las células T con algunas moléculas de señalización incluyendo a componentes del citoesqueleto.

La unión inicial entre la APC y el linfocito T es llevada a cabo por integrinas, tal como LFA-1, o por moléculas distintas a las integrinas, como por ejemplo CD2-CD58. La interacción de estos co-receptores en las células T, inducen la activación de distintos mecanismos de señalización entre los que se encuentran la activación de PI3K, de PKC y el incremento en los niveles intracelulares de Ca²⁺ [94]. Esta activación "inicial" es un prerequisite indispensable para la formación de la SI, así como para la adecuada activación celular. Se sabe que el citoesqueleto de actina tiene un papel fundamental en la activación de las células T [95]. Por ejemplo, la morfología y la estructura del citoesqueleto de la línea de timoma EL4 es afectada por la transfección de la mutante inactiva de PKC η , sugiriendo un papel de esta isoforma de PKC en la remodelación del citoesqueleto. Por otro lado, el

entrecruzamiento de LFA-1 induce la translocación tanto de PKC β como de PKC δ a los microtúbulos, esto, durante el proceso de locomoción de los linfocitos T activados. Por otra parte, la activación dependiente del antígeno induce la relocalización de ezrina a la SI [96] y la exclusión-dependiente de moesina del co-receptor CD43 hacia el complejo distal polar [11, 12], ambos eventos dependientes de la activación de PKC.

Además, la activación de PKC está asociada con la fosforilación de varios componentes del citoesqueleto. Por ejemplo, el co-receptor CD47 induce la nucleación de actina y la translocación de PKC θ al sitio de contacto celular [97], e *in vitro*, PKC θ es capaz de fosforilar al componentes del citoesqueleto que une a actina, moesina [98].

Se sabe que estimulación a través del TCR induce, selectivamente, la translocación a la membrana y al citoesqueleto de actina de la isoforma nueva de PKC, PKC θ [87, 99]. Se ha demostrado que Vav es necesaria e indispensable para la translocación de PKC θ a la membrana y al citoesqueleto, ya que las formas "dominantes negativas" de Vav o de Rac, bloquean la activación de PKC θ y su translocación. Contrario a esto, la sobre-expresión de Vav o la forma "constitutiva activa" de Rac inducen un incremento en la actividad enzimática de PKC θ . Además, en este último modelo, la forma "dominante negativa" de PKC θ no afecta la polimerización de actina, pero bloquea la expresión de CD69 inducido por la sobre-expresión de Vav [87]. Estos datos sugieren, que Vav y Rac, además de inducir la remodelación del citoesqueleto, ayudan en la translocación de PKC θ al citoesqueleto.

Por todo esto podemos decir que, la activación de PKC y la remodelación del citoesqueleto son eventos importantes para la adecuada activación de las células T.

BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Del Rio, M. Rincon, E. Layseca-Espinosa, N. A. Fierro, Y. Rosenstein, and G. Pedraza-Alva, PKC θ ; is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement, *Biochem Biophys Res Commun* 325 (2004) 133-143.
- [2] S. D. Fugmann, A. I. Lee, P. E. Shockett, I. J. Villey, and D. G. Schatz, The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition, *Annu Rev Immunol* 18 (2000) 495-527.
- [3] C. H. Bassing, W. Swat, and F. W. Alt, The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination, *Cell* 109 Suppl (2002) S45-55.
- [4] R. A. Seder, and W. E. Paul, Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells, *Annu Rev Immunol* 12 (1994) 635-673.
- [5] O. Acuto, and D. Cantrell, T cell activation and the cytoskeleton, *Annu Rev Immunol* 18 (2000) 165-184.
- [6] J. L. Clements, N. J. Boerth, J. R. Lee, and G. A. Koretzky, Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins, *Annu Rev Immunol* 17 (1999) 89-108.
- [7] W. Zhang, and L. E. Samelson, The role of membrane-associated adaptors in T cell receptor signalling, *Semin Immunol* 12 (2000) 35-41.
- [8] P. Anton van der Merwe, S. J. Davis, A. S. Shaw, and M. L. Dustin, Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition, *Semin Immunol* 12 (2000) 5-21.
- [9] A. Altman, and M. Villalba, Protein kinase C- θ (PKC θ): it's all about location, location, location, *Immunol Rev* 192 (2003) 53-63.
- [10] P. Cullinan, A. I. Sperling, and J. K. Burkhardt, The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse, *Immunol Rev* 189 (2002) 111-122.
- [11] E. J. Allenspach, P. Cullinan, J. Tong, Q. Tang, A. G. Tesciuba, J. L. Cannon, S. M. Takahashi, R. Morgan, J. K. Burkhardt, and A. I. Sperling, ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse, *Immunity* 15 (2001) 739-750.
- [12] J. Delon, K. Kaibuchi, and R. N. Germain, Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin, *Immunity* 15 (2001) 691-701.
- [13] S. R. Carlsson, and M. Fukuda, Isolation and characterization of leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes, *J Biol Chem* 261 (1986) 12779-12786.
- [14] E. Remold-O'Donnell, C. Zimmerman, D. Kenney, and F. S. Rosen, Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome, *Blood* 70 (1987) 104-109.

- [15] J. G. Cyster, D. M. Shotton, and A. F. Williams, The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation, *Embo J* 10 (1991) 893-902.
- [16] A. Pallant, A. Eskenazi, M. G. Mattei, R. E. Fournier, S. R. Carlsson, M. Fukuda, and J. G. Frelinger, Characterization of cDNAs encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 1328-1332.
- [17] C. M. Baecher, K. S. Dorfman, M. G. Mattei, and J. G. Frelinger, cDNA cloning and localization of the mouse leukosialin gene (Ly48) to chromosome 7, *Immunogenetics* 31 (1990) 307-314.
- [18] S. Kudo, and M. Fukuda, A short, novel promoter sequence confers the expression of human leukosialin, a major sialoglycoprotein on leukocytes, *J Biol Chem* 266 (1991) 8483-8489.
- [19] V. Piller, F. Piller, and M. Fukuda, Phosphorylation of the major leukocyte surface sialoglycoprotein, leukosialin, is increased by phorbol 12-myristate 13-acetate, *J Biol Chem* 264 (1989) 18824-18831.
- [20] T. A. Chatila, and R. S. Geha, Phosphorylation of T cell membrane proteins by activators of protein kinase C, *J Immunol* 140 (1988) 4308-4314.
- [21] R. C. Wong, E. Remold-O'Donnell, D. Vercelli, J. Sancho, C. Terhorst, F. Rosen, R. Geha, and T. Chatila, Signal transduction via leukocyte antigen CD43 (sialophorin). Feedback regulation by protein kinase C, *J Immunol* 144 (1990) 1455-1460.
- [22] G. Pedraza-Alva, L. B. Merida, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein, CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase, *J Biol Chem* 271 (1996) 27564-27568.
- [23] J. Cyster, C. Somoza, N. Killeen, and A. F. Williams, Protein sequence and gene structure for mouse leukosialin (CD43), a T lymphocyte mucin without introns in the coding sequence, *Eur J Immunol* 20 (1990) 875-881.
- [24] P. Barran, W. Fellingner, C. E. Warren, J. W. Dennis, and H. J. Ziltener, Modification of CD43 and other lymphocyte O-glycoproteins by core 2 N-acetylglucosaminyltransferase, *Glycobiology* 7 (1997) 129-136.
- [25] L. G. Baum, M. Pang, N. L. Perillo, T. Wu, A. Delegeane, C. H. Uittenbogaart, M. Fukuda, and J. J. Seilhamer, Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells, *J Exp Med* 181 (1995) 877-887.
- [26] N. L. Perillo, K. E. Pace, J. J. Seilhamer, and L. G. Baum, Apoptosis of T cells mediated by galectin-1, *Nature* 378 (1995) 736-739.
- [27] C. Fratazzi, N. Manjunath, R. D. Arbeit, C. Carini, T. A. Gerken, B. Ardman, E. Remold-O'Donnell, and H. G. Remold, A macrophage invasion mechanism for

- mycobacteria implicating the extracellular domain of CD43, *J Exp Med* 192 (2000) 183-192.
- [28] J. Stockl, O. Majdic, P. Kohl, W. F. Pickl, J. E. Menzel, and W. Knapp, Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation, *J Exp Med* 184 (1996) 1769-1779.
- [29] Y. Rosenstein, J. K. Park, W. C. Hahn, F. S. Rosen, B. E. Bierer, and S. J. Burakoff, CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1, *Nature* 354 (1991) 233-235.
- [30] T. K. van den Berg, D. Nath, H. J. Ziltener, D. Vestweber, M. Fukuda, I. van Die, and P. R. Crocker, Cutting edge: CD43 functions as a T cell counterreceptor for the macrophage adhesion receptor sialoadhesin (Siglec-1), *J Immunol* 166 (2001) 3637-3640.
- [31] S. W. Rothwell, and D. G. Wright, Characterization of influenza A virus binding sites on human neutrophils, *J Immunol* 152 (1994) 2358-2367.
- [32] G. A. Rabinovich, L. G. Baum, N. Tinari, R. Paganelli, C. Natoli, F. T. Liu, and S. Iacobelli, Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?, *Trends Immunol* 23 (2002) 313-320.
- [33] N. L. Perillo, C. H. Uittenbogaart, J. T. Nguyen, and L. G. Baum, Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes, *J Exp Med* 185 (1997) 1851-1858.
- [34] C. Nathan, Q. W. Xie, L. Halbwachs-Mecarelli, and W. W. Jin, Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43 (sialophorin, leukosialin), *J Cell Biol* 122 (1993) 243-256.
- [35] J. S. Abramson, and H. R. Hudnор, Role of the sialophorin (CD43) receptor in mediating influenza A virus- induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction, *Blood* 85 (1995) 1615-1619.
- [36] J. K. Park, Y. J. Rosenstein, E. Remold-O'Donnell, B. E. Bierer, F. S. Rosen, and S. J. Burakoff, Enhancement of T-cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott-Aldrich syndrome, *Nature* 350 (1991) 706-709.
- [37] A. I. Sperling, J. M. Green, R. L. Mosley, P. L. Smith, R. J. DiPaolo, J. R. Klein, J. A. Bluestone, and C. B. Thompson, CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28, *J Exp Med* 182 (1995) 139-146.
- [38] N. Anzai, A. Gotoh, H. Shibayama, and H. E. Broxmeyer, Modulation of integrin function in hematopoietic progenitor cells by CD43 engagement: possible involvement of protein tyrosine kinase and phospholipase C-gamma, *Blood* 93 (1999) 3317-3326.
- [39] B. Axelsson, R. Youseffi-Etemad, S. Hammarstrom, and P. Perlmann, Induction of aggregation and enhancement of proliferation and IL-2 secretion in human T cells by antibodies to CD43, *J Immunol* 141 (1988) 2912-2917.

- [40] A. R. Rosenkranz, O. Majdic, J. Stockl, W. Pickl, H. Stockinger, and W. Knapp, Induction of neutrophil homotypic adhesion via sialophorin (CD43), a surface sialoglycoprotein restricted to haemopoietic cells, *Immunology* 80 (1993) 431-438.
- [41] T. J. Brown, W. W. Shuford, W. C. Wang, S. G. Nadler, T. S. Bailey, H. Marquardt, and R. S. Mittler, Characterization of a CD43/leukosialin-mediated pathway for inducing apoptosis in human T-lymphoblastoid cells, *J Biol Chem* 271 (1996) 27686-27695.
- [42] L. L. Dragone, R. K. Barth, K. L. Sitar, G. L. Disbrow, and J. G. Frelinger, Disregulation of leukosialin (CD43, Ly48, sialophorin) expression in the B-cell lineage of transgenic mice increases splenic B-cell number and survival, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 626-630.
- [43] E. U. Bagriacik, M. Tang, H. C. Wang, and J. R. Klein, CD43 potentiates CD3-induced proliferation of murine intestinal intraepithelial lymphocytes, *Immunol Cell Biol* 79 (2001) 303-307.
- [44] M. Alvarado, C. Klassen, J. Cerny, V. Horejsi, and R. E. Schmidt, MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation, *Eur J Immunol* 25 (1995) 1051-1055.
- [45] M. E. Cruz-Munoz, E. Salas-Vidal, N. Salaiza-Suazo, I. Becker, G. Pedraza-Alva, and Y. Rosenstein, The CD43 coreceptor molecule recruits the zeta-chain as part of its signaling pathway, *J Immunol* 171 (2003) 1901-1908.
- [46] G. Pedraza-Alva, L. B. Merida, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein, T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation, *J Biol Chem* 273 (1998) 14218-14224.
- [47] M. A. Santana, G. Pedraza-Alva, N. Olivares-Zavaleta, V. Madrid-Marina, V. Horejsi, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein, CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NFkappa B transcription factors in human T lymphocytes, *J Biol Chem* 275 (2000) 31460-31468.
- [48] L. B. Silverman, R. C. Wong, E. Remold-O'Donnell, D. Vercelli, J. Sancho, C. Terhorst, F. Rosen, R. Geha, and T. Chatila, Mechanism of mononuclear cell activation by an anti-CD43 (sialophorin) agonistic antibody, *J Immunol* 142 (1989) 4194-4200.
- [49] G. Pedraza-Alva, S. Sawasdikosol, Y. C. Liu, L. B. Merida, M. E. Cruz-Munoz, F. Ocegüera-Yanez, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein, Regulation of Cbl molecular interactions by the co-receptor molecule CD43 in human T cells, *J Biol Chem* 276 (2001) 729-737.
- [50] Y. Nishizuka, The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion, *Nature* 308 (1984) 693-698.
- [51] L. Coussens, L. Rhee, P. J. Parker, and A. Ullrich, Alternative splicing increases the diversity of the human protein kinase C family, *DNA* 6 (1987) 389-394.
- [52] J. W. Orr, and A. C. Newton, Intrapeptide regulation of protein kinase C, *J Biol Chem* 269 (1994) 8383-8387.

- [53] E. M. Dutil, and A. C. Newton, Dual role of pseudosubstrate in the coordinated regulation of protein kinase C by phosphorylation and diacylglycerol, *J Biol Chem* 275 (2000) 10697-10701.
- [54] A. S. Edwards, and A. C. Newton, Phosphorylation at conserved carboxyl-terminal hydrophobic motif regulates the catalytic and regulatory domains of protein kinase C, *J Biol Chem* 272 (1997) 18382-18390.
- [55] M. Mosior, and A. C. Newton, Mechanism of interaction of protein kinase C with phorbol esters. Reversibility and nature of membrane association, *J Biol Chem* 270 (1995) 25526-25533.
- [56] L. M. Keranen, E. M. Dutil, and A. C. Newton, Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations, *Curr Biol* 5 (1995) 1394-1403.
- [57] A. C. Newton, and J. E. Johnson, Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules, *Biochim Biophys Acta* 1376 (1998) 155-172.
- [58] J. E. Johnson, J. Giorgione, and A. C. Newton, The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain, *Biochemistry* 39 (2000) 11360-11369.
- [59] Y. Nishizuka, and S. Nakamura, Lipid mediators and protein kinase C for intracellular signalling, *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 22 (1995) S202-203.
- [60] S. Jaken, Protein kinase C isozymes and substrates, *Curr Opin Cell Biol* 8 (1996) 168-173.
- [61] F. J. Johannes, J. Prestle, S. Eis, P. Oberhagemann, and K. Pfizenmaier, PKC ϵ is a novel, atypical member of the protein kinase C family, *J Biol Chem* 269 (1994) 6140-6148.
- [62] J. V. Lint, A. Rykx, T. Vantus, and J. R. Vandenheede, Getting to know protein kinase D, *Int J Biochem Cell Biol* 34 (2002) 577-581.
- [63] A. M. Valverde, J. Sinnott-Smith, J. Van Lint, and E. Rozengurt, Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 8572-8576.
- [64] E. M. Dutil, L. M. Keranen, A. A. DePaoli-Roach, and A. C. Newton, In vivo regulation of protein kinase C by trans-phosphorylation followed by autophosphorylation, *J Biol Chem* 269 (1994) 29359-29362.
- [65] D. B. Parekh, W. Ziegler, and P. J. Parker, Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation, *Embo J* 19 (2000) 496-503.
- [66] A. Balendran, G. R. Hare, A. Kieloch, M. R. Williams, and D. R. Alessi, Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms, *FEBS Lett* 484 (2000) 217-223.

