



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

ANALISIS DE LA RESPUESTA DE LINFOCITOS T A LAS
SEÑALES GENERADAS A TRAVES DE DIFERENTES PARES
DE MOLECULAS DE SUPERFICIE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

NORA ALMA FIERRO GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY



CUERNAVACA, MORELOS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	célula presentadora de antígeno
BSC	suero de bovino recién nacido
βGP	β-glicerol fosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen-diamino-tetracético
ERK1/2	cinasa regulada por señales extracelulares- 1 y 2
FACS	citofluorometría de flujo
FSC	suero fetal bovino
HAS	albúmina sérica humana
ICAM 1	molécula de adhesión intercelular-1
GDP	difosfato de guanosina
GTP	trifosfato de guanosina
MAPK	proteína cinasa activada por mitógenos
MAPKK	cinasa de la proteína cinasa activada por mitógenos
MEK1/2	cinasa de la proteína cinasa activada por mitógenos
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
NFAT	factor de transcripción de células T activadas
NFKB	factor nuclear κB
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PTK	proteína cinasa de tirosina
PTP	proteína fosfatasa de tirosina
PI	fosfatidil inositol
PI3K	fosfatidil inositol-3 cinasa
PKC	proteína cinasa C
PLCγ	fosfolipasa C
SH2	dominio tipo 2 con homología a Src
SH3	dominio tipo 3 con homología a Src
SI	sinápsis inmunológica
Src	cinasa de virus de sarcoma
TPA	12-O-tetradecanoylforbol-13-acetato
TCR	receptor para el antígeno de las células

g) Las señales de CD43 y el TCR se regulan mutuamente

IX. FUNCIONES DE CD43 EN LAS DIFERENTES CELULAS DE LA RESPUESTA INMUNE _____ 39

- a) Participación de CD43 en la respuesta inmune innata
- b) Participación de CD43 en la respuesta inmune adquirida

JUSTIFICACIÓN _____ 50

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS _____ 51

CAPITULO II RESULTADOS _____ 53

I. La respuesta de los linfocitos T es modulada por el orden de estimulación a través de CD43 y el TCR (resumen).

II. CD43 regula el umbral de activación de los linfocitos T controlando las funciones de Cbl (resumen).

III. La activación de linfocitos T humanos inducida por el reclutamiento de CD43 requiere de la participación de PKC θ (resumen).

IV. Agregación de linfocitos T inducida por CD43: señales intracelulares e inhibición por leflunomida, un fármaco modulador de la respuesta inmune (resumen).

V. La estimulación previa o simultánea de CD43 a las señales del TCR induce la activación de la integrina β 2 sobre la superficie celular (datos no publicados).

CAPITULO III DISCUSION _____ 63

REFERENCIAS _____ 74

APENDICES _____ 83

ANEXO _____ 85

RESUMEN

CD43 es una molécula accesoria abundante sobre la superficie de todas las células linfoides que protruye 45 nm hacia el espacio extracelular. Sumada a su capacidad de generar señales hacia el interior de la célula, las características estructurales y la abundancia de CD43 en la superficie celular, la convierten en una molécula que pudiera participar en los primeros contactos entre la célula T y la célula presentadora de antígeno, regulando las señales del TCR y participando en la generación de la respuesta inmune.

Los resultados del presente trabajo muestran que, en el caso de los linfocitos T, CD43 genera señales independientes del TCR, participando activamente en procesos de adhesión celular. Por otra parte, destacan la importancia del orden en el que son percibidos los estímulos por los linfocitos T a través de moléculas de la superficie de la célula, representando éste, un mecanismo adicional por medio del cual los linfocitos T definen la respuesta que generarán. En el caso particular del binomio CD43 y TCR, los linfocitos T transducen señales y respuestas diferentes dependiendo del orden de estimulación a través de estas dos moléculas. Los resultados presentados en este trabajo, apoyan la idea de que CD43 participa como co-estimulador de las señales del TCR reduciendo el umbral de activación de las células.

CAPITULO I
INTRODUCCION

INTRODUCCION

I. GENERACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune es el resultado de la reacción de un organismo frente a sustancias extrañas o antígenos. El sistema inmune proporciona un mecanismo de protección en contra de organismos patógenos. La piel, en conjunto con su pH ácido así como las lágrimas y la saliva constituyen el primer obstáculo para detener la entrada de un patógeno. La respuesta inmune innata constituye el segundo nivel de vigilancia y está conformada por macrófagos, células NK, neutrófilos y células cebadas, que de manera coordinada, tienen la capacidad de destruir rápidamente al enemigo y/o de generar señales de alarma que ponen en marcha al tercer nivel de vigilancia del que dispone el sistema inmune, la respuesta inmune adquirida [1] [2]. En esta etapa, se movilizan diversos grupos de células especializadas en combatir la infección de una manera específica y única. Entre las células que participan en este nivel, se encuentran los linfocitos T, B y células dendríticas [3, 4].

Las respuestas inmune innata y adquirida no funcionan de manera aislada. Los anticuerpos producidos por los linfocitos B ayudan a los fagocitos a reconocer a sus blancos, mientras que, una vez que se ha logrado la activación de células en respuesta a un patógeno específico, los linfocitos T producen citocinas que estimulan a los fagocitos para destruir agentes infecciosos con mayor eficiencia. Por su parte, los macrófagos constituyen un elemento de transición entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adquirida, transportando fragmentos de los agentes patógenos de la periferia a los órganos linfoides secundarios, donde serán presentados a los linfocitos en forma de péptidos asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) [5]. Para que esta intrincada comunicación inter-celular se lleve a cabo con éxito, es necesario que los distintos tipos celulares participantes establezcan contactos a través de las moléculas presentes en su superficie. Esta comunicación permite que las células perciban con precisión su entorno, y respondan adecuadamente. Entre las distintas células que participan en la respuesta inmune adquirida, los linfocitos T ocupan un lugar estratégico,

pues de una u otra manera regulan las múltiples facetas de la respuesta inmune. El objetivo principal de este trabajo fue definir la participación de CD43, una molécula accesoria presente en la superficie de los linfocitos T, en la regulación de las funciones de los linfocitos T así como de las señales del receptor para el antígeno.

II. LINFOCITOS T Y DIVERSIDAD DE LAS RESPUESTAS CELULARES

Las principales funciones de los linfocitos T son regular las respuestas inmunitarias frente a antígenos protéicos y ayudar, en su calidad de células efectoras a la eliminación de microorganismos intracelulares. Los linfocitos T se subdividen en poblaciones funcionalmente distintas, siendo las mejor definidas las células T cooperadoras (linfocitos T $CD4^+$) y las células T citotóxicas (linfocitos T $CD8^+$). Al reconocer al antígeno, los linfocitos T cooperadores secretan citocinas, que proporcionan puntos de contacto esenciales entre la inmunidad específica y los mecanismos efectoras de la inmunidad innata, mientras que los linfocitos T citotóxicos matan a las células que despliegan antígenos extraños, como son las células infectadas por virus y otros microorganismos intracelulares así como células tumorales. Además de su función cooperadora y citotóxica, los linfocitos T también pueden inhibir las respuestas inmunitarias, a través de una subpoblación denominada células T supresoras o reguladoras [5]. Algunos de los linfocitos T estimulados por un antígeno no se diferencian hacia células efectoras; en lugar de ello, evolucionan a linfocitos de memoria que son capaces de sobrevivir durante largos periodos de tiempo, aparentemente sin estimulación antigénica. Las células de memoria son funcionalmente inactivas, es decir, no producen moléculas efectoras, a no ser que sean estimuladas por antígenos [4].

a) Producción de citocinas y quimiocinas

El sistema inmunitario no responde de manera homogénea frente a los diferentes microorganismos. La capacidad de las células T para responder a antígenos protéicos derivados de microorganismos, diferenciándose en subpoblaciones de células efectoras que producen distintos grupos de citocinas y quimiocinas y que por lo tanto, provocan

distintas funciones efectoras, constituye la base de esta heterogeneidad funcional. Las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ pueden distinguirse según las citocinas y quimiocinas que secretan y constituyen dos subpoblaciones diferenciables que se denominaron Th1 y Th2 [6]. Ambas subpoblaciones se desarrollan a partir del mismo precursor, que es un linfocito T CD4⁺ cooperador vírgen. La vía de diferenciación está determinada por el tipo de estimulación, especialmente por el tipo de citocinas producidas en el momento del reconocimiento del antígeno. Además, una vez que se desarrolla una subpoblación, produce citocinas que inhiben la diferenciación hacia la otra subpoblación, lo que favorece la polarización de la respuesta inmune. Las células T CD4 que se diferencian en células Th1 secretan principalmente IFN γ e IL-12 y las Th2, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 [7].

Las citocinas son proteínas pequeñas secretadas por diversos tipos celulares y se producen *de novo* en respuesta a un estímulo. Actúan uniéndose a receptores específicos localizados en la membrana a través de los cuales señalizan hacia el interior de la célula empleando segundos mensajeros para alterar el ambiente de la célula al regular la expresión génica. La respuesta a citocinas incluye un aumento o disminución de la expresión de proteínas de membrana (incluyendo receptores de citocinas), proliferación y secreción de moléculas efectoras. Estas proteínas pueden actuar sobre las células que las secretan (acción autócrina), sobre células vecinas (acción parácrina) o sobre células distantes (acción endocrina). Es común que diferentes tipos celulares secreten la misma citocina, así como que una citocina particular actúe sobre diferentes tipos celulares. Al modificar el entorno celular, las citocinas participan de manera importante en la generación de la diversidad de las respuestas frente a diferentes estímulos. Promueven la proliferación y diferenciación de los linfocitos T así como de otras células, entre ellas los linfocitos B, las células dendríticas y los macrófagos. También atraen y activan a los leucocitos inflamatorios, incluyendo macrófagos y granulocitos. Dada la importancia de estas proteínas en la generación de las respuestas celulares, los estímulos reguladores de su producción desempeñarán un papel crucial en el destino de las células [8]. Las tablas 1 y resumen las características de algunas de las citocinas secretadas por los linfocitos T.

Tabla 1. Citocinas producidas por linfocitos T

Citocina	Células T productoras	Efectos en Linfocitos B	Linfocitos T	Macrófagos	Células Hematopoyéticas	Otras células somáticas
Interleucina 1 (IL-1 α)	Macrófagos, células epiteliales		Activación	Activación		-
Interleucina 2 (IL-2)	TH1, CD8 citotóxicos	crecimiento; síntesis de cadenas J	Crecimiento	-	aumento del tamaño celular de NK	-
Interferon γ (IFN- γ)	TH1, CD8 citotóxicos	Diferenciación, síntesis de IgG2a	Inhibe el crecimiento de células TH2	Activación \uparrow MHC-I y II	Activa células NK	Antiviral \uparrow MHC-I y II
TNF- β	TH1, algunos CD8 citotóxicos	Inhibe	Destruye	Activa, induce producción de NO	Activa neutrófilos	Destruye fibroblastos y células tumorales
Interleucina 4 (IL-4)	TH2	Activación, crecimiento, IgG1, IgE \uparrow MHC-II	Crecimiento supervivencia	Inhibe activación	\uparrow crecimiento de células cebadas	-
Interleucina 3 (IL-3)	TH1, TH2, algunos CD8 citotóxicos	-	-	-	Factor de crecimiento para progenitoras de células hematopoyéticas (multi- CSF)	-
Interleucina 7 (IL-7)	Timocitos, queratinocitos	Estimula proliferación linfocitos pre B	Proliferación y maduración		maduración de megacariocitos, proliferación de timocitos	
Interleucina 12 (IL-12)	Linfocitos B, TH1, TH2		TH1- \uparrow INF- γ , TNF TH2- \downarrow IL-4, IL-5 IL-10		estimula mielopoyesis	
Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)	TH1, algunos TH2, algunos CD8 citotóxicos	-	-	Activa, induce producción de NO	-	Activa el endotelio microvascular
Factor estimulador de colonias de Granulocitos y macrófagos (GM-CSF)	TH1, algunos TH2, algunos CD8 citotóxicos	Diferenciación	Inhibe crecimiento	Activación, diferenciación hacia células dendríticas	\uparrow Producción de granulocitos y macrófagos y cel. dendríticas	-
Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)	Linfocitos T CD4	inhibe el factor de crecimiento de IgA	-	Inhibe activación	Activa neutrófilos	Inhibe / estimula crecimiento de células
Interleucina 15 (IL-15)	Expresada por células musculares, de epitelio de riñón, placenta. Estimula la proliferación de células T. Potencia el desarrollo de células T CD8 de memoria. Es capaz de generar células citolíticas. Parece actuar como factor de maduración in vitro, e in vivo como factor de supervivencia para las células NK.					
EGF	Facto de crecimiento epidermal. Producido en cerebro, riñón, estómago. Estimulado por testosterona, inhibido por estrógenos. Modula la síntesis de diversas hormonas. Controla y estimula la proliferación de células epidermales: fibroblastos, glía, riñón, ovario, tiroides. Regula negativamente la expresión del receptor TGF- β .					
IGF-1	Factor de crecimiento-Insulina. Producido mayormente en hígado, riñón, corazón, pulmones, tejidos graso y glandulares, también por fibroblastos y osteoclastos. De manera similar a la insulina, disminuye la glucemia y los niveles de ácidos grasos en suero. Influye en la diferenciación celular de células de granulosa de ovario. Incrementa las actividades de estrógenos y andrógenos.					
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular. Producido por macrófagos, células epiteliales de pulmón, riñón, células de músculo liso de aorta, Funciona como mitógeno de alta especificidad para células del epitelio vascular. Permeabilidad y neovascularización. Quimioattractante para monocitos. Proliferación de vasos sanguíneos.					
Angiogenina	Sintetizada y secretada por fibroblastos. Promueve la adhesión de células endoteliales y fibroblastos. Estimula la proliferación de células endoteliales.					
Oncostatina	Producida por monocitos, y linfocitos T después de activación, macrófagos adherentes. Inhibe el crecimiento de					

	células tumorales, sinergizada por TGF- β y INF- γ . Promueve el crecimiento de fibroblastos, células vasculares. Induce la síntesis de IL-6 en células de Sarcoma de Kaposi. Induce la expresión de G-CSF y GM-CSF en células endoteliales y participa en la regulación de la hematopoyesis.
Trombopoyetina	Estimula e incrementa el tamaño y número de megacariocitos.
PDGF β 8	Factor de crecimiento derivado de plaquetas. Sintetizado principalmente por megacariocitos, también por macrófagos, células endoteliales, fibroblastos, células de glía, astrocitos. Inducido por IL-1, TNF- α , TGF- β y EGF. Inhibe proliferación (TGF- β). Funciona como quimioatractante para fibroblastos, quimotáctico y activador de neutrófilos y monocitos. Potente modulador de células T. Vasoconstrictor.

Tabla 2. Quimiocinas producidas por linfocitos T

Quimiocina	Producida por	Células atraídas	Efectos principales
IL-8	Monocitos, macrófagos, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales	Neutrófilos, Células T vírgenes	Movilización, activación y degranulación de neutrófilos, angiogénesis
GRO- α, β, γ	Monocitos, fibroblastos, endotelio	Neutrófilos, Células T vírgenes, fibroblastos	Activa neutrófilos, resorción de coágulo, angiogénesis
ENA-78	Neutrófilos	Neutrófilos	incrementa los niveles de calcio intracelular, promueve la exocitosis
I-309	Linfocitos T activados	Monocitos	Activación celular, incrementa los niveles de calcio intracelular
SCF	Fibroblastos	células cebadas	induce proliferación de células de médula, síntesis de histamina y leucotrieno
SDF-1	Células de estroma	Células T vírgenes, Células B progenitoras (CD34 ⁺)	Desarrollo de células B, direccionamiento de linfocitos, compete con HIV-1
MIP-1 α	Monocitos, linfocitos T, células cebadas, fibroblastos	Monocitos, NK y linfocitos T (TH1>TH2), basófilos, células dendríticas	compite con HIV-1, defensa antiviral, promueve inmunidad TH1
MDC	Macrófagos, monocitos derivados de células dendríticas	monocitos derivados de células dendríticas, células dendríticas, linfocitos T (TH2>TH1)	incrementa actividad bactericida, estimula la liberación de lisozima
MIG	Macrófagos, neutrófilos	Linfocitos T estimulados	Infiltración de células mononucleares, proliferación
TARC	constitutivamente en timo, Macrófagos	linfocitos T (TH2>TH1), células dendríticas inmaduras, NK	induce migración celular
MCP-1	Monocitos, macrófagos, fibroblastos queratinocitos	Monocitos, NK y linfocitos T, basófilos, células dendríticas	Activa macrófagos, liberación histamina de basófilos, promueve inmunidad TH2
RANTES	Linfocitos T, endotelio, plaquetas	Monocitos, NK y linfocitos T, basófilos, eosinófilos, células dendríticas	Degranulación de basófilos, activa linfocitos T, inflamación crónica

<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>

b) Proliferación y diferenciación

Antes de la estimulación antigénica, los linfocitos T se encuentran en fase de reposo, o fase G₀ del ciclo celular. Se piensa que si los linfocitos T vírgenes no se encuentran con el antígeno, mueren y que la población se mantiene en un nivel estable

como consecuencia del desarrollo de nuevas células a partir de precursores en la médula ósea. La duración de vida de los linfocitos vírgenes no está definitivamente establecida y se tienen evidencias de que puede ser de meses o incluso años en el hombre. Como se mencionó en el párrafo anterior, al reconocer específicamente a su antígeno, los linfocitos secretan IL-2, la cual es capturada por receptores de alta afinidad y cuya expresión depende del reconocimiento específico del antígeno por el TCR. Esta citocina, junto con la IL-15 producida por APCs y células no-linfoides, funciona como un factor de crecimiento autócrino que hace que los linfocitos T entren al ciclo celular. La expansión clonal que resulta de la proliferación de linfocitos T vírgenes genera, a partir de un número reducido de células cuyo TCR es específico para un antígeno (1 en 10^5 ó 10^6 linfocitos), un gran número de células (1 en 10 ó 1 en 100 linfocitos T), suficiente para eliminar el antígeno. Al entrar a la fase G_1 del ciclo celular, se activa la transcripción de genes que se encontraban silenciados en las células vírgenes, resultando en la síntesis de numerosas proteínas, entre las cuales se encuentran las citocinas que promueven el crecimiento y diferenciación de los linfocitos T y de otras células linfoides. La progresión hacia la fase S del ciclo celular continúa y los linfocitos se dividen. A esta secuencia de acontecimientos se le denomina transformación blástica. La división mitótica es la responsable de la proliferación de los linfocitos que responden frente al antígeno. Se ha estimado que los linfocitos empiezan a dividirse 18 horas después de sus primer encuentro con el antígeno, y que a partir de ese momento, la población se duplica cada 6-8 horas [9, 10].

c) Un programa de diferenciación distinto: la anergia

La interacción entre una célula T y una APC puede dar lugar a diversas respuestas que van desde la activación productiva de la célula T, la activación de vías que conducen a la muerte de la célula T hasta la no-respuesta a un segundo reto con el antígeno. Este último proceso ha sido denominado como anergia [11].