- [67] J. W. Orr, and A. C. Newton, Requirement for negative charge on "activation loop" of protein kinase C, *J Biol Chem* 269 (1994) 27715-27718.
- [68] M. F. Denning, A. A. Dlugosz, D. W. Threadgill, T. Magnuson, and S. H. Yuspa, Activation of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway stimulates tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta, *J Biol Chem* 271 (1996) 5325-5331.
- [69] Y. Liu, S. Witte, Y. C. Liu, M. Doyle, C. Elly, and A. Altman, Regulation of protein kinase C theta function during T cell activation by Lck-mediated tyrosine phosphorylation, *J Biol Chem* 275 (2000) 3603-3609.
- [70] A. C. Newton, Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions, *Chem Rev* 101 (2001) 2353-2364.
- [71] K. Sato, and S. Kawashima, Calpain function in the modulation of signal transduction molecules, *Biol Chem* 382 (2001) 743-751.
- [72] D. Mochly-Rosen, and A. S. Gordon, Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity, *Faseb J* 12 (1998) 35-42.
- [73] A. C. Newton, Regulation of protein kinase C, *Curr Opin Cell Biol* 9 (1997) 161-167.
- [74] H. Mischak, J. Goodnight, D. W. Henderson, S. Osada, S. Ohno, and J. F. Mushinski, Unique expression pattern of protein kinase C-theta: high mRNA levels in normal mouse testes and in T-lymphocytic cells and neoplasms, *FEBS Lett* 326 (1993) 51-55.
- [75] G. Baier, D. Telford, L. Giampa, K. M. Coggeshall, G. Baier-Bitterlich, N. Isakov, and A. Altman, Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells, *J Biol Chem* 268 (1993) 4997-5004.
- [76] K. Bi, Y. Tanaka, N. Coudronniere, K. Sugie, S. Hong, M. J. van Stipdonk, and A. Altman, Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation, *Nat Immunol* 2 (2001) 556-563.
- [77] M. Villalba, K. Bi, F. Rodriguez, Y. Tanaka, S. Schoenberger, and A. Altman, Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells, *J Cell Biol* 155 (2001) 331-338.
- [78] C. R. Monks, H. Kupfer, I. Tamir, A. Barlow, and A. Kupfer, Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation, *Nature* 385 (1997) 83-86.
- [79] G. Werlen, E. Jacinto, Y. Xia, and M. Karin, Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes, *Embo J* 17 (1998) 3101-3111.
- [80] G. Baier-Bitterlich, F. Uberall, B. Bauer, F. Fresser, H. Wachter, H. Grunicke, G. Utermann, A. Altman, and G. Baier, Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes, *Mol Cell Biol* 16 (1996) 1842-1850.

- [81] C. Pfeifhofer, K. Kofler, T. Gruber, N. G. Tabrizi, C. Lutz, K. Maly, M. Leitges, and G. Baier, Protein kinase C theta affects Ca²⁺ mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells, *J Exp Med* 197 (2003) 1525-1535.
- [82] N. Coudronniere, M. Villalba, N. Englund, and A. Altman, NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 3394-3399.
- [83] L. P. Kane, P. G. Andres, K. C. Howland, A. K. Abbas, and A. Weiss, Akt provides the CD28 costimulatory signal for up-regulation of IL-2 and IFN-gamma but not TH2 cytokines, *Nat Immunol* 2 (2001) 37-44.
- [84] B. Bauer, N. Krumbock, F. Fresser, F. Hochholdinger, M. Spitaler, A. Simm, F. Uberall, B. Schraven, and G. Baier, Complex formation and cooperation of protein kinase C theta and Akt1/protein kinase B alpha in the NF-kappa B transactivation cascade in Jurkat T cells, *J Biol Chem* 276 (2001) 31627-31634.
- [85] S. P. Hehner, M. Li-Weber, M. Giaisi, W. Droge, P. H. Krammer, and M. L. Schmitz, Vav synergizes with protein kinase C theta to mediate IL-4 gene expression in response to CD28 costimulation in T cells, *J Immunol* 164 (2000) 3829-3836.
- [86] M. D. Eisenbraun, A. Tamir, and R. A. Miller, Altered composition of the immunological synapse in an anergic, age- dependent memory T cell subset, *J Immunol* 164 (2000) 6105-6112.
- [87] M. Villalba, N. Coudronniere, M. Deckert, E. Teixeira, P. Mas, and A. Altman, A novel functional interaction between Vav and PKCtheta is required for TCR-induced T cell activation, *Immunity* 12 (2000) 151-160.
- [88] M. Villalba, J. Hernandez, M. Deckert, Y. Tanaka, and A. Altman, Vav modulation of the Ras/MEK/ERK signaling pathway plays a role in NFAT activation and CD69 up-regulation, *Eur J Immunol* 30 (2000) 1587-1596.
- [89] N. Ghaffari-Tabrizi, B. Bauer, A. Villunger, G. Baier-Bitterlich, A. Altman, G. Utermann, F. Uberall, and G. Baier, Protein kinase Ctheta, a selective upstream regulator of JNK/SAPK and IL-2 promoter activation in Jurkat T cells, *Eur J Immunol* 29 (1999) 132-142.
- [90] A. Avraham, S. Jung, Y. Samuels, R. Seger, and Y. Ben-Neriah, Co-stimulation-dependent activation of a JNK-kinase in T lymphocytes, *Eur J Immunol* 28 (1998) 2320-2330.
- [91] A. Moller, O. Dienz, S. P. Hehner, W. Droge, and M. L. Schmitz, Protein kinase C theta cooperates with Vav1 to induce JNK activity in T- cells, *J Biol Chem* 276 (2001) 20022-20028.
- [92] C. Dong, D. D. Yang, C. Tournier, A. J. Whitmarsh, J. Xu, R. J. Davis, and R. A. Flavell, JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation, *Nature* 405 (2000) 91-94.

- [93] Z. Sun, C. W. Arendt, W. Ellmeier, E. M. Schaeffer, M. J. Sunshine, L. Gandhi, J. Annes, D. Petrzilka, A. Kupfer, P. L. Schwartzberg, and D. R. Littman, PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes, *Nature* 404 (2000) 402-407.
- [94] W. Kolanus, and B. Seed, Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3, *Curr Opin Cell Biol* 9 (1997) 725-731.
- [95] M. L. Dustin, and J. A. Cooper, The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling, *Nat Immunol* 1 (2000) 23-29.
- [96] A. Roumier, J. C. Olivo-Marin, M. Arpin, F. Michel, M. Martin, P. Mangeat, O. Acuto, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover, The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation, *Immunity* 15 (2001) 715-728.
- [97] R. A. Rebres, J. M. Green, M. I. Reinhold, M. Ticchioni, and E. J. Brown, Membrane raft association of CD47 is necessary for actin polymerization and protein kinase C theta translocation in its synergistic activation of T cells, *J Biol Chem* 276 (2001) 7672-7680.
- [98] S. F. Pietromonaco, P. C. Simons, A. Altman, and L. Elias, Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence, *J Biol Chem* 273 (1998) 7594-7603.
- [99] N. Meller, Y. C. Liu, T. L. Collins, N. Bonnefoy-Berard, G. Baier, N. Isakov, and A. Altman, Direct interaction between protein kinase C theta (PKC theta) and 14-3-3 tau in T cells: 14-3-3 overexpression results in inhibition of PKC theta translocation and function, *Mol Cell Biol* 16 (1996) 5782-5791.

II. - ANTECEDENTES

La especificidad de una respuesta inmune adquirida a través de células T está determinada por la interacción entre su TCR con un antígeno específico bajo el contexto de las moléculas clásicas del MHC expresadas en la superficie de las APC. Sin embargo la respuesta final de esta estimulación, ya sea la activación celular o la anergia celular, depende de las señales intracelulares generadas por las interacciones de los co-receptores con sus respectivos contrarreceptores en la APC. Se ha propuesto que entre los principales mecanismos de señalización que movilizan las moléculas co-receptoras está el de aumentar y prolongar la hidrólisis de los fosfoinosítidos de membrana, y por ende, la activación de las proteínas cinasas C (PKC). Esto está sustentado por el hecho de que, en células transformadas (células Jurkat) o en linfocitos T humanos normales, las señales generadas por las moléculas co-receptoras pueden ser sustituidas al tratar a las células con ésteres de forbol (PMA, análogos no hidrolizables del diacilglicerol), los cuales unen y activan a las PKC (Palacios, 1985 #2).

Nuestro grupo de trabajo está interesado en determinar el papel fisiológico que tiene el co-receptor CD43 en la respuesta inmune adquirida y mucho de su esfuerzo se ha enfocado en dilucidar los mecanismos de señalización que son inducidos por ésta molécula.

En las células T el entrecruzamiento de CD43 lleva a la activación y proliferación celular, a la producción de citocinas, a la migración y a la adhesión homotípica. A nivel molecular, la vía de señalización de CD43 requiere de la generación de IP_3 y de DAG con la elevación inmediata de los niveles de Ca^{+2} intracelular y la activación de PKC (Axelsson, 1988 #120; Silverman, 1989 #71). Existen evidencias experimentales que sugieren

la participación de isoformas de PKC en las vías de señalización inducidas por CD43: 1) la fosforilación en serinas de Cbl y su asociación con la molécula 14-3-3 (Pedraza-Alva, 2001 #72); 2) la activación de ERK1/2 (Pedraza-Alva, 1998 #80); 3) la activación de factores transcripcionales como AP-1, NF- κ B y NFAT, importantes para la transcripción del gen de IL-2 (Santana, 2000 #73) y 4) regular el proceso de adhesión homotípica (Layseca-Espinosa, 2003 #195).

Sin embargo, hasta el momento no se conocen cuáles isoformas de PKC se activan en respuesta a la estimulación con CD43 y de qué forma éstas cinasas regulan la función de CD43.

III.- HIPOTESIS DE TRABAJO

Dado que el entrecruzamiento de CD43 en células T promueve la activación de los factores de activación para PKC, DAG y Ca^{+2} , y puesto que PKC juega un papel importante en la activación de las células T, proponemos que la activación de los linfocitos T a través del co-receptor CD43 requiere de la activación selectiva de una o varias isoformas de PKC, las cuales podrían regular algunos procesos fundamentales que conducen a la activación celular.

IV.- OBJETIVOS

4.1.- Objetivo general.

Determinar cuáles isoenzimas de PKC son activadas en células T en respuesta a la estimulación a través de CD43, y cuál es el papel fisiológico de éstas en los mecanismos de señalización en los que está involucrado el co-receptor CD43.

4.2.- Objetivos específicos.

4.2.1.- Determinar qué isoformas de PKC son afectadas en células T en respuesta al entrecruzamiento a través de CD43.

4.2.1.1.- Analizar el patrón de expresión de los diferentes miembros de la familia de PKC en los modelos a estudiar: la línea celular Jurkat (linfoma de células T) y linfocitos T provenientes de donadores humanos sanos.

4.2.1.2.- Definir cuáles isoformas de PKC son translocadas a la membrana en respuesta a la estimulación a través de CD43.

4.2.1.3.- Determinar cuáles isoformas de PKC son activadas enzimáticamente (ensayo de cinasa *in vitro*) en respuesta al entrecruzamiento con CD43.

4.2.2. - Establecer relaciones funcionales entre CD43 y PKC.

4.2.2.1.- Determinar el papel de isoformas específicas de PKC en la activación de las MAP cinasas dependiente de CD43.

4.2.2.2.- Determinar la importancia de la activación de PKC en la capacidad de unión al DNA de los elementos transcripcionales AP-1, NF- κ B y NFAT, así como la expresión de CD43, inducidos por CD43.

4.2.2.3.- Determinar si la coestimulación TCR/CD43 requiere de la activación de PKC.

4.2.2.4.- Analizar la importancia de PKC en los rearrreglos del citoesqueleto inducidos por CD43 (establecimiento de "cap" de CD43).

V.- RESULTADOS

5.1.- Resultados enviados a publicación.

PKC θ is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement.

Roxana del Rio, Mercedes Rincón, Esther Layseca-Espinoza, Nora A. Fierro, Yvonne Rosenstein, Gustavo Pedraza-Alva.

Biochemical and Biophysical Research Communications 325 (2004) 133-143.



PKC θ is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement[☆]

Roxana del Rio^a, Mercedes Rincón^b, Esther Layseca-Espinosa^c, Nora A. Fierro^a
Yvonne Rosenstein^{a,*}, Gustavo Pedraza-Alva^{a,b,*}

^a Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México, AP 510-3 Cuernavaca, Mor. 62250, Mexico

^b Department of Medicine/Immunobiology Division, University of Vermont, Burlington, VT 05405, USA

^c Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P., Mexico

Received 26 September 2004

Abstract

The turnover of phosphoinositides leading to PKC activation constitutes one of the principal axes of intracellular signaling. In T lymphocytes, the enhanced and prolonged PKC activation resulting from the engagement of the TcR and co-receptor molecules ensures a productive T cell response. The CD43 co-receptor promotes activation and proliferation, by inducing IL-2 secretion and CD69 expression. CD43 engagement has been shown to promote phosphoinositide turnover and DAG production. Moreover, PKC activation was found to be required for the activation of the MAP kinase pathway in response to CD43 ligation. Here we show that CD43 engagement led to the membrane translocation and enzymatic activity of specific PKC isoenzymes: cPKC (α/β), nPKC (ϵ and θ), aPKC (ζ) and PKC μ . We also show that activation of PKC θ resulting from CD43 ligation induced CD69 expression through an ERK-dependent pathway leading to AP-1, NF- κ B activation and an ERK independent pathway promoting NFAT activation. Together, these data suggest that PKC θ plays a critical role in the co-stimulatory functions of CD43 in human T cells.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: CD43; PKC; T cell activation; NFAT; AP-1; NF- κ B; CD69

The interaction between the antigenic peptide presented by the major histocompatibility complex molecules (MHC) on the antigen-presenting cell (APC) and the T cell receptor (TcR)/CD3 complex on the T lymphocyte

is the first requirement to induce an antigen-specific T cell response. However, T cell activation depends also on additional signals provided by the association of co-receptor molecules with their counter-receptors on the APC. The fact that those co-stimulatory signals can be replaced by phorbol esters (PMA), which bind and activate most members of the family of protein kinase C (PKC), strongly suggests that some of the signals delivered through these co-receptors depend on PKC activation [1–3].

The CD43 molecule is a heavily glycosylated transmembrane protein expressed on the surface of most hemopoietic cells. Its extracellular domain has an elongated structure that protrudes 45 nm from the cell surface. On T cells, CD43 is differentially glycosylated, generating two major forms: a 113–123 kDa product,

[☆] Abbreviations: MHC, major histocompatibility complex; APC, antigen presenting cell; TcR, T cell receptor; PKC, protein kinase C; PMA, phorbol myristate acetate; DAG, diacylglycerol; MAP kinase, mitogen-activated protein kinase; AP-1, activator protein-1; NF- κ B, nuclear factor κ B; NFAT, nuclear factor of activated T cells; mAb, monoclonal antibody; cSMAC, central core of the supramolecular activation complex; Rott, rottlerin; PD98, PD98059; G δ 69, G δ 6976; MBP, myelin basic protein.

* Corresponding authors. Fax: +52 777 3291854 (Y. Rosenstein), +1 802 656 3854 (G. Pedraza-Alva).

E-mail addresses: yvonne@ibt.unam.mx (Y. Rosenstein), mpedraza@uvm.edu (G. Pedraza-Alva).

mainly present on resting CD4⁺ T lymphocytes, and a 125–135 kDa form expressed mostly on CD8⁺ T lymphocytes and activated CD4⁺ T lymphocytes (review in [4]). CD43 engagement has been shown to enhance TcR-mediated cell proliferation and IL-2 production in wild type and CD28^{-/-} T cells [5–7]. Furthermore, CD43-mediated signals were recently shown to enhance HIV-1-dependent gene expression in response to TcR ligation [8].

Engagement of CD43 on T cells leads to the interaction of its cytoplasmic domain with the Src-tyrosine kinase family members Fyn [9] and Lck [10]. This interaction activates both tyrosine kinases resulting in tyrosine phosphorylation of the CD3 complex ζ chain and ZAP-70 [11]. ZAP-70 then phosphorylates downstream molecules allowing the formation of macromolecular complexes containing Shc-GRB2-Vav and Vav-SLP-76 [12]. These early events lead to activation of the MAP kinase pathway resulting in recruitment of AP-1, NF- κ B, and NFAT transcription factors, ultimately regulating gene expression [12,13].

The PKC family consists of serine/threonine-specific protein kinases that transduce a plethora of signals mainly derived from the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). At present, 11 different PKC isoenzymes have been identified and classified according to their structure and cofactor requirements for activation [14]. In addition to the membrane lipid phosphatidylserine, the classical PKC (cPKC) α , β / β II, and γ isoforms require diacylglycerol (DAG) and Ca²⁺ for activation. In contrast, the novel PKCs (nPKC) δ , ϵ , η , and θ isoforms, together with the related protein PKC μ (murine homologue protein kinase D, PKD) need DAG but do not require Ca²⁺ [14,15]. Regulation of the atypical PKC (aPKC) ζ and ι isoforms has not been clearly established [16,17]. With the exception of PKC γ , all the PKC isoforms are expressed in T cells [18,19]. However, among them, PKC θ plays a particularly important role in T cell activation. T cell stimulation by TcR ligation induces the translocation of PKC θ to membrane lipid rafts and its localization at the central core of the supramolecular activation complex (cSMAC) formed at the contact region between antigen-specific T cells and APC [20–22]. Studies performed on mature T cells from PKC θ ^{-/-} mice [23,24] and on human T cell lines transfected with constitutive active or inactive forms of PKC θ [2,25–27] have demonstrated that activation of Ras, AP-1, NF- κ B, and NFAT are PKC θ -dependent events. In addition, PKC θ induces activation of the c-Jun-N-terminal kinase (JNK), expression of the IL-2 gene and of the leukocyte early activation antigen CD69 [2,27–30].

CD43 engagement has been shown to promote phosphoinositide turnover and DAG production [1]. Recently, we have shown that IL-2 gene expression induced in response to CD43 signaling is a Ca²⁺- and

PKC-dependent event [13] and that PKC activity was required to trigger the MAP kinase pathway after CD43 ligation [12]. However, it is unknown what members of the PKC family of proteins are activated after CD43 engagement. In the present study, we show that CD43 engagement induces the membrane translocation and the catalytic activity of specific PKC isoenzymes: cPKC (α / β -II), nPKC (ϵ and θ), aPKC (ζ), and PKC μ in human T lymphocytes. We also show that, by regulating MAP kinase activity and the DNA binding of the AP-1, NF- κ B, and NFAT transcription factors PKC θ plays a critical role in the CD43-dependent CD69 expression. Together, our results suggest that CD43 co-receptor functions require PKC θ activity.

Materials and methods

Reagents. L10, an IgG1 mAb that recognizes CD43 [31], was purified from ascites on protein A-Sepharose columns or used as ascites. Rabbit anti-mouse IgG (R α MiG) was generated by repeated immunization with purified mouse IgG, and anti-mouse IgG immunoglobulins were affinity-purified. The anti-CD3 mAb OKT3 (IgG2) was originally obtained from the American Type Culture Collection. The antibodies recognizing different PKC isoforms and anti-STAT1 antibody were from Transduction Laboratories. The anti-actin and anti-c-Fos antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology. The anti-CD69 antibody was from Caltag. The protein A- or A/G-Sepharose was from Zymed Laboratories. Rotterlin, G66976, and PD98059 were from Calbiochem.

Cell culture. Jurkat cells were cultured in RPMI 1640 (Hyclone) supplemented with 5% fetal calf serum (Hyclone) and 5% bovine iron supplemented calf serum (Hyclone), 2 mM L-glutamine, 50 μ g/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, and 50 μ M β -mercaptoethanol. Peripheral blood T cells were isolated from healthy adult donors by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation, followed by plastic adherence and nylon wool purification, as described [9]. The resultant purified cells were predominantly (>85%) OKT3⁺ and L10⁺ (>95%), as determined by FACS analysis. Prior to stimulation, cells were washed and incubated for 2 h in non-supplemented RPMI.

T cell activation. Jurkat cells or purified human T lymphocytes (2 \times 10⁷) were incubated in 0.5 ml RPMI for 5 min at room temperature with L10 (4 μ g/ml). Crosslinking and activation were achieved by adding R α MiG (4 μ g/ml) and further incubating the cells at 37 °C for different times, as indicated in the text. Cells were treated with R α MiG or with isotype control IgG1, as negative controls. As positive control, cells were activated with PMA (50 ng/ml). When indicated, rotterlin (6 μ M), PD98059 (50 μ M), G66976 (0.5 μ M) or the solvent (DMSO) was added 15 min prior to activation.

FACS staining. Briefly, cells (1 \times 10⁶) were resuspended in 50 μ l phosphate-buffered saline containing 2% fetal calf serum and 1% sodium azide (FACS solution) and incubated with anti-CD3 (OKT3), anti-CD43 (L10), anti-CD69 or isotype control mAbs for 20 min at 4 °C. Cells were washed, resuspended in FACS solution, and fixed with 2% paraformaldehyde. Cells were analyzed with a FACSsort with the CELLQUEST program (Becton and Dickinson).

Immunoprecipitation and immunoblot analysis. Cells were lysed in 100 μ l lysis buffer [25 mM Hepes (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5 mM dithiothreitol, 20 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 4 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml leupeptin, and 1 μ g/ml aprotinin] for 20 min at 4 °C. Cell lysates were spun at 13,000g for 15 min at 4 °C, and supernatants were precleared with protein A-Sepharose for

at least 2 h at 4 °C prior to immunoprecipitation with the indicated antibody (1 µg/ml) for 2 h at 4 °C and immune complexes were harvested with protein A/G–Sepharose, overnight at 4 °C. Proteins from total cell extracts or immunoprecipitates were resolved on SDS–PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% non-fat milk in TBS-T [10 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20], followed by incubation with the indicated antibody diluted in 5% non-fat milk or 3% BSA in TBS-T. After three washes with TBS-T, membranes were incubated with the appropriate secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (Biomed). Proteins were visualized by ECL (Amersham–Pharmacia Biotech), following the manufacturer's instructions.

In vitro kinase assays. Specific PKC isoforms were immunoprecipitated from stimulated or control cell lysates as described above. Immune complexes were washed twice with lysis buffer, twice with kinase buffer [20 mM Hepes (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 20 mM β-glycerophosphate, 2 mM Na₃VO₄, and 0.1 mM EGTA (PKCθ) or 0.1 mM CaCl₂ (cPKC)] and incubated at 30 °C for 20 min with 25 µl of kinase buffer containing 10 µCi [γ-³²P]ATP (3000 Ci/mmol, NEN, Boston, MA), 100 µM ATP, and 2.5 µg myelin basic protein (MBP) as exogenous substrate [30]. The reaction was centrifuged and the supernatant was mixed with an equal volume of 2× SDS–PAGE loading buffer, while the A/G–Sepharose beads were mixed with 20 µl of 2× SDS–PAGE loading buffer. Proteins were separated by SDS–PAGE and radiolabeled MBP was visualized by X-ray film exposure. The amount of precipitated PKC was determined by Western blot analysis and the amount of MBP by Coomassie blue staining.

Subcellular fractionation. Experiments were conducted basically as described [32] with the following modifications. Cells were resuspended in cold hypotonic buffer [42 mM KCl, 10 mM Hepes (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, and 10 µg/ml each aprotinin and leupeptin] and incubated at 4 °C for 20 min, transferred to a 1 ml syringe, and sheared by being passed 10 times through a 29-gauge needle. Lysates were centrifuged at 200g for 10 min at 4 °C to precipitate nuclei, and the supernatant was collected and centrifuged at 100,000g for 1 h at 4 °C (cytosolic fraction). The pellet (membrane fraction) was resuspended in 100 µl of lysis buffer and vortexed for 20 min at 4 °C. Samples containing 10⁶ cellular equivalents of membrane fraction were separated by SDS–PAGE and immunoblotted with the appropriated Ab.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Nuclear extracts were prepared from stimulated and unstimulated T cells as previously described [33,34]. Binding reactions were carried out using 2 µg nuclear proteins and [³²P]dCTP-end labeled double-stranded oligonucleotide probes containing an NFAT binding site from the proximal IL-4 gene promoter [35], an AP-1 binding site from the collagenase gene promoter [36], NF-κB binding site from the mouse κ intron enhancer [37] or a consensus SP-1 binding site. Samples were separated by electrophoresis under non-denaturing conditions and exposed to film for autoradiography.

Transfection. Jurkat cells were transfected with expression vectors encoding for wild type PKCθ or a dominant negative PKCθ mutant [2] using the cell line nucleofactor kit V from Amaxa, following Amaxa's optimized protocol. Transfected cells were cultured for 24 h before stimulation; after 8 h stimulation, cells were harvested and nuclear extracts were prepared.

Results

CD43 induces the translocation to the membrane of PKCα/β, ε, θ, ζ, and μ

Several lines of evidences suggested that members of the PKC family were involved in the CD43-dependent

T cell activation [1,13,38]. However, it is presently unknown whether PKC is directly activated in response to CD43 engagement. As a first step towards understanding the role of these enzymes in the CD43 signaling pathway, we initially characterized the profile of PKC isoforms present in Jurkat cells and normal human T lymphocytes. Immunoblot analysis of whole cells extracts with antibodies specific for different PKC isoforms revealed that, consistent with previously published data [39,40], Jurkat cells and normal human T lymphocytes expressed the following PKCs: cPKC: α and βI/βII; nPKC: ε, θ, and δ; aPKC: ι and ζ as well as PKCμ (data not shown).

Taking advantage of the fact that in resting cells, PKCs have preferentially a cytoplasmic distribution and become membrane-associated upon activation [41], we investigated which PKC isoenzymes were recruited to the membrane in response to CD43 engagement. T cells were stimulated with the anti-CD43 L10 mAb for different periods of time, or with PMA as a positive control, and the presence of specific PKC isoforms in the membrane fraction was evaluated. In Jurkat cells, CD43 activation induced a transient translocation to the membrane of a slow migrating form of the cPKCα/β isoforms, peaking at 5 min and decreasing to undetectable levels after 15 min stimulation. Phosphorylation of the membrane-bound form of PKCα/β results in its activation and slow mobility in SDS–PAGE [42,43], suggesting that CD43 engagement results in translocation to the membrane of active cPKCα/β. PMA treatment clearly enhanced the levels of PKCα/β on the membrane fraction. However, in agreement with previously published data PMA treatment did not result in a change in the mobility of PKCα/β [44]. Similar levels of CD43 were found in all lanes indicating equal protein loading (Fig. 1A). CD43 engagement resulted also in activation of novel PKC isoforms. PKCε and PKCθ translocated to the membrane after 1 min stimulation and remained so until 15 min following activation, whereas the distribution of PKCδ was not affected. In contrast, PMA induced the translocation to the membrane of all nPKC isoforms (Fig. 1B). Crosslinking CD43 for 5 min resulted in transient translocation of the aPKCζ isoenzyme to the membrane, while the levels of PKCι remained stable, as compared to control cells. Both aPKC isoenzymes were resistant to PMA-activation (Fig. 1C), as previously reported [45]. Finally, a transient enhancement in the levels of PKCμ detected in the membrane fraction was found as a result of CD43 activation, peaking at 5 min stimulation and decreasing after 15 min to levels lower than those found in control-treated cells. PMA stimulation resulted also in membrane translocation of PKCμ (Fig. 1D). These results suggest that the CD43 signaling pathways involve the activation of cPKCα/β, nPKCθ and ε, aPKCζ, and PKCμ.

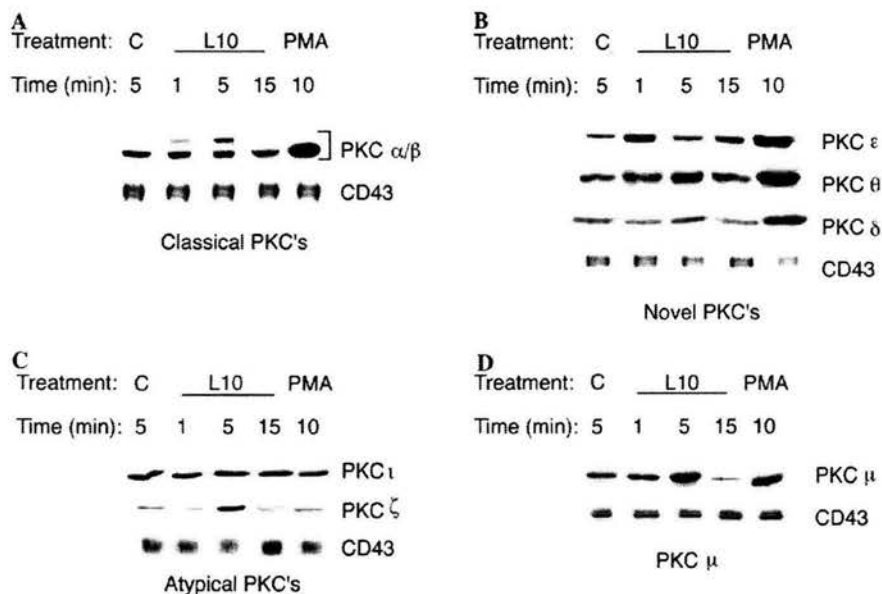


Fig. 1. CD43 induces the translocation to the membrane of PKC α/β , ϵ , θ , ζ , and μ . Jurkat cells were activated as described under Materials and methods with R α MiG only ("C"), the anti-CD43 L10 mAb or PMA. Membrane fractions were prepared and the levels of (A) PKC α/β , (B) PKC ϵ , PKC θ , and PKC δ , (C) PKC ι and PKC ζ , and (D) PKC μ were determined by Western blot analysis. CD43 levels were determined as loading control (bottom panel). Results are representative of three independent experiments.

CD43 engagement promotes PKC θ and PKC α/β catalytic activity

PKC θ and PKC α/β have been shown to play a role in Ag-dependent T cell activation [23,24,46–48]. Since we had found that the CD43-dependent signals resulted in membrane translocation of PKC θ and PKC α/β , we evaluated whether CD43 engagement promoted also their kinase activity. In vitro kinase assays were performed on PKC θ and PKC α/β immunoprecipitates obtained from Jurkat cells or human peripheral blood T lymphocytes activated with the anti-CD43 L10 mAb. PKC θ activity resulting of crosslinking CD43 on Jurkat cells (Fig. 2A) or normal T lymphocytes (Fig. 2B) followed a very similar kinetics, with maximum enzymatic activity at 1 and 5 min after activation. PKC θ kinase activity after CD43 engagement was approximately 3-fold above the levels observed in R α MiG-treated cells. Whereas, PKC α/β kinase activity was increased 2-fold in Jurkat cells (Fig. 2C) as well as in human T lymphocytes (Fig. 2D), 1 min after CD43 engagement. As expected, PMA treatment enhanced PKC θ and PKC α/β catalytic activity (Figs. 2A–D). Thus, engagement of the CD43 molecule in human T cells induces PKC θ and PKC α/β enzymatic activity.

Activation of the MAP kinase pathway induced through CD43-mediated signals is PKC θ -dependent

We have previously shown that crosslinking CD43 on the T cell surface leads to activation of the ERK MAP kinase [12]. To further delineate the role of members

of the PKC family in the CD43-mediated signals, we investigated the participation of PKC θ and/or PKC α/β in ERK 1/2 MAP kinase activation by using rottlerin, a selective PKC θ inhibitor, or G δ 6976, a cPKC isoenzyme inhibitor [49,50]. As previously reported [12], engagement of CD43 on Jurkat cells resulted in a time-dependent ERK phosphorylation (Fig. 3). However, when cells were pre-incubated with rottlerin, ERK activation was abrogated. Similarly, PMA-mediated ERK phosphorylation was reduced in the presence of rottlerin (Fig. 3A). In contrast, the selective cPKC inhibitor, G δ 6976, had no negative effect on the CD43-induced ERK activation, yet it reduced ERK phosphorylation levels induced in response to PMA stimulation (Fig. 3B). Equivalent amounts of protein were present in all lanes as determined by blotting the same membranes with anti-actin antibody. At the concentration used, rottlerin (6 μ M) and G δ 6976 (0.5 μ M) selectively inhibited PKC θ and PKC α/β , respectively, as determined by in vitro kinase assays (data not shown) in agreement with previously published data [51]. Thus, these results suggest that although CD43 can activate PKC θ and PKC α/β , PKC θ but not PKC α/β is involved in the early activation of ERK resulting from CD43 engagement.

PKC θ is required to induce AP-1, NF- κ B, and NFAT DNA binding in response to CD43 engagement

Receptor-induced AP-1, NF- κ B, and NFAT activation has been shown to be deficient in PKC θ knockout T lymphocytes [23,24]. Since we had previously shown

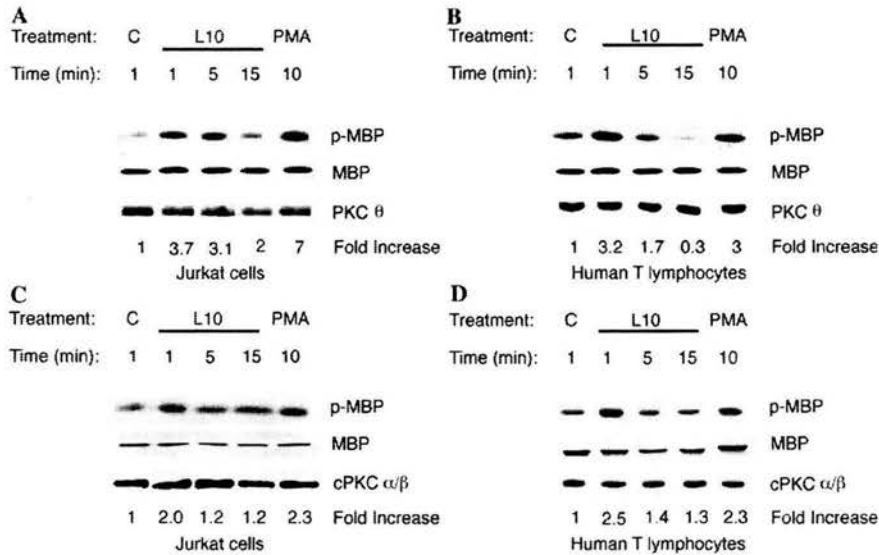


Fig. 2. CD43 engagement promotes PKCθ and PKCα/β catalytic activity. Jurkat cells (A,C) or human T lymphocytes (B,D) were stimulated as described under Materials and methods with RαMIg only (“C”), the anti-CD43 L10 mAb or with PMA. PKCθ (A,B) or PKCα/β (C,D) were immunoprecipitated from precleared cell lysates and enzymatic activities were evaluated by an in vitro kinase reaction using MBP as a substrate. Phosphorylated MBP (p-MBP) was resolved by SDS-PAGE and detected by autoradiography (top panel). Total MBP was visualized by Coomassie blue staining (middle panel). The actual amount of PKC present in each lane was determined by Western blot analysis with anti-PKCθ or PKCα/β antibodies (bottom panel). “Fold Increase” represent the phosphorylation levels of MBP corrected for the amount of MBP present, and PKCθ or cPKC immunoprecipitated in each experimental condition was compared with the value obtained in control cells. A representative experiment of three is shown.