La anergia se caracterizó inicialmente *in vitro* en clones de linfocitos T reactivos contra la hemaglutinina del virus de la influenza, estimuladas con dosis subóptimas de péptido antigénico y en ausencia de APCs. Una segunda estimulación de dichas células con dosis

óptimas del antígeno y con APCs no indujo proliferación celular [12]. Además de la proliferación deficiente de las células anérgicas, en los cultivos de estas células se ha encontrado una secreción escasa de IL-2 en respuesta a la estimulación antigénica. La administración de IL-2 exógena a células anérgicas revierte el proceso, induciendo su proliferación [13]. Del mismo modo, la molécula CTLA-4, de la cual hablaremos más adelante, es un co-receptor que regula negativamente las señales de activación de los linfocitos T [14] y cuya expresión es inducida en respuesta a las señales del TCR, participa en la generación de anergia. Otra evidencia que apoya la teoría de que las señales del TCR no son suficientes para inducir proliferación e inducen anergia, es que la interacción del TCR con moléculas de MHC cargadas con péptido antigénico e inmovilizadas en bicapas lipídicas no inducen proliferación celular [15].

Estos resultados apoyaron la idea de que para que se genere una respuesta efectiva, se requiere, además de la interacción específica del TCR con el complejo MHC-péptido, la interacción de moléculas presentes en la superficie de la célula T con sus contra-receptores en la APC. La falta de las señales co-estimuladoras adecuadas, tanto en especie como en intensidad, lleva a las células a producir cantidades insuficientes de IL-2, razón por la cual no proliferan ni se diferencian hacia células efectoras..

III. EL TCR DEFINE LA ESPECIFICIDAD DE LA RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS T

a) Características estructurales del TCR

El TCR es un heterodímero que se extiende 11 nm sobre la superficie celular. Está formado por dos cadenas polipeptídicas transmembranales, llamadas α y β , unidas covalentemente a través de puentes disulfuro. Como las cadenas de las inmunoglobulinas, las cadenas α y β del TCR constan de regiones variables y constantes, producto de un complejo rearreglo de los genes que codifican para cada una de estas regiones [16]. La posibilidad de generar una enorme variabilidad de unidades de reconocimiento confiere a los linfocitos T la capacidad de reconocer un repertorio casi

infinito de antígenos. Las cadenas α y β del TCR poseen un dominio citoplásmico sumamente pequeño que no participa activamente en la generación de señales intracelulares, las cuales se originan a partir del complejo CD3. El conjunto funcional TCR-CD3, es un complejo macromolecular compuesto por una unidad de reconocimiento del antígeno (TCR) y un complejo proteico que permite la interacción del receptor con la maquinaria de señalización intracelular (CD3) [17]. El complejo CD3 consta de las cadenas γ , δ y ϵ , así como de un homodímero unido por puentes disulfuro de una proteína denominada cadena ζ . La fosforilación de estas proteínas en residuos de tirosina generan señales esenciales para el proceso de activación celular. Estos residuos de tirosina se encuentran en secuencias específicas, conocidas como ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) [16] (Fig. 1).

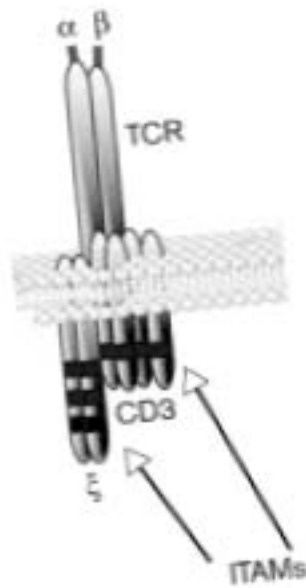


Fig. 1. Estructura del complejo TCR-CD3. Todas las células de una población clonal de células T derivan de una sola célula; son genéticamente idénticas y expresan por lo tanto TCR idénticos. El TCR, es un heterodímero formado por las cadenas polipeptídicas llamadas α y β , que no poseen actividad enzimática intrínseca y requieren de otras moléculas físicamente asociadas que funcionen como transductores de señales. El complejo CD3 cumple estas funciones, y consta de las cadenas γ , δ y ϵ . Además, entre el 89 al 90% de los complejos CD3 contienen a la cadena ζ . Los ITAMs en las colas intracitoplásmicas de CD3 y la cadena ζ , son secuencias conservadas que incluyen sitios de fosforilación en tirosinas [16].

Señales inducidas a través del TCR

Los receptores de unidades múltiples de reconocimiento (MIRRs), que incluyen a los receptores de antígeno de la célula T y B (TCR y BCR, respectivamente) y los receptores Fc (FcRs) así como la mayoría de los receptores para citocinas no tienen actividad de cinasa intrínseca, pero señalizan a través de su asociación con PTKs. Uno de los

primeros eventos que resultan del reconocimiento específico del complejo MHC-antígeno por el TCR, es la activación de las cinasas de tirosinas (PTKs) Lck y Fyn, que a su vez fosforilan residuos de tirosina de los ITAMs presentes en el complejo CD3 y en la cadena ζ [18]. Esto promueve el acoplamiento de moléculas efectoras y adaptadoras que contienen dominios SH2 (dominios protéicos que reconocen residuos de tirosinas fosforiladas) como Syk y ZAP-70 [19]. Zap-70, a su vez, fosforila en residuos de tirosina a la molécula adaptadora Shc. Shc fosforilado interactúa con los dominios SH2 de la molécula adaptadora Grb2, la cual contiene dominios SH3 que se unen a secuencias ricas en prolina de la región amino terminal de SOS, un factor intercambiador de guanina, promoviendo el intercambio de GDP por GTP, induciendo así la formación del complejo Grb2-SOS. Este complejo permite la activación de Ras quien a su vez recluta a la cinasa de serina/treonina Raf (MAPKKK), dando inicio a la activación de la cascada de las MAP cinasas [20].

Las señales generadas por el TCR, activan además a proteínas adaptadoras como LAT y SLP-76 [19]. Estas moléculas constituyen verdaderos andamios y son esenciales para la formación de complejos macromoleculares que permiten el reclutamiento de tres cinasas de tirosinas (Lck, ZAP-70 y Tec) y de sus respectivos sustratos, entre los que se encuentran PLC γ -1 y PLC γ -2. La activación de PLC γ induce el catabolismo de fosfolípidos de membrana, generando IP₃ y DAG. El IP₃ promueve la liberación del Ca⁺⁺ intracelular almacenado en el retículo endoplásmico. La frecuencia, intensidad y duración de los flujos de Ca⁺⁺ constituyen un código, cuya lectura determina la activación de genes específicos, así como la regulación de distintos eventos intracelulares. El DAG proporciona sitios de unión para aquellos miembros de la familia de las PKC que requieren unirse a DAG para activarse [PKC clásicas (α , β y γ) y nuevas (δ , ϵ y θ)] [21] [22].

La velocidad con la que se regula el metabolismo de los lípidos intracelulares parece hacer de este un punto de control para la regulación de la transducción de señales generadas a través de múltiples moléculas, incluyendo al TCR. Enzimas como PI3K y PI4K controlan la disponibilidad de fosfolípidos fosforilados en las posiciones 3 o 4 del anillo de inositol y que a su vez, constituyen puntos de anclaje a la membrana para

moléculas que tienen dominios de homología a plectrina (dominios PH) tales como PLC γ 1, Tec, Vav o PDK1, que conducen a la activación de la cascada de las MAP cinasas y la activación de Akt. Esta última, es una cinasa que se asocia con señales de supervivencia, contraponiéndose con señales que promueven apoptosis [18, 23].

La activación de factores transcripcionales tales como NFAT, NF κ B, Elk, AP-1, T-bet y GATA-3 en respuesta a las señales inducidas por el TCR conduce a la regulación de genes que codifican para múltiples proteínas importantes en la función de la célula T. Por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ , así como marcadores de activación celular como CD25 y CD69 [18].

► **Regulación positiva y negativa de las señales intracelulares: balance entre PTKs y PTPs**

La respuesta concertada y equilibrada de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T genera respuestas inmunes efectivas, protectoras, controladas y que mantienen la autotolerancia. Como en todos los sistemas complejos, es necesario regular la amplitud y duración de una señal. Cada paso de una cascada de señalización está sujeto a una regulación positiva y negativa, de tal modo que la respuesta de un linfocito T resulta del balance entre las señales estimuladoras y las señales inhibitorias.

Múltiples vías de señalización están reguladas por la fosforilación en residuos de tirosinas. Dicha fosforilación puede alterar la actividad enzimática, la localización de las proteínas, y el ensamble de complejos de señalización, que a su vez controlarán eventos cascada abajo. Dos tipos de enzimas controlan la fosforilación de tirosinas: las cinasas de tirosinas (PTKs), que catalizan su fosforilación, y las fosfatasas de tirosinas (PTPs) que defosforila estos residuos. La comprensión de las funciones de estas enzimas y la identificación de sus blancos son elemento clave para el entendimiento de la regulación de las señales intracelulares. En los párrafos anteriores mencionamos algunas de las PTKs que modulan positivamente las señales del TCR. En esta sección, nos enfocaremos a las PTPs [23, 24].

➤ **PTPs con dominios tipo SH2: SHPs**

Las PTPs, constituyen una superfamilia de aproximadamente 90 miembros. Todos tienen por lo menos un dominio catalítico de 240-250 aminoácidos, flanqueado por diversas secuencias reguladoras con capacidad para hidrolizar tirosinas fosforiladas. Como las PTKs, las PTPs pueden ser transmembranales o no transmembranales. Las PTPs con dominios tipo SH2 (SHPs) son una subfamilia de las PTPs no transmembranales.

SHP-1 y SHP-2 están relacionadas estructuralmente y poseen dominios tipo SH2 en su región N-terminal, un dominio central en el que reside su actividad de fosfatasa y un dominio sin funciones descritas a la fecha en su porción C-terminal. La expresión de SHP-1 se restringe a células hematopoyéticas y epiteliales mientras que SHP-2 tiene una expresión ubicua. SHP-1 y SHP-2 participan en la generación de señales intracelulares como resultado de la unión de sus dominios SH2 a tirosinas fosforiladas. SHP-1 ha sido caracterizada como un inhibidor de la transducción de señales, mientras que SHP-2 parece más bien actuar como un regulador positivo en las cascadas de señalización activadas en linfocitos T, aunque, en algunos casos, su efecto puede ser inhibitorio [25].

La actividad de SHP-1 y SHP-2 es regulada por modificaciones conformacionales. La información disponible sugiere que SHP-1 se mantiene en estado inactivo debido a la interacción intramolecular entre sus dominios SH2 y su dominio con actividad de fosfatasa. Apoya esta idea el hecho de que la delección de la región N-terminal de SHP-1 que contiene sus dominios SH2 induzca un aumento en la actividad de fosfatasa de la enzima. Por otra parte, la unión de péptidos fosforilados en tirosinas a los dominios SH2 de SHP-1 provocan un aumento de aproximadamente 10 veces en la actividad catalítica de la enzima. El análisis de la estructura cristalizada de la SHP-2 muestra que, en su estado inactivo, los dominios SH2 de SHP-2 interactúan con el dominio de fosfatasa, interfiriendo con la unión a sus sustratos (Fig. 2) [24] [26, 27].

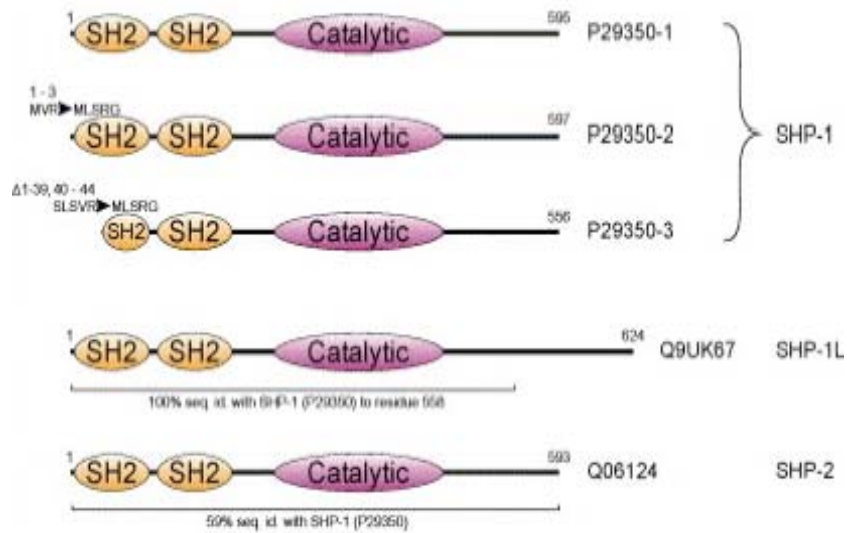


Fig. 2 Dominios tipo SH2 de SHPs. Los dominios tipo SH2 presentes en las PTPs, están codificados en dos genes, PTPN6 (SHP-1) y PYPN11 (SHP-2). Las variantes generadas por *splicing* alternativo del gen que codifica para SHP-1 generan cuatro productos: tres variantes de SHP-1 con modificaciones en la región N-terminal de la proteína y una versión larga de SHP-1 denominada SHP-1L, donde la región N-terminal está conservada pero el extremo C-terminal es más largo. Solo se ha descrito una forma molécula [28].

➤ SHP 1, la PTP negativa por excelencia

La mutación puntual de un sitio de *splicing* alternativo en el gene de SHP-1 condujo a la generación de ratones con defectos en la expresión de esta PTP. Estos ratones mueren a las tres semanas de edad, debido a neumonitis hemorrágicas severas y presentan anomalías en múltiples linajes hematopoyéticos. En estos ratones se presenta una acumulación de células mieloides y monocíticas en varios tejidos, así como un aumento en el patrón de fosforilación de tirosinas y en la secreción de IL-2, en respuesta a la estimulación del TCR. El efecto inhibitorio de SHP-1 sobre las señales del TCR se ha observado también en líneas de células T, como células Jurkat, en las que la sobre-expresión de SHP-1 induce una reducción en las señales generadas por el TCR. La expresión de SHP-1 constitutivamente asociada a la membrana provoca una reducción en la producción de fosfato de inositol y en la activación de NFAT en respuesta a las señales del TCR en células Jurkat [29, 30].

Estos defectos pueden explicarse en parte por el hecho que, en diversos tipos celulares, SHP-1 se asocia con secuencias específicas presentes en las regiones intracitoplásmicas de varios receptores de superficie con actividad inhibitoria. Estas secuencias han sido denominadas ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Esta información condujo a la formulación de un modelo de activación de SHP-1 que propone que, los receptores con ITIMs son fosforilados en tirosinas a través de las cinasas de la familia Src en respuesta al reclutamiento de receptores en la superficie celular. Como resultado, SHP-1 es reclutado a la membrana y activado por modificaciones conformacionales. Una vez activado, SHP-1 defosforila diversos sustratos, inhibiendo la activación celular [28]. Este modelo es válido para la modulación de la actividad de receptores que incluyen los KIR, CD94-NKG2A, Ly49, CD22, CD72, entre otros.

El análisis del patrón de proteínas fosforiladas en tirosinas en células deficientes de SHP-1, así como experimentos de co-inmunoprecipitación, indican que SHP-1 actúa sobre diferentes moléculas de la cascada de señalización del TCR. SHP-1 defosforila a las cinasas de la familia Src, los ITAMs del complejo CD3, la cinasa Syk, moléculas adaptadoras como SLP-76 y efectores como Vav y PI3K, así como a receptores como CD19 [31-34]. Al unirse a Lck a través de su dominio SH2, puede desencadenar la defosforilación de la tirosina 394 [35]. La asociación de SHP-1 a Lck parece estar regulada por la actividad de la MAP cinasa ERK, de manera que estímulos que favorecen una fosforilación temprana de ERK permiten que esta cinasa fosforile a su vez a Lck en la serina 59, lo que se traduce en un retraso en el reclutamiento de SHP-1 hacia el complejo CD3, induciendo una mayor fosforilación de la cadena ζ y una respuesta más vigorosa por de la célula. Reportes recientes muestran que la estimulación de linfocitos T con péptidos agonistas y antagonistas generan un reclutamiento diferencial de SHP-1 hacia el sitio de contacto entre la célula T y la APC [36].

► Cbl, una adaptadora E3 ligasa en la regulación

La degradación de moléculas de señalización constituye un mecanismo de regulación adicional, mediante el cual se modula la iniciación, duración e intensidad de señales a través de moléculas específicas [37].

La familia de proteínas adaptadoras Cbl también funcionan como E3 ligasas de ubiquitina. Esta familia consta de tres miembros: c-Cbl, Cbl-b y Cbl-3 que comparten regiones altamente conservadas en la porción N-terminal, en la que se incluyen un dominio de unión a cinasas de tirosinas (dominio TKB), el cual le otorga a los miembros de esta familia la especificidad por sustratos; un dominio de unión o "linker", que separa los dominios TKB y el dominio tipo RING, en el que está contenida la actividad de E3 ligasa de Cbl. La región C-terminal está menos conservada, sin embargo c-Cbl, Cbl-b y Cbl-3 comparten funciones comunes en esta región que contiene dominios de unión a proteínas con dominios tipo SH2 y SH3 [38] (Fig. 3).