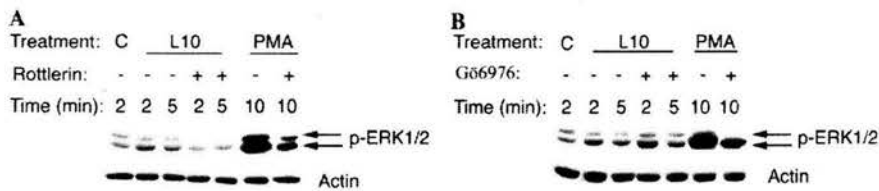


Fig. 3. Activation of the MAP kinase pathway induced in response to CD43-mediated signals is PKCθ-dependent. Jurkat cells were activated with RαMIg (“C”), with the anti-CD43 L10 mAb or with PMA. Before activation, cells were incubated with rottlerin (A) or Gö6976 (B). Whole cell extracts were prepared and the levels of phosphorylated ERK (p-ERK) were determined by Western blot analysis. The levels of actin were determined as a loading control.

that in human T cells, CD43 signaling enhances AP-1, NF-κB, and NFAT DNA binding activity [13], we investigated whether the positive effect on the DNA binding activity of these transcription factors in response to CD43 ligation was mediated through a PKCθ-ERK pathway. Blocking PKCθ or MEK activation with rottlerin or PD98059, respectively, reduced AP-1 DNA binding activity in response to CD43 engagement (Fig. 4A), while consistent with data presented above, the cPKC inhibitor, Gö6976, had a minor effect on AP-1 binding. These results suggest that PKCθ and ERK activation is required to promote AP-1 DNA binding activity in response to CD43 crosslinking.

In T cells, TcR activation up-regulates c-Fos expression, resulting in AP-1 binding activity and transactivation of target genes such as the IL-2 gene [52]. c-Fos expression depends, at least in part, on activation of

the transcription factor Elk1 through the ERK pathway [53–55]. Since our data suggested that ERK activation was downstream of PKCθ in the CD43-mediated signaling cascade leading to AP-1 DNA binding, we tested whether PKCθ activation was required to induce c-Fos expression in response to CD43 engagement in T cells. The levels of the c-Fos protein detected in nuclear extracts from CD43-activated Jurkat cells were higher than those found in control cells. This was prevented by the PKCθ inhibitor rottlerin, while blocking MEK or cPKCα/β catalytic activities had no effect on the levels of c-Fos found in the nucleus of CD43-stimulated cells (Fig. 4B). CD43 engagement did not alter STAT-1 protein levels (Fig. 4B), indicating that the increase in c-Fos levels is specific and that it does not reflect a generalized effect on gene expression. This also shows that at the concentrations used the PKC inhibitors did

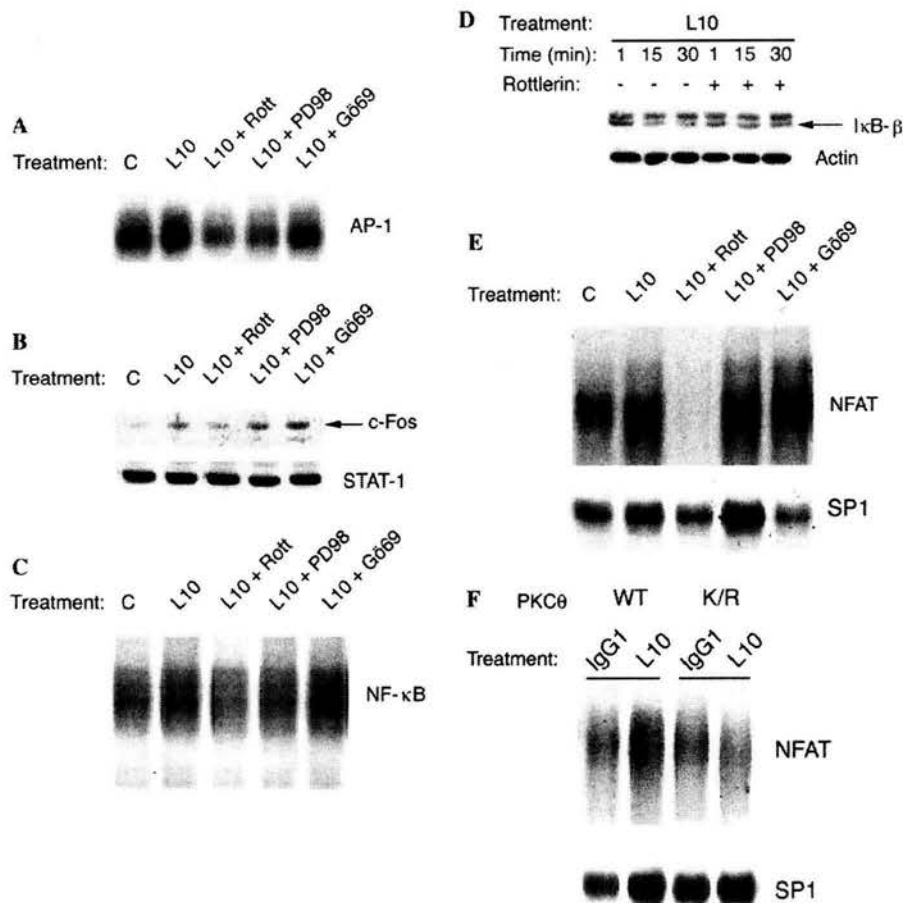


Fig. 4. PKC θ activation is required to induce AP-1, NF- κ B, and NFAT DNA binding in response to CD43 engagement. (A) Jurkat cells were stimulated as described under Materials and methods with α MiG only ("C") or the anti-CD43 mAb L10 for 8 h. Where indicated, cells were stimulated in the presence of rottlerin (Rott), PD98059 (PD98), or G66976 (G669). Nuclear extracts were prepared and the AP-1 binding activity was determined by EMSA analysis. (B) Nuclear extracts were prepared from cells stimulated as described in (A) and the levels of c-Fos and STAT-1 were determined by Western blot analysis. (C) Cells were treated as in (A) and nuclear extracts were used to determine NF- κ B binding activity by EMSA analysis. (D) Jurkat cells were stimulated with the anti-CD43 L10 mAb in the presence or absence of rottlerin. Total cell extracts were prepared and the levels of I κ B- β and actin were determined by Western blot analysis. (E) Nuclear extracts from Jurkat cells stimulated as in (A) and were used to determine NFAT DNA binding activity by EMSA analysis. (F) Jurkat cells transfected with wild type PKC θ (WT) or with a dominant negative PKC θ mutant (K/R) were stimulated with isotype control antibodies (IgG1) or with the anti-CD43 mAb L10 for 8 h and nuclear extracts were used to determine NFAT and SP1 binding activity. Similar results were obtained in two independent experiments.

not have a pleiotropic effect on the cell metabolism. These results indicate that PKC θ regulates AP-1 DNA binding activity by inducing c-Fos expression in response to CD43-specific signals.

PKC θ has also been shown to be required for NF- κ B activation [2,23,26]. To test whether PKC θ played a role in the NF- κ B activation mediated by CD43 signals, the NF- κ B DNA binding activity of nuclear extracts obtained from Jurkat cells stimulated with the mAb L10 was evaluated in the presence of PKC θ or MEK inhibitors. The induction in NF- κ B DNA binding activity observed after CD43 engagement was partially abrogated by rottlerin or PD98059 (Fig. 4C). In contrast, preventing cPKC activation with the inhibitor G66976 had no effect on the CD43-induced NF- κ B DNA binding. Activation of NF- κ B requires the degradation of its inhibi-

tor I κ B, which maintains NF- κ B in an inactive form in the cytoplasm [56,57]. Consistent with NF- κ B activation following CD43 engagement, CD43 ligation resulted also in I κ B degradation, in a PKC θ -dependent fashion (Fig. 4D). These results suggest that the CD43-induced NF- κ B DNA binding activity is dependent on PKC θ and ERK activation.

It was recently shown that following TcR engagement, PKC θ regulates the DNA binding activity of NFAT by modulating IP $_3$ and Ca $^{2+}$ levels [24]. Since CD43 engagement results also in activation of this transcription factor [13], we assessed whether the CD43-induced NFAT DNA binding activity was mediated by PKC θ activation. Nuclear extracts obtained from Jurkat cells stimulated through CD43 were tested for NFAT DNA binding activity. Interestingly, the CD43-medi-

ated NFAT binding activity was completely blocked by rottlerin, while Gö6976 had no effect (Fig. 4E). Contrary to AP-1 and NF- κ B, inhibition of ERK did not affect NFAT binding activity (Fig. 4E). The fact that similar levels of SP-1 DNA binding activity were observed in extracts from all experimental conditions (Fig. 4E) indicates that the differences in NFAT DNA binding activity observed were not due to differences in the quality of the nuclear extracts. To confirm that the effect of rottlerin on the NFAT binding activity was due to the specific inhibition of PKC θ , Jurkat cells were transfected with expression vectors encoding wild type or a dominant negative PKC θ mutant and the DNA binding activity of NFAT was determined after CD43 engagement. In contrast to wild type PKC θ , expression of the dominant negative PKC θ mutant abolished the NFAT binding activity resulting from CD43 ligation (Fig. 4F). The effect of the dominant negative PKC θ mutant on NFAT binding was specific since the binding of the SP1 transcription factor was not affected (Fig. 4F). Together, these results suggest that in response to CD43 engagement, PKC θ but not PKC α/β regulates activation of AP-1 and NF- κ B by an ERK-dependent pathway. Furthermore, these data also suggest that PKC θ regulates NFAT activation, independently of the ERK pathway.

The CD43-dependent CD69 expression requires PKC θ activation

In T cells, PKC θ has been implicated in regulating the expression of CD69 following CD3, CD3/CD28 or PMA activation, through activation of AP-1, NF- κ B, and NFAT [23,26,58,59]. We have shown that CD43 ligation induces CD69 expression in Jurkat cells [13]. Since, CD43 engagement resulted in activation of these transcription factors in a PKC θ -dependent manner, we evaluated the participation of PKC θ in the CD43-dependent CD69 expression. As previously reported, ligation of CD43 with the L10 mAb for 24 h induced CD69 expression in Jurkat cells (Fig. 5A) and human T lymphocytes (Fig. 5B). In the presence of rottlerin, CD69 expression was inhibited by 86% in Jurkat cells (Fig. 5C), whereas in human peripheral blood T cells a 50% inhibition was observed (Fig. 5D). In the presence of the MEK selective inhibitor PD98059, the CD43-dependent CD69 expression was reduced by 50% in Jurkat cells and 35% in human T lymphocytes (Figs. 5C and D, respectively). In contrast, impairing the PKC α/β catalytic activity with the inhibitor Gö6976 in Jurkat cells or human T lymphocytes had no effect on the CD43-mediated CD69 expression. The increase in CD69 expression was specific for CD43 signals, since only 1% of the total cells were CD69⁺ when cells were incubated with an isotype control antibody (IgG1), in the absence or presence of

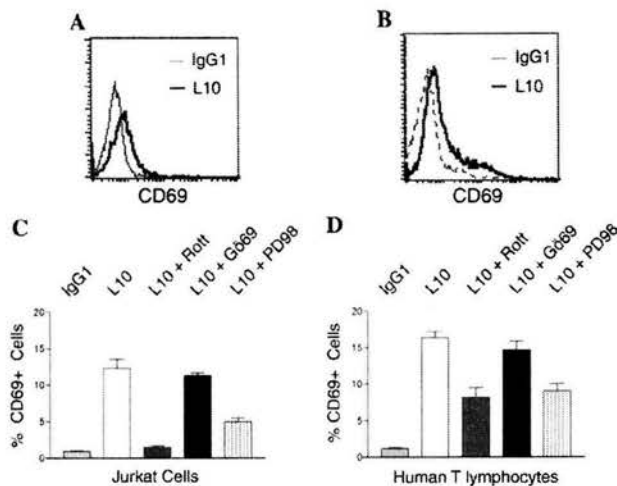


Fig. 5. CD43-dependent CD69 expression requires PKC θ activation. (A) Jurkat cells (1×10^6) or (B) human T lymphocytes (1×10^6) were stimulated for 24 h as described under Materials and methods with isotype control antibody (IgG1) or with the anti-CD43 L10 mAb, then cells were stained and CD69 expression was evaluated by flow cytometry. (C) Jurkat cells or (D) human T lymphocytes were incubated with rottlerin, Gö6976, or PD98059 for 15 min before activation and the expression of CD69 was determined 24 h later by flow cytometry, data represent the average of three independent experiments.

rottlerin (Figs. 5C and D, and data not shown). These results suggest that activation of PKC θ and ERK is necessary to induce CD69 expression in response to CD43 engagement.

Discussion

CD43 has been implicated in T cell activation, IL-2 production, and proliferation [5,6,10,13]. Although, a role for members of the PKC family has been suggested in the CD43-dependent activation of T lymphocytes [1,38,60], the direct participation of members of this family of kinases remains to be demonstrated. Here we show that in human T cells, CD43 ligation boosted the levels of membrane-bound PKC, particularly that of the cPKC α/β , the nPKC ϵ and θ , the aPKC ζ isoforms as well as PKC μ . Activation of cPKC (α/β), nPKC (ϵ and θ) by CD43 is consistent with their requirement for DAG and Ca²⁺ for being activated and with the fact that CD43 engagement results in DAG generation and Ca²⁺ mobilization [1]. Activation of PLC γ plays a central role for DAG production and increase in Ca²⁺ levels through IP₃-induced release, ultimately leading to PKC activation. We have shown that PLC γ -2 is activated in response to CD43 engagement [61] and that activation of PKC α/β as well as of PKC θ can be prevented with the PLC γ inhibitor U73122 (data not shown). Overall, these data suggest that in human T cells, CD43 ligation induces the enzymatic activity of PLC γ , increasing the

levels of DAG and Ca^{2+} , ultimately leading to activation of $\text{cPKC}\alpha/\beta$ and nPKC (ϵ and θ).

The activation of $\text{PKC}\theta$ has been shown to activate $\text{PKC}\mu$ in T cells [62], in agreement with this the activation of $\text{PKC}\theta$ precedes the recruitment to the membrane of $\text{PKC}\mu$ in response to CD43 engagement, thus it is possible that the activation of $\text{PKC}\mu$ resulting from CD43 ligation is mediated by $\text{PKC}\theta$. Although, there is experimental evidence suggesting that the activation of $\text{PKC}\zeta$ may involve a PI3K-dependent pathway [63] and CD43 ligation promotes PI3K activity ([38], Ocegüera-Yañez unpublished data), the molecular mechanism by which CD43 ligation leads to $\text{PKC}\zeta$ activation remains to be elucidated.

CD43 engagement resulted not only in the membrane localization of $\text{cPKC}\alpha/\beta$ and $\text{PKC}\theta$ molecules but it induced also their kinase activity in Jurkat cells as well as in human peripheral T lymphocytes. We have previously published that PKC activation was necessary to promote ERK activation in response to CD43 engagement [12]. Data presented here point that $\text{PKC}\theta$ but not $\text{PKC}\alpha/\beta$ activity is required to activate ERK in response to CD43. Interestingly, in $\gamma\delta$ human T lymphocytes stimulated with a isopentenyl pyrophosphate from mycobacterium, the $\text{cPKC}\alpha/\beta$ isoforms have been found to induce ERK activation [64]. Altogether, this suggests that the specific PKC isoform activating the ERK pathway in a given cell type may be determined by the receptor engaged. Moreover, the fact that $\text{PKC}\theta$ -deficient mice show no defect in ERK activation in response to TcR/CD28 ligation [23,24] suggests that the activation of ERK by $\text{PKC}\theta$ may be a species- or cell-specific mechanism.

In human T cells, CD43 engagement promotes the expression of several genes involved in innate and adaptive immunity [13,65,66], and whose expression depends on the activation of transcription factors such as AP-1, NF- κ B, and NFAT. We had previously shown that ligation of CD43 on human T cells promotes the DNA binding activity of AP-1, NF- κ B, and NFAT [13]. The data we present here suggest that, $\text{PKC}\theta$ participates in the CD43-dependent signaling leading to activation of these transcription factors, since the $\text{PKC}\theta$ catalytic activity was required to enhance c-Fos expression and AP-1 DNA binding activity. Although the ERK pathway has been shown to be required for AP-1 recruitment as well as for c-Fos expression by inducing binding of Elk-1 to the SRE [53,54], preventing ERK activation with the MEK inhibitor PD98059 had no effect on c-Fos expression in response to CD43 engagement. This result suggests that the effect of $\text{PKC}\theta$ on c-Fos expression is independent of ERK activation, and that $\text{PKC}\theta$ may use an alternative pathway to regulate SRF or Elk1 transcriptional activities to promote c-Fos expression. In agreement with this, $\text{PKC}\alpha$ and $\text{PKC}\epsilon$ have been shown to

induce the transcriptional activity of SRF independent of ERK activation [67].