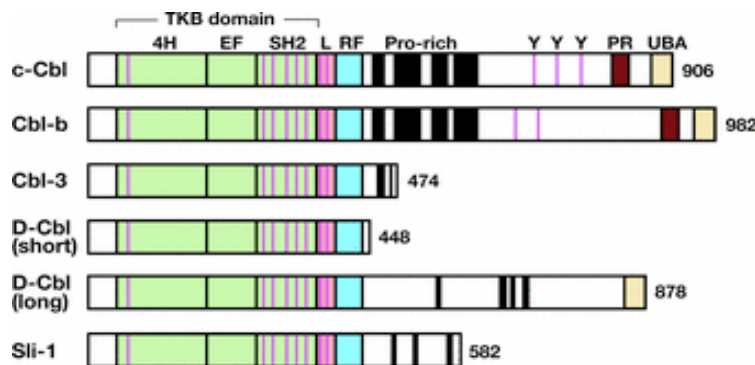


Fig. 3 Dominios de Cbl. La estructura de los miembros de la familia Cbl está muy conservada en sus dominios TKB, de unión (LINKER) y tipo RING. C-Cbl y Cbl-b poseen regiones ricas en prolina (negro) y su porción C-terminal media su interacción con proteínas con dominios SH3. El dominio TKB está formado por 3 regiones de interacción que comprenden 4 hélices (4H), un dominio de unión a calcio (EF) y una variante del dominio SH2 que está conectada al dominio tipo RING por un dominio de unión pequeño. El dominio presente en la región C-terminal de c-Cbl y Cbl-b contiene la secuencia PX(P/A)XXR que une el dominio SH3 de la familia de proteínas CIN85/RUK (un regulador de cinasas)/CD2AP (proteína asociada a CD2). El dominio UBA en el C-terminal de c-Cbl, Cbl-b y D-Cbl (largo) es una región de homología a los dominios UBA (ubiquitin-associated domains). Las tirosinas conservadas se muestran en color púrpura [38].

La presencia de múltiples dominios que permiten su asociación con otras proteínas confiere a los miembros de la familia Cbl la capacidad de funcionar como proteínas adaptadoras. La estimulación a través de receptores de superficie como el TCR, el receptor de las células B, el FcεRI, el receptor de IL-3, CD38, CD28, el receptor de IFNγ, receptores de integrinas, entre otros, conduce a la fosforilación transitoria de tirosinas de Cbl. Dicha fosforilación está mediada por las cinasas Zap-70 y Syk. La fosforilación en tirosinas de Cbl inducida por el TCR media su asociación con Zap-70, Fyn, PI3K y el intercambiador de nucleótidos de guanina, Vav, así como con la molécula adaptadora Crk. A través de su región rica en prolinas, Cbl es capaz de interactuar con el dominio SH3 de las cinasas Fyn y Lck y con las adaptadoras Grb y Nck. Recientemente se ha descrito la asociación de la fosfatasa SHP-1 y Cbl [39]. Cbl también puede ser fosforilado en serinas, en un mecanismo que depende de la actividad de PKC [40]. La fosforilación en serinas de Cbl, favorece su asociación con miembros de la familia 14.3.3, implicados en la activación de la vía de las MAPK.

Sumado a su papel de proteína adaptadora, Cbl funciona como E3 ligasa. Dicha función depende de los dominios TKB y tipo linker. La función de ligasa de ubiquitina de Cbl induce la ubiquitinación y posterior degradación de las proteínas que se le asocian. Esta respuesta depende de la fosforilación de Cbl en residuos de tirosinas, mientras que la fosforilación en serinas anula la función inhibitoria de Cbl [41]. Las señales del complejo TCR-CD3 inducen la fosforilación en tirosinas de Cbl, a través de las cinasas de la familia Src, conduciendo a la asociación y posterior degradación de proteínas como Zap-70, la cadena ζ, PI3k y Crk-L. En paralelo, las señales inducidas por el TCR generan la activación de cinasas de treoninas y serinas como PKC, que fosforilan a Cbl en residuos de serinas, induciendo como se mencionó anteriormente la asociación de Cbl con 14.3.3 y generando un efecto positivo sobre la activación de señales. Como se profundizará más adelante, resultados de nuestro laboratorio muestran que, a diferencia del TCR, CD43 no induce la fosforilación en tirosinas de Cbl pero induce su fosforilación en serinas, lo que en su momento se interpretó como una regulación del efecto negativo de Cbl sobre las señales del TCR[42].

Los ratones c-Cbl^{-/-} y Cbl-b^{-/-} son sanos pero, consistentemente con los datos bioquímicos, estos animales presentan un aumento de las señales generadas a través del TCR y una reducción en el umbral de activación, lo que favorece la activación de cascadas de señalización aún en ausencia de señales co-estimuladoras [43, 44]. Los fenotipos de los ratones c-Cbl^{-/-} y Cbl-b^{-/-} están restringidos a timocitos y linfocitos T, como reflejo de su distribución, ya que c-Cbl se expresa principalmente en el timo y Cbl-b en linfocitos T. Las alteraciones a nivel intracelular de los ratones Cbl-b^{-/-} provoca que sean más susceptibles a enfermedades autoinmunes como artritis y diabetes. En cambio, la sobre-expresión de Cbl en células Jurkat, induce la inhibición de la vía de las MAPK y de la actividad transcripcional de AP-1 [38]. Cbl-3 se expresa principalmente en células epiteliales y en el sistema gastrointestinal y su pérdida no promueve un fenotipo inmune característico [45].

IV. EL TCR Y OTRAS MOLÉCULAS MODULAN LA RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS T: dos modelos para explicar la conversación cruzada entre estas moléculas

La naturaleza de las interacciones entre los linfocitos T y las APCs, así como el estado de activación de las células repercute sobre las respuestas generadas. Los linfocitos T requieren de múltiples señales intracelulares para ser activados de una manera efectiva. La activación antígeno-específica de los linfocitos T es un proceso muy sensible. Si bien los linfocitos T citotóxicos son capaces de matar a una célula blanco que les presenta solo un complejo MHC-péptido antigénico [46] y los linfocitos T cooperadores pueden ser activados en respuesta a < 100 complejos MHC-péptido antigénico [47], se requieren de las moléculas accesorias que establecen contactos independientes del reconocimiento del antígeno con las APCs para que las células lleguen a realizar sus funciones efectoras. Mas aun, en ausencia de señales co-estimuladoras, la estimulación a través del TCR induce un estado de no-respuesta por parte de la célula T, conocido como anergia [11]. Se han propuesto dos modelos para explicar la participación de las señales derivadas de los moléculas accesorias en la regulación de las

señales del TCR, mismos que se comentan a continuación. Interesantemente, ninguno de estos modelos considera que el orden en el que las moléculas accesorias participen pueda ser un elemento más de control de las respuestas celulares.

a) **Modelo de sumatoria de señales**

Las señales generadas por el TCR son de vida corta y en ausencia de un reclutamiento continuo del TCR, las señales se detienen. Por otra parte, se requiere de una señalización prolongada hacia el interior de la célula para activarla. Para integrar estas características aparentemente divergentes de la cinética de activación de los linfocitos T, se propuso el modelo de regulación sumatoria y espacial de las señales. Este modelo propone que los eventos de señalización que resultan del reclutamiento sucesivo de receptores son aditivos. Si la primera señal no decae totalmente en el momento en que se origina una segunda señal, el efecto de la estimulación de los dos receptores se suma. De esta manera, señales cortas, que no son capaces por sí solas de generar respuestas, pueden sumarse y activar a la célula. Este modelo propone además, que la adición de las señales depende de la distribución de los receptores sobre la superficie celular y que la cercanía de moléculas accesorias con el TCR podría influir de manera positiva sobre las señales del TCR, promoviendo la acumulación de intermediarios de señalización, permitiendo la estabilización de los mismos y en consecuencia, facilitando la suma de dichas señales con las del TCR [48].

b) **Dos o múltiples señales**

Por otra parte y debido a que, en ausencia de señales co-estimuladoras, las señales del TCR inducen un estado de no respuesta por parte de la célula T, conocido como anergia [11], se propuso el modelo de las dos señales. En este modelo, se propone que una señal es generada a partir del reconocimiento específico del antígeno por el complejo TCR-CD3 y la otra señal es proporcionada por moléculas co-estimuladoras o co-receptoras [49]. El paradigma de las dos señales ha sido reemplazado en la actualidad por el concepto de la integración de múltiples señales, que considera que la respuesta final es el resultado de las señales generadas por las moléculas de superficie, así como del entorno celular [50]. Se piensa que el linfocito T y la APC se aproximan uno al otro,

estableciendo los primeros contactos de forma independiente del antígeno, a través de moléculas que favorecen la adhesión entre dos células y que la respuesta final depende en gran parte de estas primeras interacciones y de las señales generadas a través de ellas, aunadas a las del TCR.

V. DISTRIBUCIÓN MOLECULAR EN LA SUPERFICIE CELULAR EN RESPUESTA A LAS SEÑALES DEL TCR: LA SINAPSIS INMUNOLOGICA.

El requerimiento de un contacto físico entre linfocitos T y APCs se conoce desde hace años, cuando se describió que el reconocimiento del antígeno por el TCR y las interacciones de las moléculas co-estimuladoras con sus respectivos contra-receptores en la APC originan la remodelación del citoesqueleto de actina y la redistribución del centro de organización de microtúbulos (MTOC) entre el núcleo de la célula y el área de contacto [51]. Sin embargo, no ha sido sino hasta últimas fechas, que el análisis microscópico ha permitido definir la naturaleza dinámica de la organización molecular en esta zona [52, 53]. Estos estudios han mostrado que, dentro del área de contacto intercelular, las proteínas se organizan en diferentes compartimentos, sugiriendo que su distribución es crucial para la modulación de la activación celular. Las interacciones moleculares en la zona de contacto entre las dos células, generan una serie de señales que al traducirse hacia el interior de la célula, modulan sus funciones.

El término sinápsis inmunológica (SI) se utilizó en un principio para describir el contacto que se establece entre linfocitos T y APCs en una interacción antígeno-específica. Actualmente, este término se emplea para describir la superficie de contacto entre células linfoides efectoras y células presentadoras de antígeno. Mediante microscopía de deconvolución, se ha descrito una segregación de proteínas en el sitio de contacto entre linfocitos T $CD4^+$ y linfocitos B cargados con péptidos antigénicos específicos para el TCR de los linfocitos T. Estos estudios muestran que alrededor de los 30 min después de iniciada la interacción entre ambas células, el TCR junto con CD28, CD4 o CD8, se concentran en el centro del sitio de contacto entre las dos células; en una

zona que ha sido denominada complejo central supra-molecular de activación (c-SMAC). Subyacentes a estas moléculas, se encuentran grandes complejos de moléculas de señalización entre las cuales se han identificado PKC θ , Lck, Fyn y ZAP-70. Rodeando a este complejo, se encuentran proteínas como LFA-1, CD2, y, a nivel submembranal, talina; en conjunto estos elementos forman la zona denominada SMAC periférico (p-SMAC). Contrariamente a lo que se pensaba, recientemente se reportó que la zona de mayor actividad en lo que respecta a generación de señales intracelulares es justamente la zona de transición entre el c-SMAC y el p-SMAC, [53-57]. Moléculas como CD43 y CD45 no se han encontrado en el área de contacto, sino que se excluyen y se localizan en lo que se ha denominado el anillo externo del p-SMAC [58, 59] (Fig. 4).

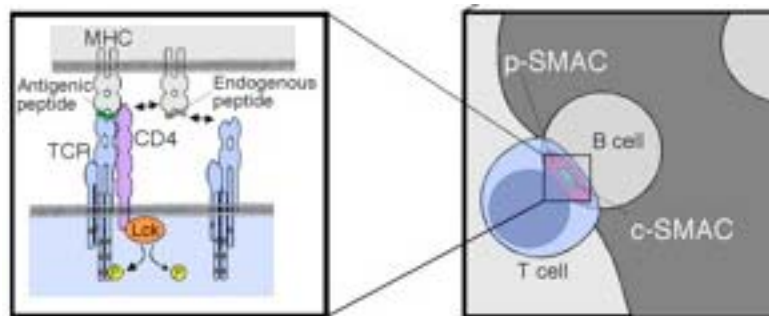


Fig. 4. SI y SMAC. Durante las interacciones entre el linfocito T y la APC, se forman regiones denominadas c-SMAC y p-SMAC en el sitio de contacto entre las dos células (sinápsis inmunológica, SI). Estas regiones se caracterizan por la redistribución de moléculas de superficie y de intermediarios de señalización hacia puntos específicos de la célula [57].

Los mecanismos responsables de la formación del SMAC, solo se conocen parcialmente. La inhibición de la formación de c-SMAC con citocalasina D, un inhibidor de la polimerización de actina, evidenció que el citoesqueleto de actina es importante en este proceso [53]. Esto sugiere que proteínas reguladoras de la polimerización de actina en linfocitos T como la familia de las GTPasas pequeñas Rho (Rac, Ro y Cdc42) participarán en dicha regulación. El hecho de que la dominante negativa de Cdc42 bloquee la polarización de MTOC apoya esta idea [60].

Inicialmente, los modelos de formación de SMAC propusieron que esta conformación macromolecular se requería para iniciar la activación de señales hacia el interior de la célula T [61]. Actualmente se sabe que que las señales mediadas por el TCR se inician antes de la formación del c-SMA y que la formación del SMAC no es indispensable para lograr una activación eficiente de los linfocitos T [46, 62, 63]. Aunque la redistribución de moléculas hacia puntos específicos de la membrana se ha evidenciado en numerosas ocasiones, la importancia funcional de dicho proceso no ha sido del todo esclarecida. Se piensa que la formación de una SI estable favorece un aumento en la concentración de reactantes que permitirá generar rápidamente señales más sostenidas hacia el interior de la célula y así activar a los linfocitos T.

La descripción de una SI estable ha estado restringida a la visualización del TCR en el centro de la zona de contacto entre linfocitos T y APCs, lo que sucede alrededor de los 30 minutos de interacción entre las células. Por otra parte, la descripción de interacciones estables entre los linfocitos T y las APCs no es totalmente dependiente de la participación del TCR como se ha evidenciado en linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T $\gamma\delta$, donde esta conformación parece depender de NKG2D [64, 65]. Se sabe también que existen múltiples contactos inter-celulares independientes del reconocimiento antigénico pero dependientes de las moléculas implicadas en fenómenos de adhesión. De acuerdo a esta información, es posible pensar que las interacciones entre los linfocitos T y las APCs previas al reconocimiento del antígeno facilitan la redistribución molecular y que contribuyen en el pre-ensamblado de complejos de señalización, reduciendo así el umbral de las señales proporcionadas por el TCR.

VI. LAS MOLÉCULAS ACCESORIAS MODULAN LAS SEÑALES DEL TCR

Los linfocitos T expresan en su superficie numerosas moléculas que al unir específicamente a sus ligandos presentes en la superficie de otras células, como las APCs, células blanco o en la matriz extracelular, desempeñan papeles importantes en las respuestas celulares. Como se señaló anteriormente, las proteínas del complejo TCR son

las moléculas clave implicadas en el reconocimiento específico del antígeno. Sin embargo, se ha demostrado que al tratar poblaciones puras de células T CD4⁺ con ligandos agonistas del TCR, en ausencia de células accesorias, las células T no proliferan. En cambio, al adicionar células como monocitos, esas mismas células responden a los anticuerpos anti-CD3 proliferando vigorosamente. Esto sugiere que para lograr una activación celular eficiente, son necesarias las señales proporcionadas por otras moléculas además de las del TCR. En conjunto, estas moléculas reciben el nombre de moléculas accesorias. Por lo general, son moléculas no-polimórficas que, cuando reconocen a su (s) ligandos, transducen señales bioquímicas hacia el interior de la célula T, regulando la adhesión de las células T así como las distintas respuestas celulares. Cuando estas moléculas están modificando específicamente las señales del TCR, se habla de moléculas co-estimuladoras. Las señales bioquímicas de las moléculas co-estimuladoras proporcionan al linfocito T la llamada “segunda señal”, siendo la primera aquella generada por el complejo CD3, cuando el TCR reconoce específicamente al antígeno.

El uso de anticuerpos que reconocen proteínas presentes en la superficie celular ha permitido identificar y caracterizar numerosas moléculas como accesorias o co-estimuladoras de las señales del TCR, por su capacidad de incrementar la proliferación de los linfocitos T y la producción de citocinas. Las moléculas accesorias pueden agruparse en familias, las cuales describiremos brevemente a continuación (tabla 2) [50, 66]

Tabla. 3. Algunas de las moléculas accesorias presentes en la superficie de los linfocitos T.

<i>Nombre</i>	<i>Sinónimos</i>	<i>Familia</i>	<i>ligando</i>	<i>Adhesión</i>	<i>Transducción de señales</i>
CD2	T11, LFA-2, Leu-5,	Ig	LFA-3	+	+
CD5	T1, Leu-1			-	+
CD11a CD18	LFA-1	Integrina β 2	ICAM-1, I-2, -3	+	+
CD28	Tp44	CD28	B7-1, B7-2	-	+
CD43	Sialoforina, leucosiliana	Mucinas	MHC-I, ICAM-I, galectina-1, HSA, siglec, selectina.	+	+
CD44	PgP-1	Proteínas de unión al cartílago	Colágeno, fibronectina, hialuronidato	+	+
CD45	T200, antígeno leucocitario común	PTPs	Galectina-3	-	+
CD49 CD29	VLA-,5,6	Integrina β 1	Matriz extracelular, VCAM-1	+	+
CD95L	FasL	TNFR	CD95 (Fas)	-	+
OX40L	CD134	TNFR	OX40	-	+
CD150	SLAM		SAP	-	+
CD154	CTLA-4	CD28	B7-1, B7-2	-	+
TNFR1, II	-	TNFR	TNF	-	+
ICOS		CD28	ICOSL	-	+
PD-1		CD28	PDL-1, PDL-2	-	+

a) Familia de moléculas accesorias relacionadas estructuralmente al receptor de TNF

El TNF junto con Fas, OX40, CD40 y otras moléculas, son proteínas que, en su forma soluble funcionan como citocinas /o bien, funcionan como proteínas de membrana. Los linfocitos T activados expresan en su superficie el ligando de Fas y el ligando de OX40 y el ligando de CD40. Los miembros de la familia de TNF son reconocidos por receptores membranales con características estructurales similares y que constituyen la familia de las moléculas relacionadas al receptor de TNF (**TNFR**). La familia de receptores relacionados al **TNFR** incluye, entre otros, los receptores de TNF, **TNF-RI** y **TNF-RII** y **4-1BB**, el ligando de Fas (**FasL**) el ligando de OX40 (**OX40L**) y el ligando de CD40 (**CD40L**). Estos receptores son proteínas de membrana tipo I, a diferencia de los miembros de la familia de TNF que son proteínas tipo II [67].