Induction of NF- κ B by $\text{PKC}\theta$ involves the participation of the I κ B kinases (IKK α or β) [26]. Active IKKs phosphorylate I κ B at specific amino-terminal serine residues, allowing its ubiquitination and degradation by the 26S proteasome [68]. The fact that the I κ B- β degradation and the NF- κ B DNA binding activity we found were dependent on the catalytic activity of $\text{PKC}\theta$ suggests that the $\text{PKC}\theta$ molecules recruited in response to CD43 signals lead to NF- κ B activation through an IKK-dependent mechanism. Moreover, consistent with the activation of both I κ B kinases through the MAP kinase pathway [69,70], the CD43-mediated activation of NF- κ B was also dependent on the ERK kinase pathway. The activation of IKK in response to CD43 engagement in human T cells remains to be documented. The fact that the NF- κ B DNA binding activity was not completely prevented by rottlerin suggests that additional PKC isoforms such as $\text{PKC}\epsilon$ [71] and $\text{PKC}\zeta$ [72] or PKC independent mechanisms may also play a role in NF- κ B activation in response to CD43 engagement.

The first genetic analysis of $\text{PKC}\theta$ indicated no physiological role for this isoenzyme in the TcR/CD28-induced NFAT activation, yet it confirmed its role in AP-1 and NF- κ B activation [23]. However, in a second independent study, $\text{PKC}\theta$ deficiency abrogated the TcR/CD28-dependent NFAT activation, suggesting that $\text{PKC}\theta$ participates in NFAT activation [24]. Consistent with this, we show that NFAT activation in response to CD43 ligation on human T cells requires $\text{PKC}\theta$ kinase activity, since the addition of rottlerin abrogated the CD43-induced NFAT binding activity. The possibility that the effect of rottlerin on NFAT binding was due to the inhibition of another atypical PKC was ruled out by the fact that a dominant negative $\text{PKC}\theta$ mutant prevented NFAT binding activity. This, together with the fact that CD43 engagement did not induce the membrane localization of $\text{PKC}\delta$ and failed to induce the phosphorylation of $\text{PKC}\delta$ on Thr⁵⁰⁵ (data not shown), which has been shown to correlate with $\text{PKC}\delta$ activation [73], strongly suggests that the effect of rottlerin on NFAT binding resulted from the specific inhibition of $\text{PKC}\theta$. The data obtained with T lymphocytes from the $\text{PKC}\theta$ -deficient mice indicate that $\text{PKC}\theta$ is necessary for the generation of IP_3 and for the sustained Ca^{2+} mobilization needed to maintain NFAT in the nucleus in response to TcR engagement [24]. Although in murine T cells it is possible that $\text{PKC}\theta$ is an upstream regulator of PLC γ , in human cells however, PLC γ is required for $\text{PKC}\theta$ activation in response to TcR/CD28 engagement [74]. In the CD43 signaling pathway, $\text{PKC}\theta$ is most likely located downstream of PLC γ , since preventing PLC γ activity with the inhibitor U73122 blocked $\text{PKC}\theta$ activation (data not shown).

Therefore, we propose that activation of PLC γ by CD43 promotes on one hand, the rise in Ca²⁺ concentration induced by IP₃ and on the other hand the activation of PKC θ by DAG. PKC θ may in turn lead to further rise in Ca²⁺ levels by opening membrane Ca²⁺ channels [75] in order to reach the critical Ca²⁺ concentration required for NFAT activation.

PKC $\theta^{-/-}$ T lymphocytes show defects in CD69 expression and proliferation as a result of impaired TcR-induced IL-2 production [23]. In Jurkat cells, recent experimental evidence indicates that PKC θ is important for the TcR/CD28-dependent NFAT activation and CD69 expression [2,30,76]. We had previously reported that ligation of the CD43 molecule induced CD69 expression [13]. Here we provide evidence that CD69 up-regulation in response to CD43 engagement is dependent on PKC θ activity in Jurkat cells and partially dependent in human peripheral T lymphocytes. Activation of PKC θ and the subsequent recruitment of NF- κ B and NFAT resulting of CD43 engagement is probably not exclusive of the CD69 or IL-2 genes [13] but constitutes rather a general mechanism through which CD43 signaling modulates gene expression during immune response. Consistent with this, the CD43-dependent co-stimulatory signals were found to enhance the TcR-induced HIV transcription and virus production through a mechanism involving the participation of NF- κ B and NFAT [8].

The fact that almost all PKC isoforms are expressed in T cells suggests overlapping functions for these kinases. However, the results from the PKC θ -deficient mice show that this isoform plays an important role in the TcR/CD28-mediated activation. Data we report here indicate that following CD43 engagement on human T lymphocytes, PKC θ promotes activation of the AP-1, NF- κ B, and NFAT transcription factors, regulating specific biological responses such as IL-2 production and CD69 expression. Although the precise role of the additional PKC isoforms recruited in response to CD43 ligation (α/β , ϵ , ζ , and μ) remains to be investigated, it is tempting to think that they may be involved in distinct CD43-induced biological functions such as T cell adhesion, polarization, and migration.

Acknowledgments

We thank Drs. A. Altman and O. Dieng for expression vectors and Drs. L. Perez-Martinez, J.L. Montiel, and I. Aguilar-Delfin for their helpful comments on the manuscript, and L. Mérida for excellent technical assistance. This work was supported by Grant IN209400 from the Dirección General de Apoyo al Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, and Grant G35943-M from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). R. del

Rio was the recipient of a fellowship from CONACyT, México (Contract # 87841).

References

- [1] L.B. Silverman, R.C. Wong, E. Remold-O'Donnell, D. Vercelli, J. Sancho, C. Terhorst, F. Rosen, R. Geha, T. Chatila, Mechanism of mononuclear cell activation by an anti-CD43 (sialophorin) agonistic antibody, *J. Immunol.* 142 (1989) 4194–4200.
- [2] N. Coudronniere, M. Villalba, N. Englund, A. Altman, NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 3394–3399.
- [3] R.A. Rebres, J.M. Green, M.I. Reinhold, M. Tichioni, E.J. Brown, Membrane raft association of CD47 is necessary for actin polymerization and protein kinase C theta translocation in its synergistic activation of T cells, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 7672–7680.
- [4] Y. Rosenstein, A. Santana, G. Pedraza-Alva, CD43, a molecule with multiple functions, *Immunol. Res.* 20 (1999) 89–99.
- [5] J.K. Park, Y.J. Rosenstein, E. Remold-O'Donnell, B.E. Bierer, F.S. Rosen, S.J. Burakoff, Enhancement of T-cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott-Aldrich syndrome, *Nature* 350 (1991) 706–709.
- [6] Y. Rosenstein, J.K. Park, W.C. Hahn, F.S. Rosen, B.E. Bierer, S.J. Burakoff, CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1, *Nature* 354 (1991) 233–235.
- [7] A.I. Sperling, J.M. Green, R.L. Mosley, P.L. Smith, R.J. DiPaolo, J.R. Klein, J.A. Bluestone, C.B. Thompson, CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28, *J. Exp. Med.* 182 (1995) 139–146.
- [8] C. Barat, M.J. Tremblay, Engagement of CD43 enhances human immunodeficiency virus type 1 transcriptional activity and virus production that is induced upon TCR/CD3 stimulation, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 28714–28724.
- [9] G. Pedraza-Alva, L.B. Merida, S.J. Burakoff, Y. Rosenstein, CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 27564–27568.
- [10] M. Alvarado, C. Klassen, J. Cerny, V. Horejsi, R.E. Schmidt, MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation, *Eur. J. Immunol.* 25 (1995) 1051–1055.
- [11] M.E. Cruz-Munoz, E. Salas-Vidal, N. Salaiza-Suazo, I. Becker, G. Pedraza-Alva, Y. Rosenstein, The CD43 coreceptor molecule recruits the zeta-chain as part of its signaling pathway, *J. Immunol.* 171 (2003) 1901–1908.
- [12] G. Pedraza-Alva, L.B. Merida, S.J. Burakoff, Y. Rosenstein, T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14218–14224.
- [13] M.A. Santana, G. Pedraza-Alva, N. Olivares-Zavaleta, V. Madrid-Marina, V. Horejsi, S.J. Burakoff, Y. Rosenstein, CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NFkappa B transcription factors in human T lymphocytes, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 31460–31468.
- [14] Y. Nishizuka, S. Nakamura, Lipid mediators and protein kinase C for intracellular signalling, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22 (Suppl) (1995) S202–S203.
- [15] F.J. Johannes, J. Prestle, S. Dieterich, P. Oberhagemann, G. Link, K. Pfizenmaier, Characterization of activators and inhibitors of protein kinase C mu, *Eur. J. Biochem.* 227 (1995) 303–307.
- [16] A.C. Newton, Protein kinase C. Seeing two domains, *Curr. Biol.* 5 (1995) 973–976.

- [17] S. Jaken, Protein kinase C isozymes and substrates, *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 (1996) 168–173.
- [18] G. Baier, D. Telford, L. Giampa, K.M. Coggeshall, G. Baier-Bitterlich, N. Isakov, A. Altman, Molecular cloning and characterization of PKC theta, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 4997–5004.
- [19] H. Mischak, J. Goodnight, D.W. Henderson, S. Osada, S. Ohno, J.F. Mushinski, Unique expression pattern of protein kinase C-theta: high mRNA levels in normal mouse testes and in T-lymphocytic cells and neoplasms, *FEBS Lett.* 326 (1993) 51–55.
- [20] C.R. Monks, H. Kupfer, I. Tamir, A. Barlow, A. Kupfer, Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation, *Nature* 385 (1997) 83–86.
- [21] C.R. Monks, B.A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, A. Kupfer, Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells, *Nature* 395 (1998) 82–86.
- [22] K. Bi, Y. Tanaka, N. Coudronniere, K. Sugie, S. Hong, M.J. van Stipdonk, A. Altman, Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 556–563.
- [23] Z. Sun, C.W. Arendt, W. Ellmeier, E.M. Schaeffer, M.J. Sunshine, L. Gandhi, J. Annes, D. Petrzilka, A. Kupfer, P.L. Schwartzberg, D.R. Littman, PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes, *Nature* 404 (2000) 402–407.
- [24] C. Pfeifhofer, K. Kofler, T. Gruber, N.G. Tabrizi, C. Lutz, K. Maly, M. Leitges, G. Baier, Protein kinase C theta affects Ca²⁺ mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells, *J. Exp. Med.* 197 (2003) 1525–1535.
- [25] G. Baier-Bitterlich, F. Uberall, B. Bauer, F. Fresser, H. Wachter, H. Grunicke, G. Utermann, A. Altman, G. Baier, Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 1842–1850.
- [26] O. Dienz, S.P. Hehner, W. Droge, M.L. Schmitz, Synergistic activation of NF-kappa B by functional cooperation between vav and PKCtheta in T lymphocytes, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 24547–24551.
- [27] N. Ghaffari-Tabrizi, B. Bauer, A. Villunger, G. Baier-Bitterlich, A. Altman, G. Utermann, F. Uberall, G. Baier, Protein kinase Ctheta, a selective upstream regulator of JNK/SAPK and IL-2 promoter activation in Jurkat T cells, *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 132–142.
- [28] A. Avraham, S. Jung, Y. Samuels, R. Seger, Y. Ben-Neriah, Costimulation-dependent activation of a JNK-kinase in T lymphocytes, *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 2320–2330.
- [29] G. Werlen, E. Jacinto, Y. Xia, M. Karin, Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes, *EMBO J.* 17 (1998) 3101–3111.
- [30] M. Villalba, N. Coudronniere, M. Deckert, E. Teixeira, P. Mas, A. Altman, A novel functional interaction between Vav and PKCtheta is required for TCR-induced T cell activation, *Immunity* 12 (2000) 151–160.
- [31] E. Remold-O'Donnell, A.E. Davis III, D. Kenney, K.R. Bhaskar, F.S. Rosen, Purification and chemical composition of gpL115, the human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 7526–7530.
- [32] N. Meller, Y.C. Liu, T.L. Collins, N. Bonnefoy-Berard, G. Baier, N. Isakov, A. Altman, Direct interaction between protein kinase C theta (PKC theta) and 14-3-3 tau in T cells: 14-3-3 overexpression results in inhibition of PKC theta translocation and function, *Mol. Cell. Biol.* 16 (1996) 5782–5791.
- [33] E. Schreiber, P. Matthias, M.M. Muller, W. Schaffner, Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts,' prepared from a small number of cells, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 6419.
- [34] A. Tugores, M.A. Alonso, F. Sanchez-Madrid, M.O. de Landazuri, Human T cell activation through the activation-inducer molecule/CD69 enhances the activity of transcription factor AP-1, *J. Immunol.* 148 (1992) 2300–2306.
- [35] J.W. Rooney, M.R. Hodge, P.G. McCaffrey, A. Rao, L.H. Glimcher, A common factor regulates both Th1- and Th2-specific cytokine gene expression, *EMBO J.* 13 (1994) 625–633.
- [36] P. Angel, M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R.J. Imbra, H.J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich, M. Karin, Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor, *Cell* 49 (1987) 729–739.
- [37] I. Millet, R.J. Phillips, R.S. Sherwin, S. Ghosh, R.E. Voll, R.A. Flavell, A. Vignery, M. Rincon, Inhibition of NF-kappaB activity and enhancement of apoptosis by the neuropeptide calcitonin gene-related peptide, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 15114–15121.
- [38] G. Pedraza-Alva, S. Sawasdikosol, Y.C. Liu, L.B. Merida, M.E. Cruz-Munoz, F. Ocegueda-Yanez, S.J. Burakoff, Y. Rosenstein, Regulation of Cbl molecular interactions by the co-receptor molecule CD43 in human T cells, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 729–737.
- [39] Y. Nishizuka, Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C, *Science* 258 (1992) 607–614.
- [40] M. Szamel, K. Resch, T-cell antigen receptor-induced signal-transduction pathways—activation and function of protein kinases C in T lymphocytes, *Eur. J. Biochem.* 228 (1995) 1–15.
- [41] A.S. Kraft, W.B. Anderson, Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with plasma membrane, *Nature* 301 (1983) 621–623.
- [42] J. Zhang, L. Wang, J. Schwartz, R.W. Bond, W.R. Bishop, Phosphorylation of Thr642 is an early event in the processing of newly synthesized protein kinase C beta 1 and is essential for its activation, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 19578–19584.
- [43] E.M. Dutil, L.M. Keranen, A.A. DePaoli-Roach, A.C. Newton, In vivo regulation of protein kinase C by trans-phosphorylation followed by autophosphorylation, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 29359–29362.
- [44] C. Borner, U. Eppenberger, R. Wyss, D. Fabbro, Continuous synthesis of two protein-kinase-C-related proteins after down-regulation by phorbol esters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 2110–2114.
- [45] K. Akimoto, K. Mizuno, S. Osada, S. Hirai, S. Tanuma, K. Suzuki, S. Ohno, A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC lambda, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 12677–12683.
- [46] M. Leitges, C. Schmedt, R. Guinamard, J. Davoust, S. Schaal, S. Stabel, A. Tarakhovsky, Immunodeficiency in protein kinase Cbeta-deficient mice, *Science* 273 (1996) 788–791.
- [47] M. Szamel, A. Appel, R. Schwinzer, K. Resch, Different protein kinase C isoenzymes regulate IL-2 receptor expression or IL-2 synthesis in human lymphocytes stimulated via the TCR, *J. Immunol.* 160 (1998) 2207–2214.
- [48] T.T. Su, B. Guo, Y. Kawakami, K. Sommer, K. Chae, L.A. Humphries, R.M. Kato, S. Kang, L. Patrone, R. Wall, M. Teitell, M. Leitges, T. Kawakami, D.J. Rawlings, PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling, *Nat. Immunol.* 3 (2002) 780–786.
- [49] G. Martiny-Baron, M.G. Kazanietz, H. Mischak, P.M. Blumberg, G. Kochs, H. Hug, D. Marme, C. Schachtele, Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 9194–9197.
- [50] M. Gschwendt, H.J. Muller, K. Kielbassa, R. Zang, W. Kittstein, G. Rincke, F. Marks, Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199 (1994) 93–98.
- [51] M. Villalba, S. Kasibhatla, L. Genestier, A. Mahboubi, D.R. Green, A. Altman, Protein kinase Ctheta cooperates with calci-