Los miembros de la familia de TNFR tienen en su región intracitoplásmica un dominio de muerte al cual se asocia la molécula adaptadora TRADD (TNF receptor-associated death domain) y median una gran variedad de respuestas, en función de la vía de señalización que se reclute a partir de TRADD. Si se asocian moléculas tipo FADD (Fas associated death domain), se activa la vía de las caspasas al unirse la caspasa 8 a TRADD, y la célula muere por apoptosis. Si en cambio se asocian moléculas como TRAF (TNF-receptor-associated factors) y RIP-1 (receptor interacting protein), se reclutan dos vías de señalización, una de las cuales activa a la MAP cinasa JNK, y resulta en la activación del factor de transcripción AP-1, mientras que la otra vía incide sobre la actividad de la cinasa de I κ B, facilitando el reclutamiento del factor de transcripción NF κ B. El saldo final de esta segunda vía es la activación de respuestas pro-inflamatorias [67-70].

Las interacciones **TNFR1-TNF** y **CD95L-CD95** modulan los procesos de muerte celular a través de una secuencia conservada denominada “motivo de la muerte” (death domain) y cuyas señales conducen a la activación de la cascada de las caspasas, lo que a su vez conduce a las células a la muerte por apoptosis. La mutación de esta región evita que las moléculas de **TNFR1** o **CD95L** induzcan señales pro-apoptóticas y conduce por lo contrario a enfermedades linfoproliferativas asociadas con autoinmunidad. Lo mismo sucede con mutaciones en los genes de TNF y Fas lo que sugiere además que estas moléculas juegan un papel importante para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune [71].

CD40L, se expresa en linfocitos T activados y al interactuar con CD40 en células presentadoras de antígeno, modula la expansión clonal y la diferenciación de los linfocitos. A su vez, las señales de CD40 en las APC inducen la expresión de B7, lo que incrementa la proliferación celular. A diferencia de Fas y de TNFR-I, la región intracelular de CD40L, carece de un dominio de muerte, pero se asocia con un miembro de la familia de TRAF y promueve la diferenciación de los linfocitos T, el diálogo entre linfocitos T y linfocitos B y respuestas pro-inflamatorias. La deficiencia de esta molécula impide que se monte una respuesta inmune adecuada, por falta de señales co-activadoras.

Las señales de **OX40L**, hacen de esta molécula un co-receptor. Las células OX40^{-/-} no tienen grandes defectos en los que se refiere a producción de IL-2, entrada al ciclo celular y expansión. Sin embargo, unos días después de ser activadas, estas células mueren por apoptosis debido a que no logran mantener niveles suficientemente elevados de Bcl-xL y Bcl-2, dos moléculas consideradas como anti-apoptóticas. En general, la interacción **OX40-OX40L** promueve respuestas de tipo Th2, sostiene la proliferación de efectores Th1 y Th2, incrementa la producción de IL-2, y es un regulador crítico de las señales de supervivencia [68, 69]. **4-1BB (CD137)**, es una molécula que se expresa principalmente en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados, y su ligando en células dendríticas maduras y en macrófagos activados [72, 73], lo que sugiere que la interacción de **4-1BB** con sus ligandos desempeña un papel importante en eventos de activación. **4-1BB** es capaz de inducir la producción de IL-2 en ausencia de las señales de **CD28**. Sin embargo, a diferencia de CD28, cuando las señales del TCR son débiles, **4-1BB** no induce de manera eficiente la producción de IL-2. **4-1BB** promueve la producción de IFN γ , sostiene la respuesta de los linfocitos T CD4⁺ e incrementa la respuesta de linfocitos T CD8⁺ *in vivo* [67]. Como CD40, 4-1BB proporciona a las células señales de supervivencia.

b) Moléculas involucradas en adhesión

Las proteínas heterodiméricas leucocitarias de la familia de las integrinas actúan fundamentalmente como moléculas de adhesión, aunque pueden participar también en la transducción de señales. **LFA-1** (antígeno leucocitario asociado a función-1 o CD11aCD18), es un miembro de la familia de las integrinas $\beta 2$, expresado por más de un 90% de los timocitos y linfocitos T maduros, linfocitos B, granulocitos y monocitos. **LFA-1** es esencial para las funciones linfocitarias dependientes de adhesión, incluyendo la estimulación de linfocitos T por el antígeno y la adhesión linfocitaria al endotelio. La deficiencia de la expresión de esta molécula y otros miembros de la misma familia, está asociado a inmunodeficiencias severas tales como LAD-1 (type 1 leukocyte adhesion deficiency), debido a un defecto en la capacidad de establecer contactos con otras células del sistema inmunológico, como con las células epiteliales de las vénulas altas. Los individuos afectados con este tipo de inmunodeficiencias son propensos a infecciones

bacterianas y micóticas desde muy temprana edad. ICAM-1 (CD54) es uno de los ligandos de **LFA-1**, es una proteína de membrana que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, está presente en la mayoría de las células hematopoyéticas, incluyendo linfocitos T y B, células dendríticas y macrófagos, así como numerosas células no hematopoyéticas como fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales. Su expresión es regulada por citocinas. Las formas solubles de ICAM-1 pueden estimular *in vitro* la activación de los linfocitos T mediada por el TCR, lo que sugiere que **LFA-1** puede aportar señales co-estimuladoras [74].

Las moléculas **VLA** o integrinas $\beta 1$ conforman una familia que incluye a VLA-4, -5 y -6. Al igual que LFA-1, debido a un cambio conformacional en la región extracelular, las afinidades de estas moléculas por sus ligandos aumentan tras la estimulación de los linfocitos y sus niveles de expresión son mayores en linfocitos T de memoria que en linfocitos T vírgenes. VLA-4 media la unión de los linfocitos T al endotelio en los focos inflamatorios al interactuar con fibronectina, que se expresa en el endotelio de las mucosas y VCAM-1 expresada en células endoteliales activadas por citocinas. Se ha demostrado que la unión de VLA-4 a VCAM-1 y a proteínas de la matriz extracelular proporciona señales co-estimuladoras para la activación de los linfocitos T [75, 76].

CD2 (LFA-2) es una glicoproteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas, presente en más del 90% de los linfocitos T maduros así como en células NK. **CD2** funciona como una molécula de adhesión intercelular y su principal ligando en humanos es una molécula estructuralmente similar, denominada LFA-3 (CD58) que se expresa en una gran variedad de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas. En ratones, el ligando de **CD2** es CD48. A semejanza de lo que ocurre con las integrinas, la afinidad de **CD2** por su ligando aumenta tras la activación de los linfocitos T [77], así mismo, los niveles de expresión de esta molécula se incrementan en células activadas. Además de su función como molécula pro-adhesiva, se considera que **CD2** es una molécula que transduce señales intracelulares. *In vitro* se ha demostrado su papel co-estimulador de las señales del TCR, aunque *in vivo*, ha sido difícil determinar si **CD2** influye en la

activación de la célula T. En modelos murinos, anticuerpos anti-CD2 como anti-CD48 pueden bloquear las respuestas inmunitarias dependientes de linfocitos T, como el rechazo a injertos, pero los ratones deficientes en **CD2** no presentan defectos en el desarrollo de los linfocitos T o en su función inmunitaria [78].

c) Familia de las molécula co-estimulaacesorias relacionadas a SLAM [79]

En los últimos años se ha generado evidencia de que la familia de receptores de superficie **SLAM** (signaling lymphocytic activation molecule) y su interacción con un grupo de proteínas denominadas SAP (SLAM-associated protein), participan en la regulación de la respuesta inmune. Inicialmente, se consideró a **SLAM** como un miembro de la subfamilia de CD2 presente en células T y B pero en contraste con CD2 que actúa en células no activadas, **SLAM** parece actuar solo en células de memoria aumentando la producción de IFN γ e induciendo proliferación celular. Esta familia incluye a **SLAM (CD150)**, **2B4**, **CD84**, antígeno de linfocitos T, B y NK (**NTBA**) y **Ly9 (CD229)**. Estos receptores se expresan en diversos tipos celulares. La actividad de la familia **SLAM** se ha relacionado con la diferenciación hacia Th2, la generación de memoria de linfocitos B, producción de anticuerpos y activación de células NK. Los linfocitos TCD4⁺ de ratones deficientes en **SLAM**, (**SLAM**^{-/-}) presentan una reducción en la producción de citocinas del tipo Th2 como IL-4 e IL-13, así como de la proliferación en respuesta a la estimulación con el TCR, sugiriendo un papel co-estimulador de **SLAM** sobre las señales del TCR [80].

d) Familia de las moléculas CD28

Los miembros de la familia de **CD28** son proteínas transmembranales que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y cuyos dominios intracelulares tienen diferentes motivos estructurales que favorecen la interacción con diferentes moléculas de señalización. De esta familia, **CD28** e **ICOS** (Inducible Co-Stimulatory molecule) juegan un papel regulador positivo durante la activación antígeno-específica de los linfocitos T, mientras que **CTLA-4** y **PD-1** (Program Cell Death protein-1) regulan negativamente la respuesta de estas células, reclutando a la fosfatasa de tirosinas SHP-1 a través de sus ITIMs. **CD28** se expresa constitutivamente en la mayoría de células del

linaje T y en células plasmáticas. Los timocitos maduros tienen más altos niveles de **CD28** que los timocitos inmaduros y entre las células T periféricas, el 100% de los linfocitos T CD4⁺ y solo alrededor del 50% de los linfocitos T CD8⁺ expresan a **CD28** en su superficie [81]. En cambio, **ICOS** se expresa en respuesta al reconocimiento del antígeno por el TCR, y su inducción depende además, de las señales de **CD28** [82].

Las consecuencias funcionales de la señalización a través de los distintos miembros de la familia de **CD28** difieren para cada molécula: las señales intracelulares de **CD28** promueven la producción de IL-2. En cambio, la estimulación de linfocitos T con anticuerpos anti-**ICOS** induce un aumento en la proliferación mediada por el TCR y en la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, IFN γ , TNF α y GM-CSF pero no de IL-2. Los ligandos de los miembros de esta familia, constituyen a su vez la familia de moléculas B7. **CD28** se une a B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) usando un motivo altamente conservado (MYPPPY) y comparte estos ligandos con **CTLA-4**. **CD28** se une a B7-1 con baja afinidad y se disocia de este rápidamente. En cambio, la unión con B7-2 es más fuerte. Estudios funcionales han mostrado que la unión de **CD28** a sus ligandos es determinante en la función de los linfocitos T y que la unión de **CD28** con B7-1 y B7-2 proporciona señales co-estimuladoras a las del TCR requeridas para la activación de los linfocitos T [83].

El ligando de **ICOS** es ICOS-L y **PD-1** se une a PD-L1 y PD-L2. B7-1 y B7.2 se encuentran esencialmente en células presentadoras de antígeno y su expresión se induce fuertemente en respuesta a diferentes estímulos como citocinas pro-inflamatorias, endotoxinas y como resultado de la interacción CD40 con **CD40L**. La expresión de los otros miembros de esta familia no está restringida a células linfoides, lo que sugiere que estas moléculas participan en la regulación de la activación de los linfocitos T en los tejidos periféricos y eventualmente, en la tolerancia [84, 85].

➤ **Transducción de señales a través de CD28**

El dominio citoplásmico de CD28 interactúa con varias proteínas de señalización. Este dominio consta de 41 amino ácidos. Contiene cuatro tirosinas, dos de las cuales pueden ser fosforiladas. Contiene también, dos secuencias diprolina (PxxP) que pueden unirse al dominio SH3 de intermediarios de señalización como Itk, Tec, Grb2, Grap2 y Lck . Los dominios SH2 de la subunidad p85 de PI3K, Grb2 y Grap2 se unen a la tirosina 319 de la región citoplásmica de CD28. Si embargo, el efecto co-estimulador de las señales del TCR mediado por CD28 no depende de este residuo.

La estimulación de linfocitos T a través de CD28 usando anticuerpos o a través de sus ligandos naturales (B7-1/B7-2) induce la fosforilación en tirosinas de diversos sustratos [86, 87]. El primer evento de señalización que resulta de la estimulación vía CD28 es la fosforilación del dominio YMNM presente en la porción citoplásmica de CD28, para lo cual las cinasas Fyn y Lck han sido implicadas en dicho evento [88]. El resultado de la fosforilación de CD28 es la unión de cinasas como PI3K, ITK y el complejo GRB-SOS [89, 90]. Los eventos distales de señalización incluyen la activación de módulos de cinasas de serinas, la activación de las MAPK [91], ERK1/2, SAPK/JNK y p38/HOG-1, resultando en la fosforilación de c-jun y ERK1/2 [92].

La unión de PI3K a CD28 permite anclar a CD28 la membrana plasmática, donde puede activar a sus sustratos y participar en funciones como mitogénesis y apoptosis. Estas funciones también ha sido atribuidas a CD28 [93]. CD28 induce también la actividad de calcineurina [94].

Los ratones deficientes de **CD28** presentan una respuesta inmune severamente afectada. Sin embargo, los linfocitos T de estos ratones son capaces de responder a una estimulación *in vitro* por aloantígenos y por anticuerpos anti-CD3, así como de recuperarse de infecciones virales [95]. Estudios *in vivo* demuestran que bajo ciertas condiciones de inmunización, el efecto co-estimulador de **CD28** puede ser parcial o totalmente dispensable permitiendo la activación de los linfocitos T en ausencia de **CD28**. El hecho de que solo el 50% de los linfocitos T CD8⁺ expresen CD28 sugiere que

otras moléculas presentes en la superficie de los linfocitos T suplen el efecto co-estimulador de esta molécula. Interesantemente, se ha reportado que **CD43**, otra molécula accesoria de linfocitos T, suple las funciones de **CD28**, puesto que las señales de **CD43** inducen un efecto co-estimulador de las señales del TCR en ratones deficientes en **CD28** induciendo proliferación celular [96].

La información disponible sobre la participación de las moléculas accesorias en la modulación de la respuesta inmune indica que éstas participan en la adhesión intercelular y en la regulación de las señales del TCR, lo que eventualmente incidirá sobre la activación de cascadas de señalización diferentes, dependiendo de las moléculas por las cuales esté siendo activada la célula y finalmente sobre la respuesta de la célula. La expresión constitutiva de un grupo de moléculas co-estimuladoras, en contra parte con la inducción en la expresión de otras, sugiere la participación de las primeras en eventos tempranos de activación celular, mientras que la inducción de las segundas pudiese regular etapas tardías.

Como mencionamos al principio de esta sección, en el modelo de las dos señales, una señal es proporcionada por el reconocimiento específico del antígeno por el TCR, mientras que la segunda señal está dada por las moléculas co-estimuladoras. El paradigma actual propone que la interpretación de ambas señales genera una activación óptima de las células y que la falta, o niveles insuficientes, de señales co-estimuladoras conduce al estado de tolerancia o anergia. En función de lo expuesto con respecto a las funciones de las distintas familias de moléculas accesorias, queda claro que estas moléculas juegan un papel fundamental para la modulación de las distintas respuestas celulares [97] y que la co-estimulación a través de moléculas de superficie no solo representa la segunda señal sino que participa activamente en la diversidad de respuestas celulares.

VII. CD43

a) Características estructurales

CD43 es una glicoproteína abundante (1.5×10^5 moléculas/célula) que se expresa en la superficie de todas las células hematopoyéticas excepto en eritrocitos. Aproximadamente el 50% de la masa de CD43 está constituida por carbohidratos como ácido siálico, N-acetil-galactosamina y galactosa. Posee un dominio extracelular con 235 aminoácidos que incluyen 80 residuos de serinas o treoninas, la mayoría de los cuales están O-glicosilados y que se extiende hasta 45 nm de la superficie celular [98], un dominio transmembranal de 23 aminoácidos y un dominio intracitoplásmico con 123 aminoácidos, entre los que destacan 6 treoninas y 11 serinas potencialmente fosforilables [99] (Fig. 5). La comparación de la secuencia de esta proteína entre rata, ratón y humano indica que la región intracelular de CD43 se ha conservado durante la evolución, sugiriendo que esta proteína desempeña un papel importante dentro de las funciones celulares.

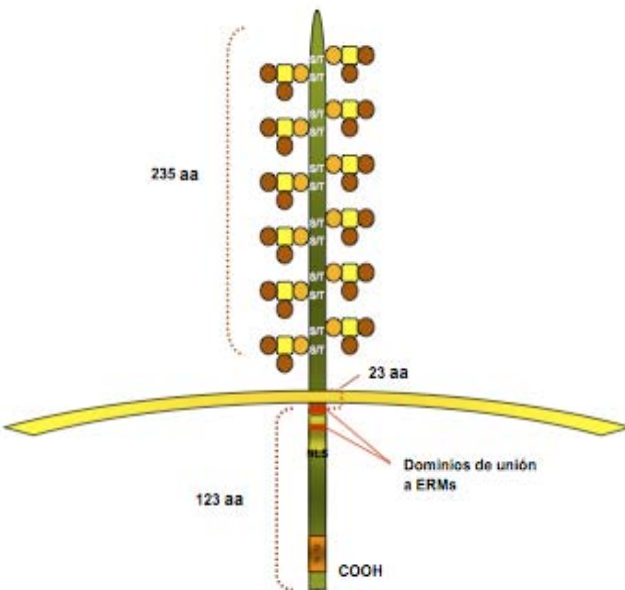


Fig 5. Estructura de CD43. El dominio extracelular de CD43 está formado por 239 aminoácidos con un alto contenido en Ser y Thr y se extiende 45 nm hacia el espacio extracelular. El dominio citoplásmico está altamente conservado entre especies y está constitutivamente fosforilado en residuos de Ser. La secuencia que codifica para CD43 está contenida en un solo exón.

b) Isoformas

Se han reportado dos isoformas de CD43, una con una masa molecular de 115 kDa la cual se expresa esencialmente en linfocitos T CD4⁺ y monocitos y otra con una masa molecular de 130 kDa que se expresa en células T CD4⁺ activadas, CD8⁺ en reposo y activadas, neutrófilos, plaquetas y linfocitos B activados. Ambas isoformas son el resultado de una O-glicosilación diferencial de la molécula, debido a modificaciones postraduccionales que resultan de la actividad de una glicosil transferasa 2 β , 1,6 N-acetilglucosamiltransferasa específica (C2GnT). La isoforma de 130 kDa contiene principalmente hexasacáridos NeuAc(α 2-3)-Gal(β 1-3) [NeuAc (α 2-3) NeuAc(α 2-3) Gal(β 1-4) GlcNA(β 1-6)] Gal-NAc, mientras que la de 115 kDa contiene casi exclusivamente tetrasacáridos NeuAc(α 2-3)-Gal(β 1-3) [NeuAc(α 2-6)] GalNAc.