- neurin to induce Fas ligand expression during activation-induced T cell death, *J. Immunol.* 163 (1999) 5813–5819.
- [52] A. Mondino, C.D. Whaley, D.R. DeSilva, W. Li, M.K. Jenkins, D.L. Mueller, Defective transcription of the IL-2 gene is associated with impaired expression of c-Fos, FosB, and JunB in anergic T helper 1 cells, *J. Immunol.* 157 (1996) 2048–2057.
- [53] H. Gille, M. Kortjenann, O. Thomae, C. Moomaw, C. Slaughter, M.H. Cobb, P.E. Shaw, ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation, *EMBO J.* 14 (1995) 951–962.
- [54] A.J. Whitmarsh, P. Shore, A.D. Sharrocks, R.J. Davis, Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element, *Science* 269 (1995) 403–407.
- [55] R. Janknecht, T. Hunter, Convergence of MAP kinase pathways on the ternary complex factor Sap-1a, *EMBO J.* 16 (1997) 1620–1627.
- [56] N.D. Perkins, The Rel/NF- κ B family: friend and foe, *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 434–440.
- [57] Q. Li, I.M. Verma, NF- κ B regulation in the immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2002) 725–734.
- [58] M. Lopez-Cabrera, E. Munoz, M.V. Blazquez, M.A. Ursa, A.G. Santis, F. Sanchez-Madrid, Transcriptional regulation of the gene encoding the human C-type lectin leukocyte receptor AIM/CD69 and functional characterization of its tumor necrosis factor- α -responsive elements, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 21545–21551.
- [59] M.C. Castellanos, C. Munoz, M.C. Montoya, E. Lara-Pezzi, M. Lopez-Cabrera, M.O. de Landazuri, Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1, *J. Immunol.* 159 (1997) 5463–5473.
- [60] R.C. Wong, E. Remold-O'Donnell, D. Vercelli, J. Sancho, C. Terhorst, F. Rosen, R. Geha, T. Chatila, Signal transduction via leukocyte antigen CD43 (sialophorin). Feedback regulation by protein kinase C, *J. Immunol.* 144 (1990) 1455–1460.
- [61] E. Layseca-Espinosa, G. Pedraza-Alva, J.L. Montiel, R. del Rio, N.A. Fierro, R. Gonzalez-Amaro, Y. Rosenstein, T cell aggregation induced through CD43: intracellular signals and inhibition by the immunomodulatory drug leflunomide, *J. Leukoc. Biol.* 74 (2003) 1083–1093.
- [62] J. Yuan, D. Bae, D. Cantrell, A.E. Nel, E. Rozengurt, Protein kinase D is a downstream target of protein kinase C θ , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291 (2002) 444–452.
- [63] H. Nakanishi, K.A. Brewer, J.H. Exton, Activation of the zeta isoform of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 13–16.
- [64] B. Cipriani, H. Knowles, L. Chen, L. Battistini, C.F. Brosnan, Involvement of classical and novel protein kinase C isoforms in the response of human V γ 9V δ 2 T cells to phosphate antigens, *J. Immunol.* 169 (2002) 5761–5770.
- [65] M. Babina, S. Weber, K. Mammeri, B.M. Henz, Signal transduction via CD43 (leukosialin, sialophorin) and associated biological effects in human mast cell line (HMC-1), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243 (1998) 163–169.
- [66] S. Corinti, E. Fanales-Belasio, C. Albanesi, A. Cavani, P. Angelisova, G. Girolomoni, Cross-linking of membrane CD43 mediates dendritic cell maturation, *J. Immunol.* 162 (1999) 6331–6336.
- [67] J.W. Soh, E.H. Lee, R. Prywes, I.B. Weinstein, Novel roles of specific isoforms of protein kinase C in activation of the c-fos serum response element, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 1313–1324.
- [68] M. Karin, Y. Ben-Neriah, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity, *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000) 621–663.
- [69] F.S. Lee, R.T. Peters, L.C. Dang, T. Maniatis, MEKK1 activates both I κ B kinase alpha and I κ B kinase beta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 9319–9324.
- [70] H. Nakano, M. Shindo, S. Sakon, S. Nishinaka, M. Mihara, H. Yagita, K. Okumura, Differential regulation of I κ B kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF- κ B-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 3537–3542.
- [71] E.M. Genot, P.J. Parker, D.A. Cantrell, Analysis of the role of protein kinase C- α , - ϵ , and - ζ in T cell activation, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 9833–9839.
- [72] M. Leitges, L. Sanz, P. Martin, A. Duran, U. Braun, J.F. Garcia, F. Camacho, M.T. Diaz-Meco, P.D. Rennert, J. Moscat, Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF- κ B pathway, *Mol. Cell* 8 (2001) 771–780.
- [73] L.M. Keranen, E.M. Dutil, A.C. Newton, Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations, *Curr. Biol.* 5 (1995) 1394–1403.
- [74] O. Dienz, A. Moller, A. Strecker, N. Stephan, P.H. Kramer, W. Droge, M.L. Schmitz, Src homology 2 domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa and phospholipase C gamma 1 are required for NF- κ B activation and lipid raft recruitment of protein kinase C θ induced by T cell costimulation, *J. Immunol.* 170 (2003) 365–372.
- [75] M. Savignac, A. Badou, M. Moreau, C. Leclerc, J.C. Guery, P. Paulet, P. Druet, J. Ragab-Thomas, L. Pelletier, Protein kinase C-mediated calcium entry dependent upon dihydropyridine sensitive channels: a T cell receptor-coupled signaling pathway involved in IL-4 synthesis, *FASEB J.* 15 (2001) 1577–1579.
- [76] M. Villalba, J. Hernandez, M. Deckert, Y. Tanaka, A. Altman, Vav modulation of the Ras/MEK/ERK signaling pathway plays a role in NFAT activation and CD69 up-regulation, *Eur. J. Immunol.* 30 (2000) 1587–1596.

5.2. - Resultados no publicados.

CD43 promueve su relocalización en la membrana plasmática al inducir la fosforilación de ERM por PKC θ .

RESUMEN

El movimiento de proteínas a lo largo de la superficie celular es un evento de suma importancia para la formación de la sinápsis inmunológica, para la migración celular y para los fenómenos de adhesión celular, entre otros. Esta relocalización de proteínas es mediada por componentes del citoesqueleto. Recientemente ha llamado la atención la familia de proteínas ERM las cuales conectan a receptores de membrana con el citoesqueleto. En célula T, el co-receptor CD43 se encuentra asociado al citoesqueleto a través de su unión con ERM y, bajo activación antigénica, CD43 se relocaliza hacia el "complejo distal polar" y en células migrantes en el urópodo. Esta redistribución de CD43 depende de su región citoplásmica y de su asociación con moesina. En este trabajo proponemos que la activación de PKC θ , en respuesta al entrecruzamiento de CD43, es necesaria para la fosforilación de ERM y para la relocalización de CD43 a un punto particular de la membrana.

INTRODUCCION

La polarización de las células T hacia las células presentadoras de antígenos (APC) es un evento rápido que ocurre a los 5 min después del contacto antigénico. Esta interacción célula T-APC induce el movimiento de moléculas receptoras, moléculas intracelulares de señalización y de moléculas del citoesqueleto hacia el sitio de contacto [1]. A este sitio particular de encuentro molecular se le ha denominado Sinápsis Inmunológica (SI) o

Complejo Supramolecular de Activación (SMAC) [2]. Hacia la región central de la SI se localiza el receptor para antígenos (TCR), el cual a su vez se encuentra rodeado por las moléculas CD2 y por la integrina LFA-1. Debajo de la membrana celular se localizan talina (componente del citoesqueleto) y PKC θ [2, 3]. El uso de inhibidores químicos ha demostrado la participación fundamental del citoesqueleto de actina en la formación y el establecimiento de la SI. El tratamiento de células T con inhibidores del citoesqueleto impide la redistribución del ligando de LFA-1, ICAM-1, a la zona de contacto [1] así también como el transporte del complejo péptido-MHC a la SI [3]. Diversas moléculas que migran a la SI se asocian directamente con el citoesqueleto, o bien con moléculas adaptadoras que indirectamente las unen con éste [4]. Por último, la interacción del TCR con el péptido antigénico induce la redistribución de talina y la polimerización de actina [5, 6]. La formación de esta estructura en la zona de contacto antigénico se cree que favorece y facilita las señales promovidas por el TCR.

Un modelo inicial para la formación de la SI proponía que la distribución diferencial de moléculas receptoras al sitio de contacto antigénico era estrictamente dependiente de su tamaño y de su carga [7]. De aquí que, moléculas pequeñas como CD2 y LFA-1 podrían reforzar las señales generadas por el TCR (el caso de CD2) o bien incrementar la interacción entre célula T y la APC (el caso de LFA-1). Este modelo implicaba la exclusión de la SI de moléculas largas como CD43, reforzando así el papel regulador negativo de esta mucina sobre las señales generadas por el TCR [8, 9].

El co-receptor CD43 es una proteína transmembranal altamente glicosilada presente en la superficie de la mayoría de las células hematopoyéticas. Su dominio extracelular tiene una estructura elongada que

extiende aproximadamente 45 nm hacia el exterior celular, catalogandola como una de las moléculas más largas de superficie en las células T [10]. Además, este dominio tiene una gran cantidad de azúcares y ácido siálico unidos. Debido a su largo tamaño y a su gran abundancia ($\sim 1 \times 10^5$ moléculas/célula), se ha calculado que CD43 ocupa el 28% de la superficie de una célula T.

La región citoplásmica de CD43 está constituida por 123 aa, presenta varios residuos de serina y treonina potencialmente fosforilables [11, 12] y esta región es altamente conservada entre las distintas especies. S. Yonemura y cols. [13] demostraron que 3 aa básicos (KRR, 276-278 aa) en la región citoplásmica de CD43 localizados muy cerca a la membrana celular son responsables de la unión de CD43 con la familia de proteínas ERM. Dos grupos de investigación independientes [14, 15] demostraron que en conjugados de células T-APC, CD43 colocaliza con las proteínas ERM (especialmente con ezrina y moesina) formando un nuevo complejo que se le conoce como "complejo distal polar" (DPC). El DPC es un complejo funcional, ya que la inhibición de su formación (usando formas dominantes negativas de ERM) trae consigo alteraciones en las señales de activación de las células T resultando en un decremento en la activación del factor transcripcional NFAT y una disminución específica en las cantidades de IL-2 e INF γ secretadas, ya que las cantidades de TNF α e IL-5 excretadas son normales [14-16]. Estos datos sugieren que la relocalización de CD43 *per se* es importante para las señales de los linfocitos T.

Además de la importancia de la polarización de CD43 hacia el DPC promovida por la interacción célula T-APC, existen otros procesos celulares en los cuales CD43 localiza en puntos específicos de la membrana celular

("caps") como son el urópodo de células en migración (en células T y neutrófilos) y en los fenómenos de adhesión homotípica, ambos procesos involucran el rearrreglo de componentes del citoesqueleto [17, 18]. Un evento relacionado a esto es el fenotipo que exhiben los ratones deficientes en CD43, en donde se observan importantes defectos en la extravasación de linfocitos T hacia tejidos inmunocomprometidos [19], lo que sugiere que la redistribución de CD43 es importante para el proceso de migración y, por lo tanto, para el establecimiento de una respuesta inmune adecuada. Por otra parte, el trabajo de S. Seveau y cols. [20] demuestra que el entrecruzamiento de CD43 a través de anticuerpos induce la polarización de neutrófilos y la migración celular, así como la relocalización de CD43 hacia el urópodo. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual se relocaliza CD43 hacia regiones específicas de la membrana está solo parcialmente dilucidado.

Las proteínas ezrina, moesina y radixina constituyen la familia de proteínas ERM. Estas proteínas están implicadas en la unión de receptores de la membrana con el citoesqueleto de actina y tienen un papel fundamental en la formación de estructuras membranales. Estas tres moléculas tienen un alto grado de identidad en su secuencia de aminoácidos (75%) y estudios con modelos murinos deficientes en algún miembro de la familia de ERM sugieren que estas proteínas tienen papeles redundantes [21].

Las proteínas ERM se localizan en el citoplasma celular. En su estructura se identifican 3 dominios, el dominio amino-terminal (dominio FERM) que permite la unión con proteínas de la membrana, un dominio alfa-hélice y el dominio de unión a actina (dominio carboxilo-terminal). La fosforilación regula la actividad de las proteínas ERM. En las formas no fosforiladas, el dominio FERM interactúa con su propio dominio COOH-

terminal, impidiendo la unión con proteínas de la membrana así como con actina. La fosforilación en la treonina T558 próxima al dominio COOH-terminal y/o la unión a lípidos de la membrana (fosfatidilinositol) inducen cambios estructurales en la molécula que le permite unirse a proteínas de la membrana así como a los filamentos de actina [21]. Hasta el momento no se conoce(n) la(s) cinasa(s) responsable(s) de esta fosforilación *in vivo*; sin embargo, tanto la cinasa-Rho (ROCK) como la isoforma nueva PKC θ , pueden fosforilar *in vitro* a moesina [22, 23].

Aunque se sabe que la redistribución de CD43 al DPC y al urópodo en células T en migración son mecanismos que dependen de ERM, se desconocen los mecanismos moleculares por los cuales ocurre la relocalización de CD43.

Los resultados de este trabajo sugieren que la redistribución de CD43 hacia un punto focal de la membrana depende de la activación de PKC θ , al promover la fosforilación de ERM y, por ende, su interacción con el citoesqueleto.

MATERIALES Y METODOS

Anticuerpos y reactivos. L10, es un AcMo IgG1 que reconoce a la molécula CD43 [24] y fue obtenido al purificar ascitis en una columna de proteína A-sefarosa. Los Acs que se utilizaron para entrecruzar y activar a través de CD43 o TCR se obtuvieron del suero de conejos inmunizados con suero de ratón y posteriormente se purificó la fracción de Ig's (IgG) por columnas de afinidad (R α MIg). El Ac L10-FITC se adquirió de Molecular Probes. El Ac anti-PKC θ fué obtenido de Transduction Laboratories (Lexington, KE), los anticuerpos anti-ERM fosforilada (anti-ERM-p) y anti-Moesina se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). La proteína A-sefarosa se

adquirió de Zymed Laboratories Inc (San Francisco, CA). El inhibidor Rottlerina fué obtenido de CALBIOCHEM (San Diego, CA) y los demás reactivos empleados se adquirieron de Sigma (St. Louis MO).

Cultivos celulares. Las células Jurkat (J22) se cultivaron en RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT) suplementado con 5% de suero fetal bovino (Hyclone) y 5% de suero bovino de recién nacido (Hyclone), 2 mM de L-glutamina, 50 μ g/ml de penicilina, 50 μ g/ml de estreptomina y 50 μ M de β -mercaptoetanol. Dos horas antes de los ensayos de activación, las células se lavaron con PBS (154 mM de NaCl, 8.1 mM de Na_2HPO_4 y 1.9 mM de NaH_2PO_4 , pH de solución 7.4) y se resuspendieron en RPMI no suplementado.

Aislamiento y purificación de linfocitos T de sangre humana. Las células T humanas fueron purificadas de concentrados leucocitarios provenientes de sangre de donadores voluntarios, adultos y sanos. El aislamiento de linfocitos T se hizo mediante centrifugación diferencial utilizando Ficoll-Hypaque que permitió la obtención de células mononucleares. Posteriormente, este concentrado de células mononucleares se lavó 2 veces con PBS y se resuspendió en RPMI suplementado. Las células adherentes (principalmente macrófagos-monocitos) se removieron al colocar la suspensión celular en cajas de petri de plástico durante 4 h a 37°C en una atmósfera que contenía 5% de CO_2 . Las células no adherentes (principalmente linfocitos T y B) se colectaron y se hicieron pasar por una columna de nylon pre-equilibrada con RPMI suplementado, se incubaron durante 1 h a 37°C en una atmósfera que contenía 5% de CO_2 . Por último, la columna se eluyó con RPMI suplementado

(37°C). Las células purificadas obtenidas fueron predominantemente células T (OKT3⁺ [>85%] y L10⁺ [>95%]).

Activación celular. Las células Jurkat o las células T humanas (1×10^7) se incubaron en 0.5 ml de RPMI con el AcMo L10 (4 µg/ml) durante 5 minutos a T amb. Para entrecruzar y activar a través de CD43, las células se incubaron con R α MIg (4 µg/ml) a 37°C por los tiempos indicados en el texto. Como control positivo, las células se activaron con TPA (100 ng/ml). En algunas ocasiones (en el texto se indica) se le adicionó al cultivo DMSO o rottlerina (6 µM), 15 min antes de la activación.

Inmunoprecipitación. Las células se lisaron en 100 µl de buffer de lisis (25 mM de HEPES [pH 7.5], 150 mM de NaCl, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de EDTA, 0.5% de Tritón X-100, 0.5 mM de ditioneitol, 20 mM de β-glicerofosfato, 1 mM de Na₃VO₄, 5 mM de NaF, 4 mM de fenilmetilsulfonilfluoruro, 1 µg/ml de leupeptina y 1 µg/ml de aprotinina) durante 20 min a 4°C. Los lisados celulares se centrifugaron a 13,000 x g durante 15 min a 4°C, y a los sobrenadantes se pre-clarificaron al incubarlos durante 2 h a 4°C con proteína A-sefarosa. Los lisados celulares pre-clarificados provenientes de células T activadas o no activadas (equivalente a 2×10^7 células) se inmunoprecipitaron con el Ac apropiado (1 µg/ml) durante 2 h a 4°C. Los complejos inmunes formados se recuperaron al incubarlos con proteína A/G-sefarosa ON a 4°C.

Inmunoblot. Las proteínas obtenidas de los extractos celulares totales o de los inmunoprecipitados se separaron en geles de SDS-PAGE y se

transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad). Las membranas se bloquearon con TBS-T/5% de leche (10 mM de Tris [pH 7.5], 150 mM de NaCl, 0.1 % de Tween 20) durante 2 h a T amb, seguido por la incubación con el Ac primario diluído en TBS-T/5% de leche o TBS-T/3% de BSA. Después de 3 lavados con TBS-T, las membranas se incubaron con el Ac secundario-HRP y las proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Ensayo de cinasa in-vitro para CD43. Como se detalla en párrafos anteriores los inmunoprecipitados se obtuvieron a partir de lisados provenientes de células estimuladas o de células control. Estos inmunoprecipitados se lavaron dos veces con TNE (50 mM de Tris-HCl [pH 7.5], 140 mM de NaCl, 5 mM de EDTA) y dos veces con TNE-T (TNE con 1% de Triton X100). Los inmunoprecipitados obtenidos fueron incubados en 50 μ l de buffer de cinasa (20 mM de Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM de NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 5mM de $MnCl_2$, 20 mM de β -glicerofosfato, 2 mM de Na_3VO_4) que contenía 10 μ Ci de ^{32}P - γ ATP y 10 μ M de ATP. La reacción se paró centrifugando las muestras e inmediatamente el sobrenadante se mezcló con un volumen igual de buffer de cargado para SDS-PAGE (2X). Las perlas de proteína A-sefarosa se mezclaron con 20 μ l de buffer de cargado para SDS-PAGE (2X). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE, CD43 y sus proteínas asociadas se visualizaron por autorradiografía. La cantidad de proteína inmunoprecipitada se determinó por inmunoblot.

Agregación homotípica. Las células T (1×10^6 células/500 μ l RPMI-2% SFB) fueron incubadas en placas de 48 pozos en presencia o ausencia de DMSO o de rottlerina (6 μ M) durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se adicionó L10/ R α MIg o solamente R α MIg y las placas fueron incubadas nuevamente a 37°C durante 30 minutos. Finalmente las células se fijaron adicionándoles 2% de p-formaldehído y los agregados se visualizaron por microscopía.

Inmunotinción y Microscopía Confocal. Células Jurkat (1×10^6) o linfocitos T humanos (1×10^6) fueron preincubados o no con DMSO ó rottlerina (6 μ M) durante 15 min a 37°C/5 % de CO₂. Posteriormente se incubaron con esferas de látex recubiertas con AcMo CD43 (L10), o bien con R α MIg ó poli-L-lisina, en una relación 1:2, durante 30 min/37°C/5 % de CO₂. Posteriormente las células se lavaron en la solución de FACS (PBS/2% FCS/0.02% NaN₃) y se centrifugó durante 5 min a 1100 rpm. Subsecuentemente, las células se fijaron en una solución de p-formaldehído (PFD) al 4% a T amb durante 10 min. Al término de la fijación, los conjugados se lavaron siguiendo las condiciones previamente descritas y se incubaron durante 1 h a 4°C con solución de FACS en presencia de saponina al 0.05% y un Ac anti-CD43 (Santa Cruz Biotechnology), el cual reconoce la región intracelular de CD43. Al término de tiempo, las células se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa-fluor 488 (Molecular Probes) en presencia de saponina. Finalmente las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con PFD al 4% durante 10 min a T amb. Los conjugados obtenidos se montaron sobre laminillas de vidrio en medio de montaje (PBS 50%:Glicerol 50%). Las muestras se analizaron utilizando un microscopio confocal MRC-600 equipado con un láser de kriptón/argón (Bio-Rad) acoplado a un microscopio

Axioscopio (Zeiss, Germany) con objetivo PlanNeufluar 40X (apertura 0.75) ó un objetivo PlanAchromático 63X W Korr (apertura 1.2).

RESULTADOS

CD43 induce la fosforilación de ERM por un mecanismo dependiente de la activación de PKC θ . Aunque se sabe que el movimiento de CD43 hacia puntos discretos de la membrana (como en el DPC, urópodo y en el sitio de contacto célula-célula en la agregación homotípica) depende de su asociación con el citoesqueleto a través de su unión con moesina, una de las proteínas de la familia ERM [14, 15, 20], el mecanismo molecular que regula este proceso se desconoce. La activación de ERM (moesina) depende de la fosforilación en la treonina 558 (T558) que está conservada entre los miembros de esta familia, y ésto le confiere la capacidad de unirse tanto a las proteínas de membrana como al citoesqueleto [21]. Por lo tanto, determinamos si las moléculas de ERM asociadas a CD43, después de su entrecruzamiento, se encuentran fosforiladas. Para esto, se realizaron ensayos *in vitro* de cinasa de los inmunoprecipitados de CD43 provenientes de células estimuladas a través de CD43 por diferentes períodos de tiempo. De acuerdo con los resultados descritos previamente [12], CD43 se encuentra fosforilada en células en reposo; sin embargo, el entrecruzamiento de CD43 aumenta sus niveles de fosforilación (Fig. 1A, asterisco). La estimulación a través de CD43 también induce su asociación con distintas proteínas fosforiladas. La fosforilación de estas proteínas es dependiente de CD43 ya que no se encuentran en los inmunoprecipitados de CD43 provenientes de células tratadas con R α MIg. Entre las proteínas fosforiladas asociadas a CD43, se encuentra una proteína de peso molecular aproximado de 72-75 kDa que

podría ser algún miembro de la familia de ERM (Fig. 1a, flecha) y esta fosforilación se mantiene hasta los 60 min post-estímulo.

Como mencionamos anteriormente, las proteínas de la familia de ERM son fosforilada en la T558 para su activación, de aquí que determinamos si las proteínas de 72-75 kDa asociadas a CD43 se encontraba fosforilada en Ser/Thr. Para ésto, las mismas membranas fueron incubadas durante 2 hr/55 °C con una solución 1.0 M de KOH. Este tratamiento remueve grupos fosfatos de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina [25]. La figura 1B muestra que los niveles de fosforilación de las proteínas de 72-75 kDa asociadas a CD43, no se modificaron con el tratamiento de KOH, lo que sugiere que las proteínas de 72-75 kDa están fosforiladas en residuos de serina/treonina. Estos datos nos sugieren que el entrecruzamiento de CD43 induce la asociación con proteínas de 72-75 kDa fosforiladas en serinas/treoninas.

Para demostrar que las señales generadas a través de CD43 inducen la fosforilación de ERM en la treonina 558, se utilizó un anticuerpo que reconoce a ERM fosforiladas en la T558, y se determinaron los niveles de éstas por medio de inmunoblots. El entrecruzamiento de CD43 indujo un aumento en los niveles de ERM fosforilada (Fig. 2), claramente detectables a los 5 min, cuando se comparan con los niveles de ERM fosforilada de las células tratadas únicamente con R α MIg. Los niveles máximos de ERM fosforilada se detectaron a los 15 min y se mantuvieron por arriba de los niveles basales hasta los 60 minutos de estimulación. En conjunto, estos datos indican que la activación de linfocitos T a través del entrecruzamiento de CD43 induce la asociación de ERM con la región citoplásmica de CD43 y la fosforilación en la T558 de ERM.

Dado que PKC θ es capaz de fosforilar a moesina *in vitro* [23], y dado que la activación de linfocitos T a través de CD43 promueve la actividad catalítica de PKC θ [26] determinamos si se requiere a PKC θ para la fosforilación de ERM (posiblemente moesina) en respuesta al entrecruzamiento de CD43. La fosforilación de ERM inducida por CD43 se previno cuando las células se trataron con el inhibidor de PKC θ , rottlerina (Fig. 2). Esto no se debió a problemas de cargado del gel ya que se detectaron cantidades equivalentes de proteínas en todas las condiciones, como lo revela el blot anti-moesina (Fig. 2). Estos datos nos sugieren que CD43 induce la fosforilación de ERM (posiblemente moesina) en la treonina 558 por una vía que involucra a PKC θ .

La compartimentalización en la membrana de CD43 requiere de la actividad de cinasa intacta de PKC θ . ERM se asocia a la región citoplásmica de CD43 a través de tres aminoácidos básicos situados cerca de la membrana celular [13]. Esta asociación de CD43 con ERM (principalmente moesina) le permite a la primera conectarse con el citoesqueleto de actina y su reclutamiento en puntos específicos de la membrana celular [21]. Tomando en cuenta estos antecedentes y en virtud de que CD43, vía PKC θ , induce la fosforilación de ERM, nos preguntamos si la relocalización de CD43 depende de la actividad de cinasa de PKC θ . Para esto utilizamos un sistema de conjugados de células T-esferas de látex recubiertas con el AcMo L10. Las células T fueron preincuabadas o no con rottlerina, se pusieron en contacto con las esferas de látex y la distribución de CD43 fué evidenciada por microscopía de fluorescencia al utilizar un anticuerpo anti-CD43/Alexa-fluor 488 que reconoce la región citoplásmica. Los datos muestran que CD43 se

relocaliza preferentemente hacia el sitio de contacto con la esfera que ha sido recubierta con el AcMo L10 (Fig. 3B, paneles de la izquierda), por el contrario, cuando las células fueron preincubadas con el inhibidor de PKC θ , rottlerina, la distribución de CD43 es aleatoria en toda la superficie celular (Fig. 3B, paneles de la derecha). La gráfica superior presenta a un linfocito con morfología uropodada, mientras que la gráfica inferior presenta a un linfocito redondo. Esta redistribución de CD43 es específica y no es una consecuencia de su tamaño grande y/o su carga, ya que en los conjugados formados con esferas recubiertas con R α MIg, CD43 permanece distribuida homogéneamente en la superficie celular (Fig. 3A, panel izquierdo y derecho). De los conjugados formados entre las células T-esferas de látex recubiertas con anti-CD43, el 92% mostró una redistribución de CD43 hacia el sitio de contacto, evento que fué inhibido aproximadamente un 50% con el inhibidor de PKC θ . De los conjugados formados con las esferas de látex recubiertas con R α MIg, sólo el 17% de éstos mostró una redistribución similar (Fig. 3C). Estos datos nos sugieren que la compartimentalización de CD43 es un proceso parcialmente dependiente de la actividad catalítica de PKC θ .

Anteriormente nuestro grupo demostró [18] que en la agregación homotípica dependiente de CD43, esta mucina se localiza en los sitios de contacto célula T-célula T. De acuerdo con estos datos, la estimulación de células T a través de CD43 induce la agregación celular (Fig. 4B). Esta agregación es promovida por CD43 y no por las interacciones casuales entre el anticuerpo anti-CD43 (L10) con receptores Fc, ya que las células incubadas con un anticuerpo control no se agregan (Fig. 4A). La agregación inducida por CD43 se inhibe totalmente al preincubar a las células con rottlerina (Fig. 4C). En conjunto estos resultados sugieren que la distribución de CD43 hacia una

región específica de la membrana y el proceso de adhesión homotípica requieren de la activación de PKC θ .

DISCUSION

La membrana es una estructura altamente dinámica, en parte por el recambio continuo de componentes de la misma (lípidos y/o proteínas) y por otra parte por los cambios continuos en su organización. Estos cambios requieren de la integridad del citoesqueleto, ya que el uso de drogas que inhiben la funcionalidad de algún componente del citoesqueleto bloquean completamente la formación de estructuras "compartimentalizadas" en la membrana [27].

La respuesta inmune es un proceso altamente complejo que involucra tanto la migración de linfocitos T al sitio donde se localiza el antígeno como el reconocimiento específico del antígeno a través de su TCR. En ambos eventos, la redistribución de proteínas en la membrana celular es crucial, ya que durante la migración la célula se polariza y adopta una morfología única: el "leading edge", que es la parte anterior de la célula donde se localizan moléculas como el TCR y receptores para quimiocinas y está dirigido hacia el gradiente del quimioatrayente. En la parte posterior de la célula conocida como "urópodo" [28, 29], se concentran CD43 y proteínas de la familia de ERM [17, 30]. La relocalización de CD43 a puntos específicos de la membrana celular (por ejemplo el urópodo y el DPC) requiere de su asociación con el citoesqueleto de actina a través de su interacción con proteínas de la familia de ERM y especialmente con moesina [30]. La capacidad de ERM (moesina) de unir a receptores de la membrana con los filamentos de actina depende en gran medida de su fosforilación en la treonina 558 (T558) [21, 31]. Nuestros

resultados muestran que la activación de linfocitos T a través del entrecruzamiento de CD43 induce la fosforilación de las moléculas de ERM en la treonina 558 y éstas se encuentran asociadas a CD43 (Figs. 1 y 2). Aunque la cinasa responsable de la fosforilación *in vivo* de ERM se desconoce, se ha demostrado que *in vitro* PKC θ puede inducir la fosforilación del miembro de la familia de ERM, moesina [23]. De acuerdo con ésto, la fosforilación en la T558 de ERM inducida por CD43 requiere de la actividad catalítica de PKC θ dado que su fosforilación se previno parcialmente en presencia del inhibidor selectivo de PKC θ , rottlerina. En conjunto estos resultados sugieren que CD43 induce la fosforilación de ERM en la T558 a través de la activación de PKC θ .

Recientemente nuestro grupo demostró que CD43 se relocaliza hacia los sitios de contacto célula-célula en agregados homotípicos [18] y que este evento depende de un citoesqueleto íntegro de actina. Aquí mostramos que la actividad de PKC θ inducida por CD43 se requiere para la movilización de CD43 en la membrana y para la adhesión homotípica (Figs. 3 y 4).

En resumen, nuestros datos sugieren que durante la adhesión homotípica CD43 induce la fosforilación de la T558 de ERM a través de un mecanismo que depende de PKC θ . Este ERM activa es capaz de unir a CD43 con el citoesqueleto y promover su distribución hacia el sitio de contacto célula-célula.

Es posible que éste mismo mecanismo opere *in vivo* durante la migración celular y en el proceso de extravasación de los linfocitos, ya que durante este último proceso es necesaria la adhesión linfocito T-linfocito T. De acuerdo con ésto, las células leucocitarias de los ratones deficientes en

CD43 tienen alteraciones en el tráfico de éstos hacia el sitio de estimulación antigénica [19, 32].

BIBLIOGRAFIA

- [1] C. Wulfig, and M. M. Davis, A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation, *Science* 282 (1998) 2266-2269.
- [2] C. R. Monks, B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer, Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells, *Nature* 395 (1998) 82-86.
- [3] A. Grakoui, S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin, The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation, *Science* 285 (1999) 221-227.
- [4] M. L. Dustin, M. W. Olszowy, A. D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P. A. van der Merwe, P. M. Allen, and A. S. Shaw, A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts, *Cell* 94 (1998) 667-677.
- [5] A. Kupfer, and S. J. Singer, Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples, *Annu Rev Immunol* 7 (1989) 309-337.
- [6] L. Stowers, D. Yelon, L. J. Berg, and J. Chant, Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 5027-5031.
- [7] A. S. Shaw, and M. L. Dustin, Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation, *Immunity* 6 (1997) 361-369.
- [8] N. Manjunath, M. Correa, M. Ardman, and B. Ardman, Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43, *Nature* 377 (1995) 535-538.
- [9] E. C. Thurman, J. Walker, S. Jayaraman, N. Manjunath, B. Ardman, and J. M. Green, Regulation of in vitro and in vivo T cell activation by CD43, *Int Immunol* 10 (1998) 691-701.
- [10] J. G. Cyster, D. M. Shotton, and A. F. Williams, The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation, *Embo J* 10 (1991) 893-902.
- [11] B. Axelsson, R. Youseffi-Etemad, S. Hammarstrom, and P. Perlmann, Induction of aggregation and enhancement of proliferation and IL-2 secretion in human T cells by antibodies to CD43, *J Immunol* 141 (1988) 2912-2917.