La expresión deficiente de CD43 coincide con estados de inmunodeficiencias severas como el Síndrome de Wiskott-Aldrich [100]. En pacientes infectados con HIV se ha encontrado una forma aberrante en glicosilación de CD43 [101, 102], lo cual a su vez correlaciona con reportes de la presencia de anticuerpos dirigidos contra una forma hiposialilada de CD43 diferente de la isoforma de 130 kDa en estos pacientes [103].

c) Regulación del gene de CD43

El gene que codifica para CD43 está localizado en el cromosoma 16 en humanos y 7 en ratones [104]. Este gene consta de dos exones y un intrón. El producto entero traducido es codificado en el segundo exón, el cual no contiene intrones [105]. CD43 humano tiene dos mRNAs codificantes de 1.9 y 4.3 kb, generados por señales de poliadenilación alternativa en la región 3' no traducida [106].

La regulación del gene de CD43 ha sido estudiada principalmente en células tumorales humanas de origen linfoide como K562, U937 y células Jurkat. La expresión del gene de CD43 es mantenida por una elevada actividad transcripcional de Sp1 y es regulada positivamente por dos factores nucleares, PyRo1 y PyRo2. Adicionalmente, el

intrón actúa como *enhancer*. La represión inducida por activación transcripcional de CD43 en leucocitos se lleva a cabo por la unión de los represores hnRNP-K y Pur (α) a estructuras de cadena sencilla expuestas dentro del promotor [107, 108].

e) **Ligandos**

A la fecha, se han identificado varios contra-receptores para CD43: ICAM-1 [109], cuya interacción con CD43 podría regular la adhesión entre la célula T y la APC a través de las integrinas $\alpha 1\beta 2$ [110]. Galectina-1 [111], que es abundante en superficie de células epiteliales tónicas y a partir de esta interacción se sugiere la participación de CD43 en procesos de selección negativa de timocitos [112]. A través del estudio de adhesión espontánea entre células T y APCs se encontró que CD43 es capaz de interactuar con moléculas MHC-I y que las señales generadas por CD2 o por CD43 regulan la afinidad de CD2 por CD58 y la de CD43 por MHCI, sugiriendo que la interacción de CD2 y CD43 con sus respectivos ligandos pudiese participar en la formación de conjugados entre linfocitos T y APCs, modulando la adhesión entre estos dos tipos de células [113]. En neutrófilos, se ha reportado que CD43 interactúa con albúmina sérica humana (HSA), modulando el *spreading* de los neutrófilos [114]. Por otro lado, CD43 actúa como receptor para el virus de influenza tipo 2 y esta interacción parece participar en la disfunción de leucocitos polimorfonucleares asociada a esta infección [115]. CD43 promueve una interacción estable entre *M. tuberculosis* y receptores sobre la membrana de macrófagos, muy probablemente a través de sialoadhesina de macrófagos [116] y facilita la respuesta específica de la célula frente a la infección [117]. En linfocitos T de ratón, la transialidasa de *Trypanosoma cruzi* genera un efecto co-estimulador de las señales del TCR, mismo que es abatido en presencia de anticuerpos que bloquean a CD43, lo que sugiere que esta enzima es otro ligando de CD43 [118].

Es de llamar la atención que cada una de las moléculas que han sido identificadas como ligandos de CD43, son a su vez ligandos de otras moléculas co-receptoras de la superficie de linfocitos T: CD8 interactúa con MHC-I, LFA-1 con ICAM-1, galectina con CD45, CD7, CD4 y CD3. Esto sugiere que CD43 podría tener un papel regulador de

las interacciones celulares [119]. Por otra parte, el hecho de que los distintos ligandos descritos para CD43 sean compartidos por otras moléculas de la superficie celular ha dificultado el uso de los mismos para evaluar su efecto fisiológico, por lo que el entrecruzamiento de anticuerpos dirigidos contra CD43 sobre la superficie celular ha permitido dilucidar algunas de las funciones de la molécula.

e) CD43 se relocaliza en distintos puntos en la superficie de los linfocitos T en respuesta a distintos estímulos

Al estimular células CD43⁺ con ligandos de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ como fibronectina e ICAM-1 respectivamente, CD43 se redistribuye en la superficie celular, en el extremo de la célula opuesto al punto de contacto entre la integrina y su ligando lo que sugiere que, al relocalizarse, CD43 modifica la carga neta negativa en una región de la superficie celular [110]. Así mismo, los resultados obtenidos con células transfectadas con el gene humano de CD43 o células deficientes en la expresión de CD43 (CD43^{-/-}), se interpretaron en su momento como que la carga negativa conferida por el alto contenido de ácido siálico de CD43 proporciona a la célula fuerzas repulsivas que contribuyen a regular de manera negativa la adhesión de linfocitos T con células blanco o APCs [120, 121] El hecho que CD43 se excluya del sitio de contacto entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno cuando se establece la sinapsis inmunológica, en un mecanismo dependiente de su asociación a proteínas de la familia de las ERM [122], apoya esta idea. Sin embargo, la presencia de CD43 en el sitio de contacto entre un linfocito T y una APC no interfiere con las señales generadas por el TCR, y la agregación homotípica resultante del entrecruzamiento de CD43 en la superficie de distintas estirpes de células linfoides descarta la posibilidad de que CD43 represente un impedimento estérico para un contacto celular eficiente y para la transmisión de señales intracelulares [58]. Mas aún, resultados recientes de nuestro laboratorio han demostrado que la estimulación de linfocitos T a través de CD43 induce la polarización de moléculas de señalización hacia el sitio de contacto entre la esfera y el linfocito T [123], sugiriendo que CD43 participa activamente en la redistribución de moléculas de señalización intracelular favoreciendo la activación de la célula. En el mismo trabajo se evidenció que la

estimulación a través de CD43 no induce la redistribución del TCR sobre la superficie celular.

f) Transducción de señales a través de CD43

Las señales generadas a través de CD43 dependen de su región intracelular. Los intermediarios de señalización activados por CD43 son numerosos. A continuación se hace una breve reseña de las principales vías de señalización activadas como resultado de la oligomerización de CD43.

Los eventos intracelulares más tempranos en respuesta a la estimulación de linfocitos T a través de CD43 incluyen la asociación del dominio citoplásmico de CD43 con las cinasa de la familia Src, Fyn y Lck, la fosforilación de estas en residuos de tirosina [124, 125]. Esta asociación se da presumiblemente a través de una región rica en prolinas presente en la región intracelular de CD43 con los dominios SH3 de Fyn y Lck. Así mismo, el entrecruzamiento de CD43, induce la fosforilación de los ITAMs de la cadena ζ a través de Lck y Fyn [123]. Una vez que los ITAMs de la cadena ζ son fosforilados en tirosinas, se convierten en sitios específicos de acoplamiento, que se asocian a proteínas citoplásmicas con dominios SH2, los cuales se unen de manera específica a tirosinas fosforiladas. ZAP-70 es una de estas proteínas.

Las PTKs reclutadas en respuesta a las señales de CD43 fosforilan y activan diversos sustratos, entre los que se encuentra las proteínas adaptadoras LAT y Shc. Las proteínas adaptadoras desempeñan un papel importante en la activación celular, ya que actúan como un andamiaje que favorece la formación de complejos de señalización, facilitando así la transducción de señales intracelulares. Entre sus múltiples funciones, LAT se une a la fosfolipasa C γ -2 (PLC- γ -2) [126], permitiendo el reclutamiento de esta última. PLC- γ -2 se activa al ser fosforilada por las PTKs reclutadas y cataliza la hidrólisis de un fosfolípido de membrana llamado fosfatidil inositol bi-fosfato (PIP2), lo que conduce a un aumento en los niveles citoplásmicos de los productos de la hidrólisis de PIP2: inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). IP3, estimula la liberación de calcio de los depósitos intracelulares, con lo que induce un incremento de Ca^{2+} intracelular. El calcio se une a la proteína calmodulina y el complejo que resulta de esta unión activa a la

fosfatasa calcineurina, la cual defosforila al factor transcripcional NFAT, lo que induce la translocación de este último al núcleo. Por otra parte, DAG junto con Ca^{2+} , activa diferentes isoformas de la proteína cinasa C (PKC), las cuales a su vez participan en la activación de la vía de las MAP cinasas y en la activación de factores transcripcionales como NFAT, NF κ B y AP-1 [127, 128].

La estimulación a través de CD43, promueve también la activación de Vav que es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) para GTPasas de la familia Rac, y que es fosforilado en tirosinas como resultado del entrecruzamiento de CD43 sobre la superficie de los linfocitos T. Este evento resulta en la formación de complejos moleculares que incluyen moléculas adaptadoras como Shc, SLP-76 y Grb2, implicados en la síntesis de IL-2 y rearrreglos de citoesqueleto [127].

PI3K parece tener un importante papel en el control de las señales generadas por CD43. Dentro de las funciones descritas para PI3K destacan, su participación en el metabolismo de fosfolípidos, la fosforilación de la cinasa Syk, la activación de PLC- γ y la activación de la cascada de las MAP cinasas; la activación de isoformas nuevas de PKC y remodelación de citoesqueleto. CD43 también ha sido involucrada en estos eventos, sugiriendo que los mismos están regulados por la actividad de PI3K inducida a través de CD43.

Las señales inducidas a través de CD43 conducen a la activación de la vía de las MAP cinasas. En particular, se sabe que CD43 activa a las MAP cinasas: p38, JNK y ERK. La inducción de la activación de los factores de transcripción NFAT, NF κ B y AP-1, en respuesta a la estimulación a través de CD43 desemboca en la regulación de la expresión de genes que codifican para proteínas importantes para el desarrollo y función de la célula T, como IL-2, así como de proteínas de superficie marcadoras de activación como CD25 y CD69 [128].

El fenotipo del ratón deficiente de se discutirá a lo largo de la siguiente sección en la que se describen las funciones de esta molécula en las distintas estirpes celulares de la respuesta inmune.

g) Las señales de CD43 y el TCR se regulan mutuamente

La molécula CD43 es una molécula con múltiples funciones. Una de ellas es la de ser una molécula co-receptora del TCR. El efecto co-estimulador de CD43 sobre el TCR es dependiente de la región intracelular de CD43. Esto se demostró en experimentos en los que se expresaron mutantes de CD43 humano en un hibridoma murino específico para HLA-DR, en los que la mutante que codifica para una forma de CD43 que carecía de la región intracelular de esta molécula, dicha mutante no tuvo el efecto co-estimulador de la molécula silvestre [129]. CD43 y el TCR comparten múltiples intermediarios de señalización y datos recientes de nuestro laboratorio sugieren que las vías de señalización de ambas moléculas se regulan mutuamente. El entrecruzamiento de CD43 sobre la superficie celular induce su asociación con Fyn, dicha asociación es eliminada tras la estimulación vía el TCR, sugiriendo una regulación recíproca entre las maquinarias de señalización de ambas moléculas [124]. En la sección III , mencionamos que Cbl, una proteína adaptadora con actividad de E3 ligasa, participa en la regulación de las señales inducidas por el TCR. La fosforilación de Cbl en residuos de tirosinas resultante de las señales mediadas a través del TCR, induce su asociación con múltiples proteínas, que una vez asociadas a Cbl, son degradadas. Por otra parte, se sabe que la fosforilación de Cbl en residuos de serina anula el efecto inhibitorio de esta ligasa de ubiquitina. La estimulación de linfocitos T a través de CD43 induce la fosforilación en serinas de Cbl, sugiriendo que las señales de CD43 modulan positivamente el nivel de activación de los linfocitos, al favorecer la acumulación de moléculas de señalización activadas y por ende, prolongando las señales de estas [42].

Recientemente se ha mostrado que la localización espacio-temporal de las moléculas refleja su participación en los eventos de señalización intracelular. En el caso de las señales de CD43 y del TCR, queda por definir como se reparten en el espacio intracelular y membranal los numerosos mediadores intracelulares que son activados en respuesta a

las señales de cada una de estas moléculas. Es posible que la cinética y distribución de los mismos varíe dependiendo del estímulo y que la respuesta generada por parte de la célula sea el resultado de la regulación de dichos eventos (Figura 5).

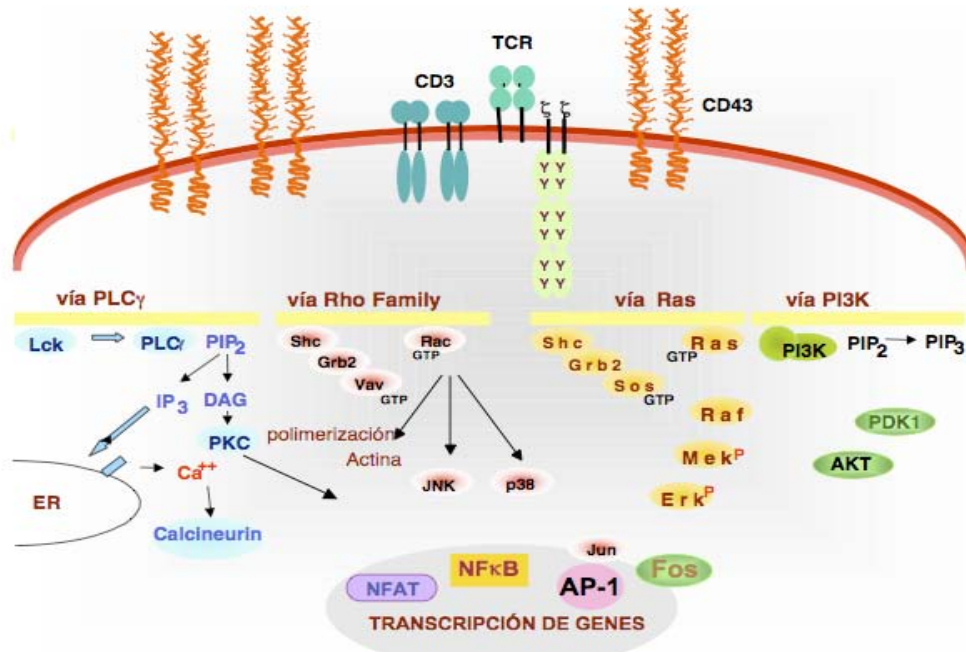


Fig. 5. Cascadas de señalización activadas por CD43 y el TCR. El entrecruzamiento de CD43 y el TCR en la superficie celular genera entre otras cosas la activación de intermediarios de señalización tempranos como Lck y Fyn, promoviendo el reclutamiento de moléculas adaptadoras como LAT hacia sitios específicos en los que se formarán complejos de señalización que inducirán por una parte, el catabolismo de fosfolípidos y por otra, la activación de la vía de las MAPKs. En conjuntos, la activación de estas vías conduce a la activación de factores transcripcionales y a la regulación génica de la célula.

IX. FUNCIONES DE CD43 EN LAS DIFERENTES CELULAS DE LA RESPUESTA INMUNE

Numerosos tipos celulares y mediadores químicos, conectados por una intrincada red de comunicación, influyen en la generación de una respuesta inmune eficiente. Las moléculas presentes en la superficie de cada tipo celular favorecen el establecimiento de dicha comunicación y le permiten a las células percibir cambios en el entorno. Esta percepción del medio circundante genera señales hacia el interior de la célula para

finalmente dar origen a una gran variedad de respuestas que van desde proliferación, diferenciación, generación de anticuerpos, hasta quimiotaxis y apoptosis. Entre las moléculas presentes en la superficie celular, CD43 se caracteriza por expresarse de manera constitutiva en todas las células hematopoyéticas, a excepción de los eritrocitos. En conjunto, la información con que se cuenta, sugiere que CD43 participa en múltiples facetas de la vida celular: la regulación de la diferenciación, adhesión, migración, proliferación y muerte celular. Para ello, CD43 se vale de varias vías de señalización que conducen a la regulación de la expresión de múltiples genes. Además, la fina regulación de su expresión sobre la superficie celular, sumada a la abundancia de ligandos descritos para esta molécula, sugieren que las respuestas en las que se vea involucrada dependerán del contexto en el que se encuentre, como se describe a continuación.

a) Participación de CD43 en la respuesta inmune innata (macrófagos, neutrófilos, NK, células cebadas)

Los macrófagos son considerados como la primera línea de defensa en contra de agentes patógenos y son rápidamente reforzados por los neutrófilos que migran hacia el sitio de la infección. Al carecer de especificidad por los patógenos y ejercer su efecto citotóxico, los macrófagos, las células NK, los neutrófilos y las células cebadas destruyen a muchos de estos agentes infecciosos, sin necesidad de activar la respuesta inmune adaptativa. La activación de la maquinaria de estas células, misma que favorece la migración y funciones efectoras como citotoxicidad o producción de citocinas por parte de estas células, constituye un eslabón importante en la generación de respuestas inmunes eficientes.