- [12] V. Piller, F. Piller, and M. Fukuda, Phosphorylation of the major leukocyte surface sialoglycoprotein, leukosialin, is increased by phorbol 12-myristate 13-acetate, *J Biol Chem* 264 (1989) 18824-18831.
- [13] S. Yonemura, M. Hirao, Y. Doi, N. Takahashi, T. Kondo, and S. Tsukita, Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2, *J Cell Biol* 140 (1998) 885-895.
- [14] E. J. Allenspach, P. Cullinan, J. Tong, Q. Tang, A. G. Tesciuba, J. L. Cannon, S. M. Takahashi, R. Morgan, J. K. Burkhardt, and A. I. Sperling, ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse, *Immunity* 15 (2001) 739-750.
- [15] J. Delon, K. Kaibuchi, and R. N. Germain, Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin, *Immunity* 15 (2001) 691-701.
- [16] A. Roumier, J. C. Olivo-Marin, M. Arpin, F. Michel, M. Martin, P. Mangeat, O. Acuto, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover, The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation, *Immunity* 15 (2001) 715-728.
- [17] F. Sanchez-Madrid, and M. A. del Pozo, Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions, *Embo J* 18 (1999) 501-511.
- [18] E. Layseca-Espinosa, G. Pedraza-Alva, J. L. Montiel, R. del Rio, N. A. Fierro, R. Gonzalez-Amaro, and Y. Rosenstein, T cell aggregation induced through CD43: intracellular signals and inhibition by the immunomodulatory drug leflunomide, *J Leukoc Biol* 74 (2003) 1083-1093.
- [19] R. C. Woodman, B. Johnston, M. J. Hickey, D. Teoh, P. Reinhardt, B. Y. Poon, and P. Kubes, The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice, *J Exp Med* 188 (1998) 2181-2186.
- [20] S. Seveau, H. Keller, F. R. Maxfield, F. Piller, and L. Halbwachs-Mecarelli, Neutrophil polarity and locomotion are associated with surface redistribution of leukosialin (CD43), an antiadhesive membrane molecule, *Blood* 95 (2000) 2462-2470.
- [21] A. S. Shaw, FERMIing up the synapse, *Immunity* 15 (2001) 683-686.
- [22] N. Oshiro, Y. Fukata, and K. Kaibuchi, Phosphorylation of moesin by rho-associated kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures, *J Biol Chem* 273 (1998) 34663-34666.
- [23] S. F. Pietromonaco, P. C. Simons, A. Altman, and L. Elias, Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence, *J Biol Chem* 273 (1998) 7594-7603.
- [24] E. Remold-O'Donnell, A. E. Davis, 3rd, D. Kenney, K. R. Bhaskar, and F. S. Rosen, Purification and chemical composition of gpL115, the human lymphocyte surface

sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome, *J Biol Chem* 261 (1986) 7526-7530.

[25] J. A. Cooper, and T. Hunter, Changes in protein phosphorylation in Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo cells, *Mol Cell Biol* 1 (1981) 165-178.

[26] R. Del Rio, M. Rincon, E. Layseca-Espinosa, N. A. Fierro, Y. Rosenstein, and G. Pedraza-Alva, PKC θ ; is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement, *Biochem Biophys Res Commun* 325 (2004) 133-143.

[27] O. Acuto, and D. Cantrell, T cell activation and the cytoskeleton, *Annu Rev Immunol* 18 (2000) 165-184.

[28] D. A. Lauffenburger, and A. F. Horwitz, Cell migration: a physically integrated molecular process, *Cell* 84 (1996) 359-369.

[29] M. S. Bretscher, Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells, *Cell* 87 (1996) 601-606.

[30] P. Cullinan, A. I. Sperling, and J. K. Burkhardt, The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse, *Immunol Rev* 189 (2002) 111-122.

[31] M. A. Pearson, D. Reczek, A. Bretscher, and P. A. Karplus, Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain, *Cell* 101 (2000) 259-270.

[32] T. M. Onami, L. E. Harrington, M. A. Williams, M. Galvan, C. P. Larsen, T. C. Pearson, N. Manjunath, L. G. Baum, B. D. Pearce, and R. Ahmed, Dynamic regulation of T cell immunity by CD43, *J Immunol* 168 (2002) 6022-6031.

Figura 1

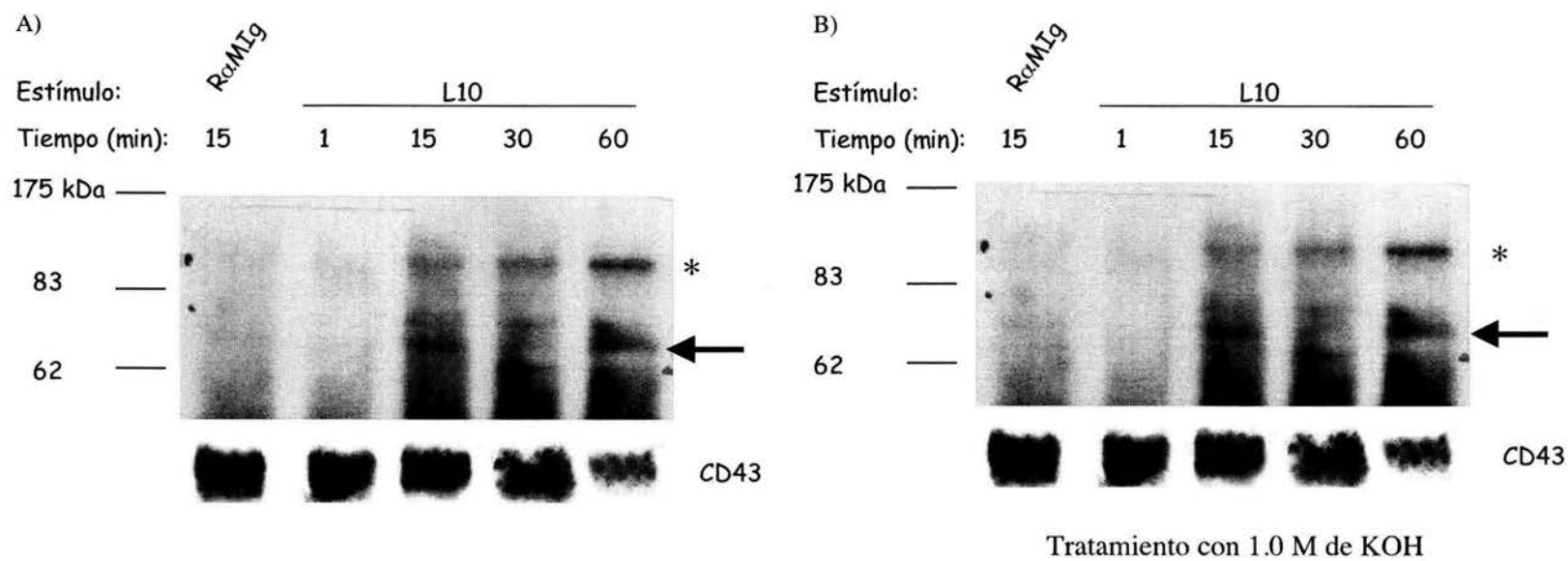


Figura 2

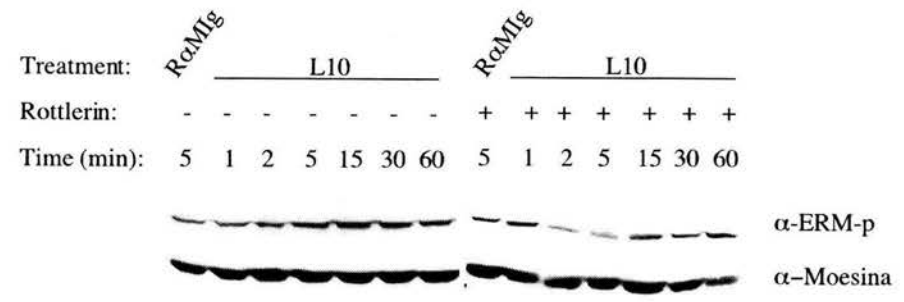
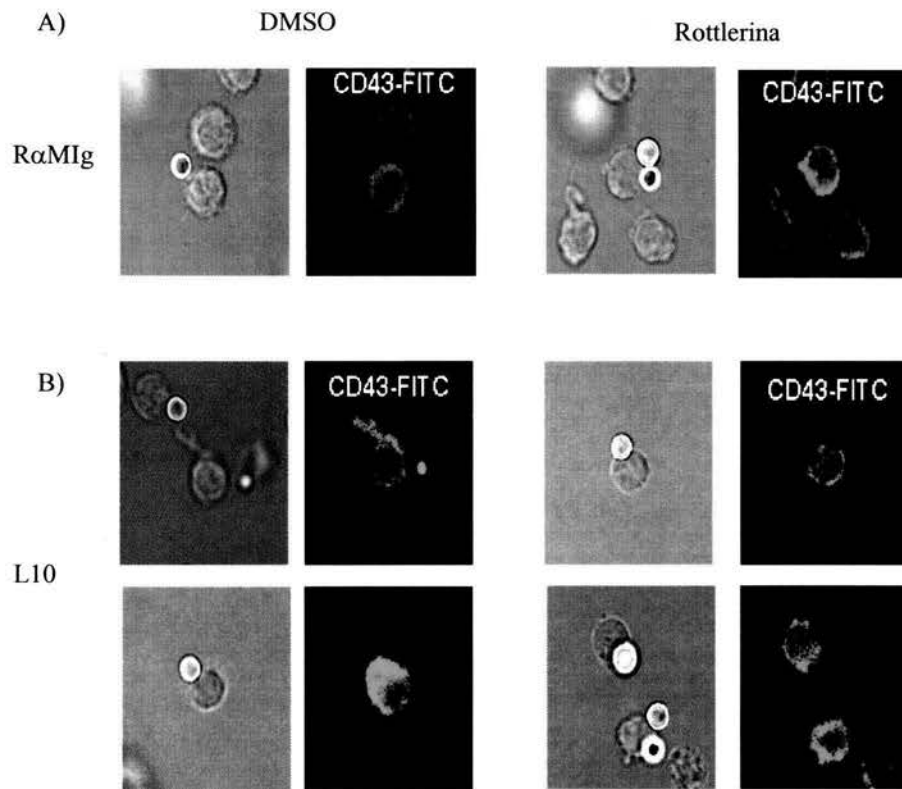


Figura 3

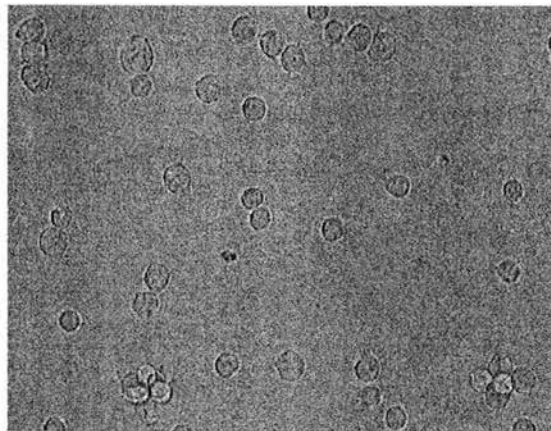


C)

Inhibidor	Esferas recubiertas	% células T con redistribución o no de CD43 hacia el sitio de contacto	
		Si	No
-	L10	92	8
Rottlerina		51	49
-	R α MIg	17	82
Rottlerina		9	91

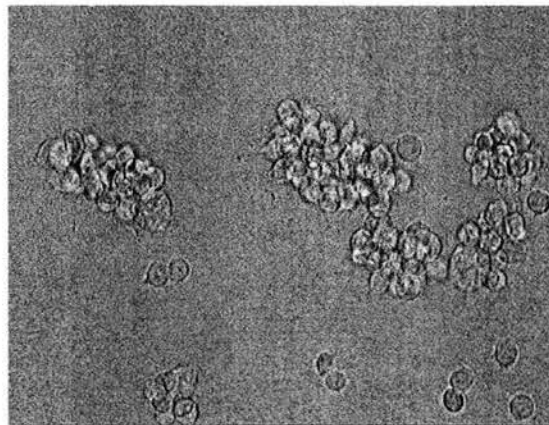
Figura 4

A)



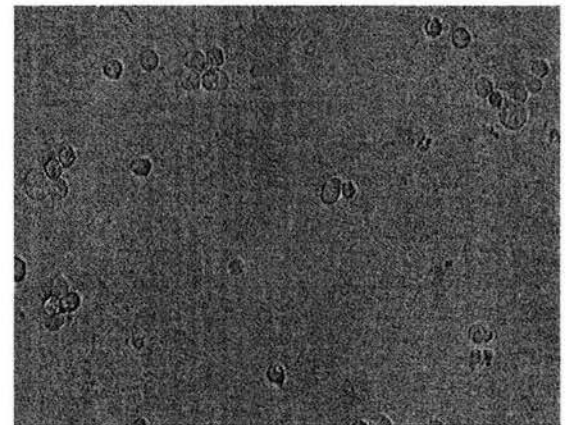
RαMIg

B)



L10

C)



L10 + ROTTLERINA

PIES DE FIGURA

Figura 1.- Actividad de cinasa de serina/treonina asociada a CD43. Las células Jurkat (1×10^7) se estimularon como se describe en "Materiales y Métodos" durante los tiempos indicados con el AcMo L10 (líneas 2-5) o se trataron únicamente con R α MIg (línea 1). CD43 se inmunoprecipitó de los extractos celulares no-preclarificados y se evaluó la actividad *in vitro* de cinasa asociada a CD43 (ver "Materiales y Métodos"). Los inmunoprecipitados de CD43 se separaron por SDS-PAGE y las proteínas fosforiladas se visualizaron por autorradiografía (Fig. 1A, panel superior). Estas mismas membranas fueron tratadas con una solución 1 M de KOH para eliminar los grupos fosfatos presentes en tirosinas, y las proteínas fosforiladas en residuos de serina/treonina se visualizaron al exponer nuevamente las membranas (Fig. 1B, panel superior). Como control de cargado equivalente de proteínas, las mismas membranas fueron blotteadas contra CD43 (paneles inferiores). El asterisco (*) representa a CD43 fosforilada, y la flecha (\leftarrow) a proteínas de 72-75 kDa fosforiladas. Estos resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Figura 2.- CD43 induce la fosforilación de ERM por un mecanismo dependiente de la activación de PKC θ . Células Jurkat (2×10^7) se estimularon durante diferentes períodos de tiempo con el AcMo L10 (carriles 2-7 y 9-14) o se trataron únicamente con R α MIg (carriles 1 y 8) como se describe en "Materiales y Métodos". Quince minutos antes de la activación, las células se incubaron con DMSO (carriles 1-7) o con rottlerina (carriles 8-14). 30 μ g de los lisados totales provenientes de células estimuladas se

separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y las moléculas de ERM fosforilada (T558) se inmunodetectaron con Ac específicos para ERM fosforilada (ERM-p; panel superior). Las mismas membranas se probaron con Ac anti-Moesina (panel inferior), esto para determinar la cantidad de proteína presente en cada condición. Se muestra un experimento típico de dos realizados en forma independiente.

Figura 3.- La compartimentalización en la membrana celular de CD43, depende de una actividad de cinasa intacta de PKC θ . Células Jurkat (1×10^6) fueron pre-incubadas con DMSO (A y B, paneles de la izquierda) o con rottlerina ($6 \mu\text{M}$; A y B, paneles de la derecha) durante 15 min/ $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Posteriormente se realizaron los ensayos con esferas de látex recubiertas con el AcMo L10 (B) o únicamente con $\text{R}\alpha\text{MIg}$ (A), siguiendo el protocolo descrito en "Materiales y Métodos". La distribución de CD43 se evidenció por microscopía confocal al utilizar un Ac Alexa-fluor 488 dirigido en contra de CD43 que reconoce su región citoplásmica. En el panel C se presenta el porcentaje de células con redistribución de CD43 hacia el sitio de contacto con la esfera. En cada toma se muestra el campo claro.

Figura 4.- La adhesión homotípica de células T inducida por CD43 depende de la actividad catalítica de PKC θ . Las células fueron pre-incubadas con DMSO (A y B) o con rottlerina (C) durante 15 minutos. Posteriormente se siguió el protocolo descrito en "Materiales y Métodos" para la formación de agregados celulares homotípicos. Los agregados se visualizaron por microscopía (40X). Se muestra un resultado típico de 3 realizados en forma independiente.

VI. - CONCLUSIONES GENERALES

- ◆ En células T, las señales generadas a través del entrecruzamiento con CD43 llevan a la translocación a la membrana de PKC α/β , ϵ , θ , ζ y μ . Además, inducen la actividad catalítica de PKC α/β y PKC θ .
- ◆ La activación de PKC θ , dependiente de CD43, modula la unión al DNA de los factores transcripcionales AP-1 al regular la expresión de c-Fos, y de NF- κ B al permitir la degradación del inhibidor I κ B- β . Ambos eventos son dependientes de la activación de ERK
- ◆ La activación del factor transcripcional NFAT, inducida por las señales generadas por CD43, es dependiente de la actividad catalítica de PKC θ e independiente de la activación de ERK y cPKC.
- ◆ Las señales generadas a través de CD43 que inducen la activación de PKC θ son necesarias para la expresión de CD69.
- ◆ La activación de PKC θ , inducida por CD43, es importante para la fosforilación en la treonina 558 de ERM y para la relocalización de CD43 hacia sitios particulares de la membrana celular.

VII. - PERSPECTIVAS

- ◆ Determinar si la expresión de CD69, inducida por CD43, depende de los factores transcripcionales NF- κ B y AP-1.
- ◆ Determinar cual es el mecanismo molecular por el que PKC θ promueve la unión de NFAT al DNA.
- ◆ En un sistema célula T-APC, determinar si CD43 establece los primeros contactos con la APC (antes que el TCR) y conocer si CD43 favorece su exclusión por un mecanismo dependiente de PKC θ /moesina.
- ◆ Determinar cuál es la relevancia real de la vía CD43/PKC θ en la activación de células T inducida por APC o en células T de ratones deficientes de CD43 al retarlos con antígenos (micobacterias, virus de inmunodeficiencia humana, etc.).
- ◆ Conocer cuál es la participación de las isoformas de PKC α/β , ϵ , ζ y μ en las funciones de CD43, tanto en células T como en otras células del sistema inmune.