La presencia de CD43 en la membrana de macrófagos promueve la interacción de *M. tuberculosis* con estas células y contribuye a la generación de la respuesta inmune frente a la infección, específicamente a la producción de TNF- α [117], sugiriendo la participación de CD43 no solo como un receptor para esta micobacteria sino también como un promotor de la respuesta desencadenada frente a la infección. Por otra parte, los macrófagos reconocen células T que se encuentran en las primeras etapas de apoptosis, a través de agregados de CD43. Este reconocimiento se puede bloquear con anticuerpos

anti-CD43 y se ha observado el reclutamiento transitorio de CD43 o “capping” hacia un sitio de la membrana de células T apoptóticas, en tiempos que coinciden con un aumento en la susceptibilidad de estas células para ser reconocidas por los macrófagos. El reconocimiento de células apoptóticas a través de CD43 parece depender de la asociación de esta molécula con nucleolina, que es una proteína multifuncional presente en el núcleo, citoplasma y sobre la superficie de algunos tipos celulares como macrófagos [130]. En experimentos posteriores, los mismos autores muestran que la inducción de apoptosis por Fas en las células T coincide, además de la relocalización de CD43, con la degradación de esta molécula [131].

En neutrófilos, CD43 ha sido caracterizado como un ligando del virus influenza. Este virus posee una neuraminidasa y hemaglutinina, de manera que es capaz de regular el estado de sialidación de las células que infecta. Al exponer neutrófilos al virus influenza se induce un proceso de desactivación celular, caracterizado por defectos en el estallido respiratorio, al encontrarse una reducción en la producción de NO y RO semejando lo que sucede cuando CD43 es entrecruzado en la superficie de este tipo celular. Sin embargo, el tratamiento de neutrófilos con elastasa, cuya actividad se ha visto estrechamente relacionada con la liberación de CD43 de la superficie celular [132] no inhibe las funciones celulares, lo que sugiere que además de CD43, otras moléculas contribuyen a la actividad del virus sobre estas células [133].

El entrecruzamiento de CD43 en la superficie de neutrófilos induce locomoción, la cual se caracteriza por el reclutamiento de CD43 hacia el urópodo o porción posterior de la célula en movimiento. La relocalización de CD43 hacia la misma zona también se ha reportada en respuesta a agentes quimioatrayentes y representa un proceso dependiente de actina [134, 135]. En estas células, CD43 se asocia a rafts y a citoesqueleto de manera simultánea y dado que los urópodos están enriquecidos en rafts, se sugiere que el mecanismo de redistribución de CD43 depende de su asociación a los mismos [136]. Reportes recientes muestran que la redistribución de CD43 hacia el urópodo es una consecuencia y no la causa de la migración celular y que es un proceso

reversible [137], lo que indicaría que si bien, CD43 induce locomoción de neutrófilos, ésta no depende de la relocalización de la molécula.

TNF- α desempeña un papel importante en la regulación de la adhesión celular ya que induce una disminución de la expresión de moléculas como CD11b y CD45, así como de CD43 [138, 139]. Por otra parte, la expresión de CD43 se ve disminuída en neutrófilos de pacientes con artritis reumatoide, aunado con un aumento en la expresión de marcadores de activación celular en la superficie de los neutrófilos (CD69 y CD11b). En conjunto, estos datos sugieren que la regulación de la expresión de CD43 en procesos inflamatorios mediados por TNF- α pudiese representar un punto de control de la activación celular. A la fecha, se han descrito dos vías que conducen a la regulación de la expresión de CD43 en neutrófilos: zymozan, y PMA inducen la proteólisis de CD43 generando dos porciones de la región extracelular de la molécula, al generar un corte en la región distal del N-terminal y en un sitio más cercano a la membrana celular, reduciendo hasta en un 70% los niveles de CD43 en la superficie celular [140]. Dado que zymozan es un extracto de levadura, a través del cual es posible activar a los TLRs, cabe la posibilidad de que estos receptores participen en la modulación de la expresión de CD43, lo que, como se discutirá en el transcurso de esta sección, apoya la idea de la participación de CD43 durante procesos infecciosos, al inducir la secreción de citocinas proinflamatorias y regular el proceso de quimiotáxis.

La elastasa de neutrófilos ha sido caracterizada como responsable de rasurar a CD43 en la superficie de estas células [132] en un proceso independiente del grado de glicosilación de CD43. Cabe destacar que la concentración de elastasa que se requiere para esto está dentro del rango de la concentración de elastasa liberada al medio por los neutrófilos durante procesos inflamatorios, lo que sugiere que la regulación de la expresión de CD43 en estos procesos pudiese ser importante. El efecto de la elastasa sobre CD43 es bloqueado por albúmina sérica humana [114], sugiriendo que la unión de CD43 con HSA la protege del efecto proteolítico de la elastasa. Tomando en cuenta el hecho que la concentración de albúmina es mucho mayor en el torrente sanguíneo que en los tejidos, este dato sugiere la participación de este ligando de CD43 en la regulación de

la migración celular hacia los focos infecciosos, regulando la expresión de esta molécula en la superficie celular.

En neutrófilos, las primeras etapas de la apoptosis se caracterizan por presentar alteraciones en la membrana plasmática que generan la formación de proyecciones de membrana en las que se concentran ciertas moléculas de la membrana celular; dicho evento es denominado blebbing. Sin embargo, la reducción de la expresión de CD43 parece deberse más bien a la liberación de la molécula en pequeñas vesículas en un proceso independiente al blebbing. Resulta interesante que los mecanismos de regulación de la expresión de CD43 en neutrófilos difieran dependiendo del estímulo adicionado ya que en el caso de procesos de activación, la reducción de los niveles de expresión de la molécula parece depender de cortes proteolíticos a diferencia de lo que sucede durante los procesos de muerte celular donde CD43 se libera en vesículas [131, 141].

El entrecruzamiento de CD43 sobre la superficie de células NK induce la generación de las quimiocinas RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β y este efecto logra prevenirse mediante el tratamiento con genisteína, lo que sugiere que CD43 genera señales hacia el interior de estas células mediante la activación de PTKs. Así mismo, las señales generadas por anticuerpos anti-CD43 inducen un aumento en la actividad citotóxica de las células NK [142]. A semejanza de lo que se describió en linfocitos T, se ha descrito la redistribución de CD43 fuera del sitio de contacto entre células NK y linfocitos B en un mecanismo que depende de las ERMs [143], lo que adiciona un nivel más de regulación de las funciones de CD43, las cuales parecen depender también del sitio en el que se encuentre sobre la superficie celular.

Las células NK CD56^{bright}, las cuales se caracterizan por responder a IL-2 y proliferar expresan la isoforma de 115 kDa de CD43, mientras que las NK CD56^{dim}, las cuales no proliferan en respuesta a IL-2, expresan la isoforma de 130 kDa. Al estimular células NK con IL-2 se presenta un cambio de la isoforma de 115 a la de 130 kDa [144]. La estimulación de células NK a través de CD43 resulta en una reducción de la expresión de los niveles de CD43 sobre la superficie celular, siendo éste, un efecto que depende de

la actividad de metaloproteasas como se evidenció con el tratamiento con fenantroleno, un inhibidor específico de metaloproteasas [144].

En células cebadas, las funciones de CD43 han sido pobremente descritas, pero como en el caso de neutrófilos, células fagocíticas y linfocitos, CD43 parece participar en funciones que algunas veces son opuestas. El entrecruzamiento de CD43 sobre la superficie de células cebadas no genera degranulación celular, el mismo tratamiento, induce la secreción de TNF- α e IL-8, lo que sugiere la participación de CD43 en la regulación de las funciones de este tipo celular [145]. La estimulación de células cebadas con anticuerpos anti-CD43, induce agregación homotípica, probablemente a través de una vía de señalización en la que participa PKC [146] [147].

La expresión de CD43 en la superficie de células cebadas parece estar regulada: un reporte en células HMC-1 (línea de células cebadas humanas) describe que el ácido retinóico genera un aumento en la expresión de CD43 [148], mientras que la expresión de esta molécula sobre las mismas células disminuye en respuesta a la estimulación con ésteres de forbol y con anticuerpos anti-CD43 [145]. Un reporte describe que la estimulación de células HMC-1 vía CD43 genera un aumento en la unión de haptoglobina (un reactante de fase aguda) a estas células, lo que sugiere una comunicación entre CD43 y otros receptores de la superficie celular [149].

El análisis de la respuesta de las células de la respuesta inmune innata frente a agentes patógenos en ratones deficientes de CD43 permitiría dilucidar la participación de esta molécula desde los primeras etapas de la infección, hasta las respuestas generadas, analizando la inflamación, actividad citotóxica, proliferación y secreción de citocinas para las cuales CD43 parece ejercer un efecto regulador.

b) Participación de CD43 en la respuesta inmune adquirida (linfocitos T, B y células dendríticas)

Las citocinas producidas como resultado de la inmunidad innata y las moléculas de superficie celular generan señales que comprometen a las células mediadoras de la

respuesta inmune adaptativa, para generar una respuesta específica frente a cada patógeno. CD43 participa en la regulación de la adhesión de células de la respuesta inmune adaptativa a otras células así como en la generación y transmisión de señales de activación.

Durante la respuesta al virus de la coriomeningitis, CD43 desempeña un papel dual en el transcurso de la infección. En eventos tempranos de la infección se observa un aumento en la expresión de la isoforma de 130 kDa de CD43 en células T efectoras, mismo que favorece la migración de linfocitos T CD8⁺ hacia el sitio de la infección, mientras que ratones CD43^{-/-} infectados con el mismo virus muestran un retraso en la fase de contracción de la respuesta frente al virus como resultado de una deficiente inducción de apoptosis de las células efectoras [150], lo que concuerda con la idea de un papel de CD43 como molécula accesoria, que al participar en procesos de adhesión y secreción de citocinas así como co-estimuladora del TCR desempeña un papel importante en la respuesta de los linfocitos T al ser retadas con agente patógeno. Por otra parte, los cambios en la expresión de las isoformas de CD43 durante procesos infecciosos sugieren que los eventos en los que esta molécula participe dependerán de la isoforma expresada y muy probablemente de los ligandos presentes en el entorno celular, por lo que el análisis de las respuestas celulares generadas por la interacción de CD43 con sus diferentes ligandos representa una cuestión fundamental en el entendimiento del papel de esta molécula.

Se desconoce la participación directa de CD43 en la infección con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV). Sin embargo, se sabe que las señales de CD43 asociadas con las del TCR potencian la transcripción y replicación de HIV, a través de una vía de señalización independiente de CD28 [151]. Así mismo, se ha reportado la presencia de autoanticuerpos anti-CD43 en la fase asintomática de pacientes con SIDA [101, 103] lo que correlaciona con el hecho de que se hayan encontrado vesículas de membrana plasmática enriquecidas en HLA-DR y CD43 en aislados de VIH obtenidos de células infectadas *in vitro* [152]. Estos datos sugieren la participación de CD43 en el desarrollo del síndrome, sin embargo, no descartan la posibilidad de que el virus esté

manipulando la maquinaria de glicosilación celular, lo cual contribuya a una desregulación en la expresión de una molécula altamente glicosilada como CD43.

Los experimentos realizados *in vivo* con ratones CD43^{-/-} han arrojado resultados opuestos en cuanto a la importancia de CD43 en los fenómenos de migración de los linfocitos a los órganos linfocitarios secundarios y a los tejidos. Por un lado, se encontró que los linfocitos T migran con mayor facilidad a los órganos linfoides secundarios de la periferia [153]. Paradójicamente, usando el mismo modelo experimental, se ha encontrado que la expresión de CD43 es un requisito para una migración adecuada de los linfocitos [154].

Se han descrito fenómenos de agregación homotípica en linfocitos T, como resultado del entrecruzamiento de CD43 sobre la superficie celular, los cuales dependen de la activación de señales intracelulares activadas vía esta molécula [155, 156]. CD43 inhibe el rodamiento de linfocitos T sobre las células epiteliales de vénulas altas [157, 158], así como fenómenos de agregación homotípica, independientes de la participación de integrinas leucocitarias [159, 160]. Así mismo, datos experimentales recientes demuestran que CD43 retarda significativamente el establecimiento de diabetes e inhibe la migración de linfocitos T a los islotes del páncreas, así como a glándulas salivales y lacrimales, limitando la amplitud de los procesos inflamatorios. Estos resultados sugieren que CD43 podría participar en el establecimiento de padecimientos autoinmunes mediados por linfocitos T y que este anticuerpo podría tener usos terapéuticos [161]. Por otra parte, CD43 ha sido considerada también como una molécula antiadhesiva en un modelo de interacción entre CD4/CD8 con linfocitos B independiente de antígeno. En este caso, se observó una menor formación de agregados entre CD8 y linfocitos B con respecto a los formados entre CD4 y linfocitos B, dado que los linfocitos CD8 expresan preferencialmente la isoforma de 130 kDa de CD43, estos resultados fueron interpretados como un impedimento estérico por parte de la isoforma más sialilada de CD43 que resulta en la inhibición de la agregación [162]. Las aparentes discrepancias del papel de CD43 en migración de linfocitos T pudiese ser el resultado de la expresión diferencial de las isoformas de la molécula y por lo tanto de interacciones intercelulares diferenciales al

contactar a través de múltiples ligandos. El hecho de que se han reportado cambios en la expresión de CD43 en la superficie de linfocitos T en respuesta a la estimulación vía CD3, que parece reducir la expresión de CD43 sobre la superficie celular en un modelo murino analizando la expresión de la molécula con el anticuerpo R2/60, apoya esta idea [163].

CD43 induce la secreción de IL-2 y la proliferación de linfocitos T [155]; además, se ha reportado la participación de CD43 como molécula co-estimuladora potenciando las señales del TCR en linfocitos intraepiteliales de ratón [164]. La inducción de proliferación vía CD43 ha sido reportada también en células mononucleares [125]. Reportes recientes muestran la activación de los genes responsables de la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimioatrayentes en respuesta a la estimulación vía CD43 [165]. El hecho de que la expresión de CD43 y algunos de sus ligandos como el caso de ICAM-1 participen en adhesión, sumado a la producción de citocinas quimioatrayentes en respuesta a la estimulación con CD43, sugiere que esta molécula participa activamente en la generación de respuestas inflamatorias no solo a través de la regulación de adhesión inter e intra-celular sino en la producción de citocinas y la proliferación celular.

Esta multifacética molécula participa en la inducción de apoptosis de células hematopoyéticas *in vitro*. El resultado de entrecruzar a CD43 en la superficie de células hematopoyéticas humanas, es que una población de estas células sea resistente a la inducción de apoptosis. Esta población celular corresponde a células quiescentes con características de células madre. En general CD43 afecta principalmente a las células que se están dividiendo, de modo que, el efecto de CD43 sobre estas células parece depender de la capacidad proliferativa de las mismas, otra explicación es que las vías de señalización activadas en cada caso sean diferentes dependiendo del estado de activación de las células. La estimulación con CD43 induce apoptosis en una línea de células derivadas de progenitores mieloides, tras periodos largos de estimulación (5 días), tras los que se observa la translocación de la proteína pro-apoptótica Bad a la mitocondria y finalmente a la muerte de las células [166].

El análisis de la expresión de CD43 en el hibridomas DO11.10 cuya estimulación antígeno-específica induce apoptosis, muestra un aumento en la expresión de esta molécula, el cual correlaciona con una menor susceptibilidad a la inducción de muerte. La aparente protección otorgada por CD43 parece estar dada por un bloqueo de las señales de Fas. En el mismo hibridoma, la expresión de CD43 se correlaciona con un efecto inhibitorio de apoptosis inducida por PMA/ionomicina, puesto que el gen de CD43 se identificó en células resistentes a muerte con este estímulo [167].

La expresión de CD43 en células de memoria y vírgenes parece estar relacionada con su grado de susceptibilidad a muerte. Las células vírgenes, las cuales se caracterizan por ser más susceptibles a morir por la vía de Fas, expresan niveles bajos de CD43 en su superficie, mientras que, las células de memoria, las cuales son más resistentes, expresan altos niveles de esta molécula en un modelo murino [168].

En conjunto, la inducción de apoptosis en progenitores hematopoyéticos a través de la unión de CD43 con un ligando en la médula ósea, pudiera representar un mecanismo importante en la regulación del crecimiento y diferenciación de estas células, por lo que el análisis de las cascadas de señalización activadas con este estímulo como de los ligandos naturales responsables de este efecto permitiría la creación de herramientas que regularan el proceso apoptótico activado en condiciones patológicas.

Cambios en la expresión de CD43 sobre la superficie de los linfocitos B, sugieren su participación en el desarrollo y activación de estas células, ya que, los linfocitos pro-B en médula ósea expresan CD43 en su superficie y esta expresión no se presenta en células pre-B en la periferia [169, 170]. En linfocitos B, la expresión de CD43 está regulada, la isoforma de 130 kDa solo se expresa en estas células tras su activación. El análisis de ratones transgénicos para CD43 en los que se sobre-expresó esta molécula en linfocitos B, permitió evaluar su efecto y se encontró que alteraciones en la expresión de CD43 correlacionan con inmunodeficiencias de tipo humoral, así como la prolongación de la supervivencia de estas células [171, 172]. Del análisis de este trabajo se concluye que los defectos en la respuesta inmune fueron resultado de deficiencias en la interacción entre

linfocitos T y B debido al aumento de CD43, que en este caso probablemente actuó como una molécula antiadhesiva.

En células dendríticas, la participación de CD43 en la inducción de agregación en células es controversial. Por una parte, se ha reportado un efecto positivo de CD43 en un modelo de células dendríticas obtenidas de bazo de ratas Wistar. En este modelo, la inducción de agregación homotípica vía CD43 correlaciona con la inducción de la maduración de las células evaluada por un aumento en la expresión de CD80 y CD86. Realizando el mismo análisis en un modelo de autoinmunidad (diabetes/tiroiditis), en el que se observa deficiencia en la formación de agregados, CD43 es capaz de revertir dicho efecto. Otro reporte en el que la pre-incubación de células dendríticas con anticuerpos anti-CD43, así como el tratamiento con neuraminidasa originan un aumento en la agregación de células dendríticas, se interpretaron como un efecto negativo de CD43 sobre la agregación. Sin embargo, el mismo reporte muestra un aumento en la expresión de marcadores de activación como HLA-DR, ICAM-1, B7-1, B7-2, CD40 y CD83 y un aumento de la proliferación celular [173], lo que sugiere que CD43 señala hacia el interior de la célula y que el efecto observado probablemente dependerá del modelo en el que se le analice. Finalmente, la inhibición de agregados formados espontáneamente entre células dendríticas y linfocitos B, como resultado de bloquear la interacción de estas células utilizando los anticuerpos anti-CD43, así como anticuerpos anti-MHC-1 [113], sugiere que la interacción entre CD43 y uno de sus ligando descritos, MHC-1, desempeña un papel importante en este fenómeno.

Aunado a la participación de CD43 en polarización [122], quimiotaxis, adhesión, y proliferación [120, 121], se ha reportado que esta molécula también participa en eventos fisiológicos como diapédesis [134], y agregación [155]; así como en la regulación del crecimiento, diferenciación celular y apoptosis [166]. En conjunto, estos datos sugieren que CD43 participa de manera importante en múltiples funciones de los linfocitos T, B y células dendríticas. Por otra parte, debido a su estructura alargada y a su abundancia, CD43 podría mediar las primeras interacciones entre los linfocitos T y las APCs, modulando las señales inducidas a través del TCR y las otras moléculas de la

superficie celular. Las aparentes discrepancias en la participación de CD43 en las respuestas discutidas, son probablemente el resultado de diferencias en las señales que dependerán de la isoforma de CD43 a través de la cual las células estén siendo estimuladas así como de los ligandos involucrados, de modo que el análisis detallado de las distintas isoformas de CD43, así como ensayos funcionales con los diferentes ligandos descritos, permitirían verificar la idea de que CD43 ejerce un efecto distinto que depende del contexto celular en el que se encuentre.

Considerando que una célula no percibe señales individuales sino que integra las señales generadas por conjuntos variables de receptores, entre los que se incluye a CD28 y CD43, cabe preguntarse el papel de cada uno de ellos como moléculas accesorias y como moléculas co-estimuladoras del TCR.

JUSTIFICACIÓN

El hecho que CD43 sea tan abundante, que constituya probablemente una antena que percibe cambios en el medio circundante y que utilice numerosas moléculas de señalización que también forman parte de la maquinaria del TCR sugiere que las señales de ambas moléculas son capaces de regularse mutuamente, generando una "conversación cruzada" (crosstalk) entre las dos vías de señalización. Así mismo, se puede pensar que el uso de intermediarios diferenciales, como resultado de la estimulación vía CD43 y el TCR generan variaciones en las cinéticas de activación, así como en la amplitud de las señales y eventualmente, en la respuesta celular.

HIPÓTESIS

La estimulación de linfocitos T a través de CD43 y el TCR resulta en la modulación diferencial de las vías de señalización intracelular y de la respuesta celular. Sumado a su papel como molécula co-estimuladora, CD43 es una molécula de superficie con efectos independientes de las señales del TCR.

OBJETIVOS

Evaluar el papel de CD43 en la inducción de agregación homotípica de linfocitos T humanos y describir las vías de señalización implicadas en dicho proceso, así como la activación de moléculas de señalización como PKC de manera independiente de las señales del TCR.

Comparar las posibles diferencias en tiempo, espacio e intensidad de las vías de señalización inducidas a partir de la estimulación a través de las moléculas CD43 y TCR bajo diferentes tratamientos de activación (estimulando primero a través de CD43 y co-estimulando con el TCR; estimulando primero vía el TCR y co-estimulando vía CD43 o estimulando de manera simultánea con ambas moléculas).

Evaluar si las posibles diferencias identificadas a nivel de las vías de señalización intracelular se traducen en respuestas celulares distintas.

CAPITULO II

RESULTADOS¹

¹ Como parte de nuestros se incluyen los resúmenes de las publicaciones realizadas en el transcurso del Doctorado. Las publicaciones correspondientes se encuentran en el ANEXO final.

RESUMEN DE ARTICULOS PUBLICADOS

Publicación a

La respuesta de los linfocitos T es modulada por el orden de estimulación a través de CD43 y el TCR.

Nora A. Fierro, Gustavo Pedraza-Alva e Yvonne Rosenstein.

Journal of Immunology. 2006, 176: 7346-7353.

El reconocimiento del antígeno por el TCR, en combinación con los estímulos proporcionados por las moléculas co-estimuladoras conducen a la expansión y diferenciación de los linfocitos T. Sin embargo, se desconoce el orden en el que las moléculas de superficie interactúan con sus contra-receptores y si éste repercute sobre la respuesta generada por parte de los linfocitos T. Debido a las características estructurales de CD43, que una molécula abundante presente en la superficie de los linfocitos T, con un dominio extracelular que se extiende 45 nm desde la superficie de la célula T. Nuestra hipótesis es que CD43 pudiera ser una de las primeras moléculas que interactúa con sus contra-receptores en la APC, y por lo tanto, pudiese modular la activación de los linfocitos T mediada por el TCR. Nuestros resultados muestran que el reclutamiento de CD43 previo o simultáneo al reclutamiento del TCR, impide la interacción entre SHP-1 y Lck, inhibiendo la activación de un mecanismo de regulación negativa sobre las señales del TCR, favoreciendo así, la secreción de altos niveles de IL-2, la inducción de proliferación celular y la secreción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas. En contraste, las señales intracelulares que resultaron del reclutamiento previo del TCR a las señales de CD43 no fueron suficientes para inducir la producción de IL-2 y la proliferación celular. Cuando las células fueron estimuladas a través de CD28 y el TCR, proliferaron independientemente del orden en el que CD28 y el TCR fueron reclutados. Estos resultados indican que CD43 induce una cascada de señalización que prolonga la duración de las señales del TCR y apoyan el modelo de sumatoria de señales para la activación de los linfocitos T. Nuestros resultados muestran que el orden con el que ciertos estímulos son percibidos por la célula, representa un nuevo mecanismo de regulación de la respuesta celular.

Publicación b

CD43 regula el umbral de activación de los linfocitos T controlando las funciones de Cbl.

Gustavo Pedraza-Alva, Lilia B. Mérida-Long, Roxana del Rio, **Nora A. Fierro**, Mario E. Cruz-Muñoz, Norma Olivares, Vivian Igras, Georg, A. Holländer, Steven, J. Burakoff e Yvonne Rosenstein.

Journal of Biological Chemistry. 2006. Sometido.

La activación de los linfocitos T requiere las señales generadas por el TCR y aquellas inducidas por las moléculas co-receptoras. Se ha propuesto que las señales co-estimuladoras regulan el umbral de activación de los linfocitos T previniendo el efecto negativo de los miembros de la familia de Cbl sobre las señales del TCR. En este reporte mostramos que las señales de CD43 cuando son previas a las del TCR, inhiben la fosforilación en tirosinas de Cbl, y la interacción entre Cbl y Crk-L, en un mecanismo que depende de la actividad de PKC θ . El entrecruzamiento de CD43 previo al entrecruzamiento del TCR, también resultó en la ubiquitinación de Cbl-b y en un retraso en la degradación de ZAP-70 y la cadena ζ , generando un aumento en la activación de la vía de las MAPK y en la respuesta de los linfocitos T. Estos resultados demuestran que las señales mediadas por CD43 reducen el umbral de activación de los linfocitos T al bloquear el efecto inhibitorio de Cbl y Cbl-b sobre las señales del TCR.

Publicación c

La activación de linfocitos T humanos inducida por el reclutamiento de CD43 requiere de la participación de PKC θ .

Roxana del Rio, Mercedes Rincon, Esther Layseca-Espinosa, **Nora A. Fierro**, Yvonne Rosenstein, Gustavo Pedraza.

Biochemical and Biophysical Research Communications. 2004. 325 : 133-143.

El catabolismo de foinosítidos da lugar a la activación de PKC, que a su vez, constituye uno de los ejes principales de las señales intracelulares. En los linfocitos T, la activación de PKC como resultado del reclutamiento del TCR y las moléculas co-receptoras garantiza la respuesta productiva de la célula. CD43 es una molécula co-receptora que promueve la activación y proliferación de los linfocitos T, induciendo la secreción de IL-2 y la expresión de CD69 en la superficie celular. El reclutamiento de CD43 en la superficie de los linfocitos T promueve la degradación de fosfolípidos y la producción de DAG. Por otra parte, se requiere de la activación de PKC para la activación de la vía de las MAPK en respuesta al entrecruzamiento de CD43. En este trabajo mostramos que el reclutamiento de CD43 induce la translocación a la membrana y la actividad enzimática de diferentes isoenzimas de PKC: cPKC (α/β), nPKC (ϵ y θ), aPKC (ζ) y PKC μ . La activación de PKC θ que resultó de la estimulación de linfocitos T a través de CD43 indujo la expresión de CD69 a través de un mecanismo dependiente de la actividad de ERK con la subsecuente activación de AP-1 y NF- κ B y por un mecanismo independiente de ERK en el que se indujo la activación de NFAT. En conjunto, estos resultados sugieren que PKC θ desempeña un papel importante en las funciones co-estimuladoras de CD43 en linfocitos T humanos.

Publicación d

Agregación de linfocitos T inducida por CD43: señales intracelulares e inhibición por leflunomida, un fármaco modulador de la respuesta inmune.

Esther Layseca-Espinosa, Gustavo Pedraza-Alva, José Luis Montiel, Roxana del Río, **Nora A. Fierro**, Roberto González-Amaro e Yvonne Rosenstein.

Journal of Leukocyte Biology. 74 (2003) 1083-1093.

La molécula co-receptora CD43 participa en la adhesión y activación de linfocitos T. La agregación homotípica es el resultado de la activación de las cascadas de señalización intracelular inducidas en respuesta a la interacción de diferentes moléculas de superficie con sus respectivos ligandos y requiere de un metabolismo activo por parte de la célula, la reorganización del citoesqueleto y la relocalización de las moléculas presentes en la superficie celular. El objetivo de este trabajo fue identificar algunos de los elementos de la cascada de señalización inducida en la respuesta a la estimulación de linfocitos T a través de CD43 que conducen a la agregación homotípica. La agregación homotípica de linfocitos T, mediada por CD43 requirió la participación de las cinasas de la familia Src, PLC- γ 2, PKC, PI3K, así como ERK1-2 y p38. Los datos mostrados aquí, sugieren que estas moléculas de señalización desempeñan un papel central en la regulación de la remodelación del citoesqueleto de actina posterior a la estimulación con CD43. También evaluamos la capacidad de fármacos inmunomoduladores como leflunomida para bloquear la agregación homotípica mediada por CD43. La leflunomida bloqueó el reclutamiento de las moléculas blanco para la actividad de las cinasa de la familia Src, así como la polimerización de actina, disminuyendo la capacidad de los linfocitos T para agregarse en respuesta a las señales específicas generadas por CD43, sugiriendo que la leflunomida podría controlar la migración y reclutamiento de las células linfoides a tejidos inflamados.

RESULTADOS NO PUBLICADOS

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

I. Anticuerpos y reactivos

Se usó el anticuerpo monoclonal L10, IgG1[174] que reconoce a la molécula CD43 y un anticuerpo monoclonal anti-CD3/TCR, OKT3, IgG2a (American Type Culture Collection). Se utilizaron como entrecruzadores, anticuerpos clase específicos anti-IgG1 y anti-IgG2a de FisherBiotech y anti-IgG1 alexa 488 y anti-IgG2a alexa 568 de Molecular Probes. Avidina-FITC es de Molecular Probes. El anticuerpo 1B4 (anti-integrina β 2 activada) fue un obsequio del Dr. Carlos Rosales.

I. Determinación de los niveles de integrina β 2 activada sobre la superficie celular

Se estimularon 1×10^6 linfocitos T por 24 horas a 37 °C como se refiere en la publicación *a*. En el caso de las células pre-estimuladas, el pre-estímulo se realizó durante 2 horas a 37 °C con L10 u OKT3 para posteriormente adicionar el segundo estímulo, OKT3 o L10 respectivamente e incubar las células durante 24 horas. Una vez concluída la activación, las células se incubaron con el anticuerpo anti-integrina β 2 activada 1B4 conjugado con biotina a una concentración de 4 μ g/ml por 30 min a 4°C. Se lavaron las células por centrifugación a 300 g con solución de lavado, y se incubaron a 4°C y protegidas de la luz con avidina acoplada a fluoresceína a una concentración de 1 μ g/ml por 30 min. El exceso de anticuerpo y la fijación de las células se realizó en paraformaldehído al 2% en PBS y las muestras se analizaron por citometría de flujo.

II Evaluación de la distribución de CD43 y el TCR en la superficie celular

Se estimularon 1×10^6 linfocitos por 30 minutos a 37 °C siguiendo los diferentes protocolos de activación. En el caso de las células pre-estimuladas, el pre-estímulo se realizó durante 30 minutos a 37 °C con L10 u OKT3 para posteriormente adicionar el segundo estímulo, OKT3 o L10 respectivamente e incubar durante 30 minutos. Los anticuerpos L10 y OKT3 se entrecruzaron con los anticuerpos acoplados a fluoróforos, anti-IgG1 alexa 488 (entrecruzador para L10) y anti-IgG2a alexa 568 (entrecruzador para

OKT3). Todos los anticuerpos se emplearon a una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$. Una vez concluida la activación y tinción simultánea, las células se lavaron por centrifugación a 300 g con solución de lavado y se fijaron con paraformaldehído al 1% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células por centrifugación a 300 g con solución de lavado y se montaron para realizar el análisis por microscopía de epifluorescencia y el correspondiente análisis de las imágenes con el programa IPLab.

RESULTADOS

La estimulación previa o simultánea de CD43 a las señales del TCR induce la activación de la integrina $\beta 2$ sobre la superficie celular

Las integrinas son una familia de receptores transmembranales que promueven la unión entre las proteínas de la matriz extracelular con sus contra-receptores en las células adyacentes. Estos receptores desempeñan un papel fundamental en inflamación, inmunidad innata y antígeno específica y en la regulación del crecimiento celular y diferenciación. Las integrinas $\beta 2$ han sido ampliamente estudiadas y se han caracterizado como CD11a/CD18 (LFA-1, $\alpha 1\beta 2$), CD11b/CD18 (Mac-1, $\alpha_M\beta 2$), CD11c/CD18 (p150/95, $\alpha_X\beta 2$) y CD11d/CD18 ($\alpha_D\beta 2$). CD11a/CD18 se expresa principalmente en células linfoides pero se le encuentra presente en la superficie de todos los leucocitos, CD11b/CD18 se encuentra enriquecida en células mieloides y CD11c/CD18 y CD11d/CD18 se encuentran principalmente en monocitos y macrófagos [175-177]. Es así, como la expresión de integrinas sobre la superficie celular desempeña un papel regulador de la adhesión inter-celular.

Entre las múltiples funciones descritas para CD43, esta molécula se ha relacionado con fenómenos de adhesión celular [110, 126, 156]. Como parte de los resultados expuestos en esta tesis (*publicación d*) se dilucidaron algunas de las moléculas claves activadas vía CD43 que repercuten sobre la agregación homotípica de linfocitos T. La agregación mediada por CD43 requiere de la participación de las Src cinasas, PLC $\gamma 2$, PKC, PI3K así

como ERK1/2 y p38 [156]. De modo que la modulación del estado de activación de integrinas leucocitarias como resultado de la estimulación vía CD43 pudiese repercutir con el papel del TCR sobre el mismo fenómeno. Con el propósito de determinar la participación de CD43 en la regulación de la activación de integrinas mediada por el TCR se realizaron experimentos en los que se estimularon las células con los diferentes protocolos de activación y se determinó la expresión de la integrina $\beta 2$ activada en la superficie celular. La estimulación a través de CD43 no indujo la activación de estas integrinas, mientras que como se había descrito anteriormente [178] la estimulación vía el TCR indujo que un 16% de las células analizadas presentaran la conformación activa de la integrina $\beta 2$. La estimulación simultánea a través de CD43 y el TCR indujo que un 23% de las células presentaran la forma activada de la integrina $\beta 2$. La pre-estimulación con CD43 indujo la activación de $\beta 2$ en un 33%, mientras que la pre-estimulación con el TCR y co-estimulación con CD43 no indujo la activación de esta integrinas. La integrina $\beta 1$ presentó el mismo patrón de activación que la integrina $\beta 2$ en respuesta a los diferentes estímulos (datos no mostrados). Nuestros resultados sugieren que si bien, CD43 no parece inducir la actividad de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ a este tiempo, facilita su activación al co-estimular las señales del TCR o bien al representar el primer estímulo para la célula. De manera sorprendente, cuando las células son estimuladas primero a través del TCR y CD43 es el segundo estímulo, esta molécula parece inhibir la activación de estas integrinas mediada por el TCR.

El orden de estimulación a través de CD43 y el TCR incide sobre su distribución en la superficie celular

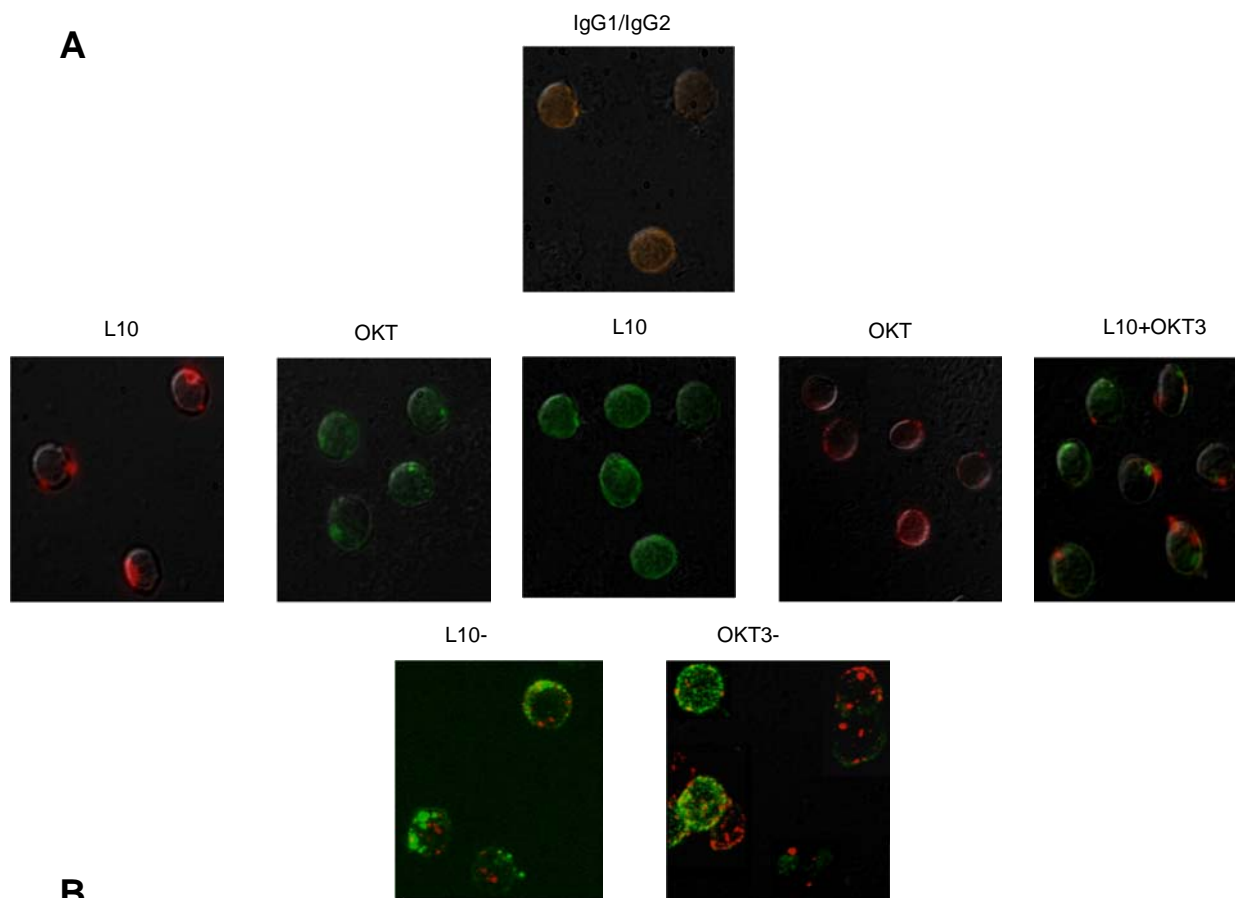
Reportes recientes de nuestro laboratorio demuestran que la estimulación de linfocitos T con esferas recubiertas con L10 inducen la polarización de moléculas de señalización hacia el sitio de contacto entre la esfera y el linfocito T [123], sugiriendo que CD43 participa activamente en la redistribución de moléculas de señalización intracelular, favoreciendo la activación de la célula. En el mismo trabajo se evidenció que la estimulación a través de CD43 no induce la redistribución del TCR sobre la superficie celular. No obstante, se desconoce si la estimulación a través de TCR y CD43 bajo diferentes formatos de activación modifica la distribución de estas moléculas en la

superficie. Con el propósito de responder esta pregunta, se realizaron experimentos en los que se activaron linfocitos T durante 30 min con L10, OKT3, L10+OKT3, o se pre-estimularon durante 30 min el primer estímulo y co-estimularon por los siguientes 30 min con el segundo estímulo. En todos los casos, los anticuerpos que se emplearon para entrecruzar a L10 y a OKT3 estaban acoplados a fluoróforos..

Como se había reportado previamente, la estimulación vía el TCR indujo su propia redistribución en la superficie de los linfocitos T, resultando en la formación de “caps” en un 93% de las células analizadas. Así mismo, y conforme a lo esperado, el mismo estímulo indujo la redistribución de CD43 en un 90% de las células analizadas. Sin embargo, dicho estímulo no indujo la colocalización de CD43 y el TCR. Por su parte, la señales de CD43 indujeron su propia redistribución, generando un patrón en el que el 90% de las células analizadas presentaron “caps” de CD43 y como se esperaba, no se observó la redistribución del TCR ni se observó colocalización de CD43 y el TCR sobre la superficie celular. En cambio, la estimulación simultánea de CD43 y el TCR indujo la colocalización de estas moléculas en un 14% de las células analizadas. Con este mismo estímulo, se observó una reducción en el porcentaje de células que formaron “caps” del TCR (57%) con respecto a la estimulación individual vía CD43 o el TCR, mientras que se observó que el 86% de las células analizadas formaron “caps” de CD43. La pre-estimulación de linfocitos T a través de CD43 y co-estimulación con el TCR generó un patrón en el que el 100% de las células mostraron una distribución excluyente de CD43 y el TCR, siendo que el 75% de las células presentaron “caps” de CD43, y el 50% del TCR. Sorprendentemente, y a diferencia de los que sucede cuando las señales de CD43 anteceden o son simultáneas a las del TCR, la pre-estimulación vía el TCR y co-estimulación con CD43 indujo la redistribución de estas moléculas solo en un 25% de las células, mientras que en el 75% restante no se observó redistribución. Bajo estas condiciones experimentales, solo el 5% de las células forman “caps” de CD43 y 20% de ellas caps del TCR.

En base a estos resultados, el único estímulo que indujo, aunque en un reducido porcentaje, la colocalización de CD43 y el TCR fue la estimulación simultánea a través

de estas moléculas mientras que la pre-estimulación vía el TCR solo indujo una ligera redistribución de CD43 y el TCR sobre la superficie celular, resultando en que la mayor parte de las células analizadas no presentaran redistribución de estas moléculas.



B

Estímulo	Colocalización	Exclusión total	Exclusión parcial	CD43 caps	TCR caps	No redistribución
CD43	-	-	100%	90%	-	-
TCR	-	-	100%	90%	93%	-
CD43+TCR	14%	4%	82%	86%	57%	-
CD43-TCR	-	-	100%	75%	50%	-
TCR-CD43	-	-	25%	5%	20%	75%

Fig. 11 La distribución de CD43 y el TCR sobre la superficie celular varía dependiendo del orden de la adición de los estímulos. (A) Se estimularon linfocitos T humanos durante 30 min a 37 °C pre-estimulando con L10, OKT3 o estimulando de manera simultánea con L10 y OKT3 y se co-estimularon por 30 min con los anticuerpos correspondientes a 37 °C, OKT3 o L10 por 30 min. Los anticuerpos empleados como entrecruzadores estaban acoplados a fluoróforos (anti IgG1 alexa 568 para entrecruzar a L10 y anti IgG2a alexa 488 para entrecruzar a OKT3). Se montaron las muestras y se analizaron por microscopía de epifluorescencia. Las leyendas indican el estímulo adicionado, en rojo se muestra la tinción para L10 y en verde para OKT3. (B) Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa IPLab y los resultados correspondientes a 3 experimentos correspondientes se muestran en la tabla.

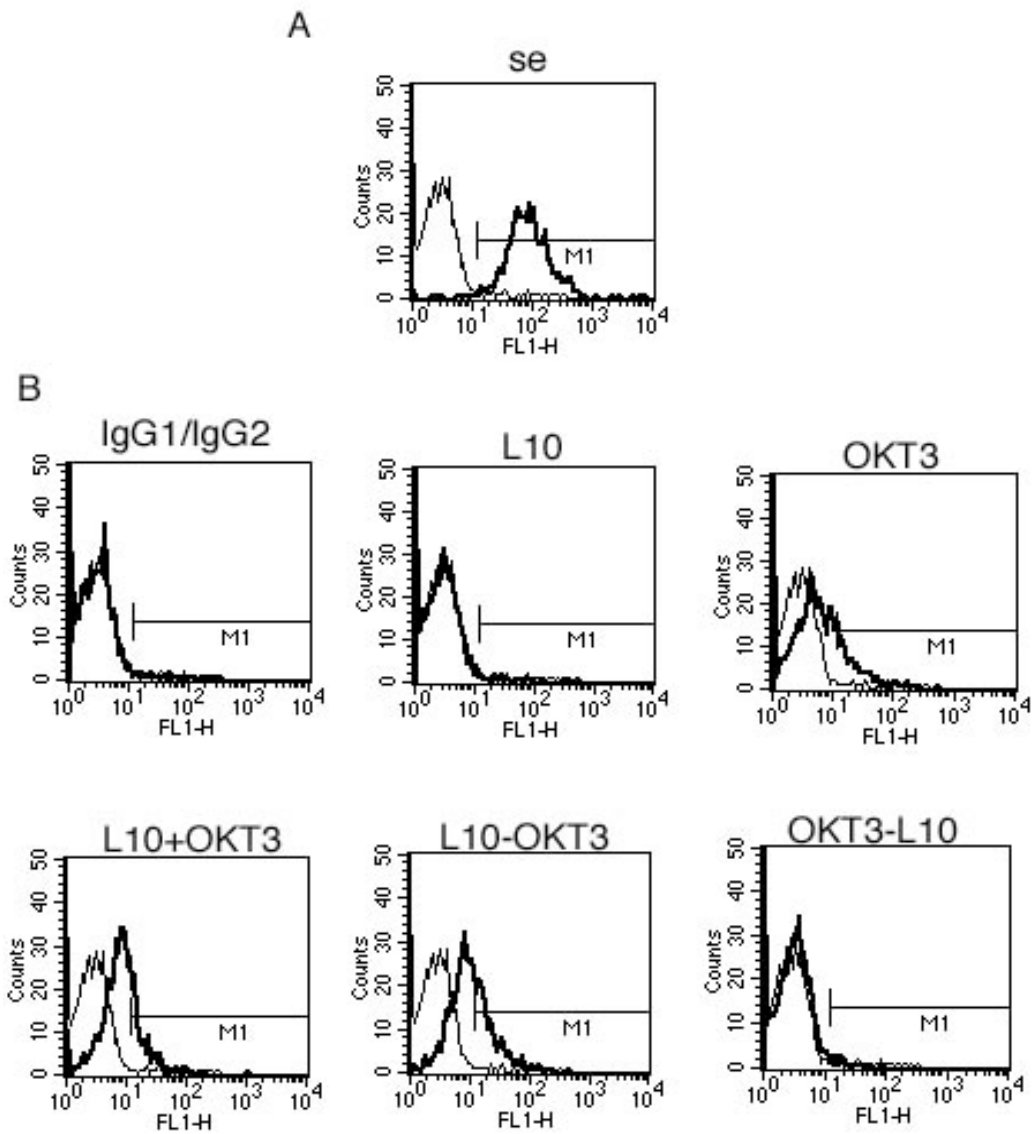


Fig. 11 El orden de estimulación a través de CD43 y el TCR regula el estado de activación de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$. (A) Se pre-estimularon linfocitos T humanos durante 2 horas a 37 °C con L10, OKT3 o estimulación simultánea con L10 y OKT3 y se co-estimularon por 48 horas con los anticuerpos correspondientes a 37 °C. Una vez concluida la activación, las células se incubaron con los anticuerpos anti-integrina $\beta 1$ o anti-integrina $\beta 2$ total o activadas, dichos anticuerpos están biotinilados por lo que se empleó biotina para realizar el análisis de la expresión de las integrinas por Citometría de flujo. (A) La expresión de la integrina $\beta 1$ y $\beta 2$ total fue la misma en todas las condiciones de activación. (B) Se muestra la expresión de la integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ en su conformación activa tras la estimulación con los diferentes protocolos descritos.

CAPITULO III
DISCUSION

DISCUSION

Los contactos entre distintas estirpes celulares son imprescindibles para desencadenar respuestas específicas en contra de un agente patógeno y el intercambio de información que se efectúa a través de estos procesos, habilita a las células para desempeñar sus funciones efectoras con precisión. La activación antígeno-específica de los linfocitos T resulta de la interacción del TCR con péptidos antigénicos derivados del agente patógeno y presentados en la superficie de las APCs a través de las moléculas del MHC. Sin embargo, esto no es suficiente para activar de manera eficiente a los linfocitos T ya se requiere información adicional, proporcionada por la interacción de otras moléculas, llamadas moléculas accesorias o co-receptoras, presentes en la superficie de los linfocitos T, con sus contra-receptores sobre la APC [50].

El reclutamiento del TCR y de las moléculas accesorias da inicio a eventos de señalización intracelular que permiten activar, inactivar o eliminar a los linfocitos T, dependiendo entre otras cosas de la magnitud y duración de dichas señales, las cuales a su vez dependen de las distintas afinidades con las que todas estas moléculas interactúan con sus ligandos. Las señales producidas son controladas por reguladores positivos y negativos cuya actividad orquestada incide sobre la generación de las diversas respuestas celulares. Así mismo, el estado de diferenciación de las células T (vírgenes o de memoria) y la disponibilidad, en la cercanía de las células, de factores solubles (citocinas y quimiocinas) proporcionan información precisa acerca del entorno físico e influyen sobre la naturaleza de la respuesta desencadenada.

Durante los primeros minutos de contacto con la APC, el linfocito T hace uso de las moléculas accesorias o co-estimuladoras para establecer los primeros contactos y explorar la superficie de la APC [56, 179]. De una manera general, se piensa que la naturaleza de estas primeras interacciones define en gran medida la respuesta de los linfocitos T. Sin embargo, la naturaleza misma y la importancia de estas primeras señales ha sido poco explorada. En el presente trabajo se evaluó la participación de la molécula accesorias CD43 en la activación de linfocitos T. Esta molécula consta de un rígido

dominio extracelular que se extiende hasta 45 nm de la superficie celular, por lo que, desde un punto de vista topográfico, es considerada como una de las moléculas que sobresale más de la superficie celular de los linfocitos T [180]. Esto, aunado al hecho de que es la molécula más abundante de la superficie de los linfocitos T, sugiere que CD43 pudiera ser una de las primeras moléculas en regular los contactos entre el linfocito T y las APCs [181]. En linfocitos T, CD43 genera señales intracelulares, a través de su porción intracitoplásmica, independientemente del TCR, [124, 127-129] [42] [123, 156, 182], aunque también funciona como molécula co-estimuladora del TCR, induciendo una mayor proliferación celular [96]. En respuesta a las señales del TCR, CD43 se relocaliza hacia el polo opuesto de la SI en los conjugados de linfocitos T y APCs, formando junto con CD44, ICAM-1 e ICAM-3 lo que ha sido denominado como el “polo distal de señalización”, cuyas funciones aún no han sido dilucidadas [59].

Consideramos la posibilidad de que la secuencia con la que las moléculas de la superficie de los linfocitos T interactúen con sus respectivos contra-receptores repercuta sobre a calidad y tipo de la respuesta, por lo que evaluamos si las señales intracelulares y las respuestas de los linfocitos T varía en función del orden de los estímulos, siendo las moléculas protagonistas CD43 y el TCR (*artículos a y b, y datos no publicados*). Así mismo, profundizamos el conocimiento de las vías de señalización de CD43, y las funciones de CD43 como molécula accesoria, que señala independientemente del TCR (*artículos c, y d*).

Como mencionamos anteriormente, se piensa que la respuesta de los linfocitos T se da en base a la integración y duración de las señales generadas por la interacción de las distintas moléculas de superficie con sus respectivos contra-receptores en la APC. El cómputo final les permite a las células definir de manera precisa la naturaleza del antígeno y del medio ambiente. El reconocimiento específico de los péptidos antigénicos por el TCR así como las señales de las moléculas co-estimuladoras aumentan la concentración de intermediarios intracelulares. La MAP cinasa ERK, que con alrededor de 160 sustratos [183], constituye un punto central en la transmisión de señales de múltiples agentes reguladores de procesos celulares como proliferación, diferenciación y

progresión del ciclo celular. Existen datos que sugieren que diferencias en la cinética de acumulación y fosforilación de ERK inducen respuestas biológicas cualitativamente distintas [184, 185].

Nuestros resultados (*artículo a*) muestran que el orden en el que los linfocitos T perciben las señales de CD43 y del TCR desemboca en cinéticas e intensidades de fosforilación diferentes a nivel de ERK1 y ERK2. Cuando las señales de CD43 preceden o son simultáneas a las del TCR, se induce una intensa fosforilación de ERK1 y 2, inmediata y sostenida en el tiempo, mientras que si la estimulación con el TCR es previa a la de CD43, la fosforilación de ERK2 se retrasa ligeramente y tiene menor intensidad que la inducida con el tratamiento inverso. ERK1 y ERK2 presentan diferentes velocidades de acumulación dependiendo de la molécula a través de la cual la célula T esté siendo activada.

La actividad enzimática de ERK incide, entre otros, sobre las funciones de la PTP SHP-1. Reportes recientes, muestran una relación inversa entre la actividad de ERK y la asociación de la PTP SHP-1 a Lck y la subsecuente defosforilación de esta última en la tirosina 394. La fosforilación de la Serina 59 de Lck por ERK impide la asociación de SHP-1 a Lck, lo que a su vez permite que Lck fosforile más sus sustratos como Zap-70 y la cadena ζ [36]. El nivel de fosforilación de ERK así como la cinética de este evento son parte de un sistema de retroalimentación que, al regular la duración de la actividad de la cinasa Lck, controla, dependiendo de la calidad del péptido antigénico, la onda expansiva de las señales iniciadas por el TCR. La fosforilación sostenida de ERK inducida por la estimulación con CD43 antes o al mismo tiempo que el TCR previene de la asociación entre Lck y la SHP-1, impidiendo así la defosforilación de cadena ζ y Zap-70, prolongando las señales iniciadas por CD43 y el TCR. Estos resultados sugieren que la intensidad y duración de la activación de ERK, resultantes del orden con el que fueron estimulados CD43 y el TCR, son un elemento clave durante el proceso de toma de decisión de la célula T para discernir entre señales proliferativas o inductoras de anergia.

En células anérgicas, se ha descrito que Lck es degradada por la ligasa de ubiquitina Itch [186]. Por otra parte, Fyn fosforila a Itch en la Tyr 371, lo que resulta en la inhibición de la asociación de Itch con sus sustratos como es el caso de Jun, regulando positivamente las señales iniciadas. La modulación de la actividad por Itch a través de Fyn, sugiere que esta última regula positivamente la actividad de Lck. El entrecruzamiento del TCR en linfocitos T vírgenes CD4⁺ de ratones Fyn^{-/-}, altera profundamente las vías de señalización que se encuentran cascada abajo de las señales de Lck, tales como la fosforilación de Zap-70, PLC- γ 1, los flujos de calcio y la activación del factor transcripcional NFAT, siendo estas inhibidas [187, 188]. En cambio, la activación de estas mismas células a través del TCR y CD28 o TCR y CD4 genera una robusta respuesta por parte de las células. Adicionalmente, esta información también podría sugerir que cuando las señales del TCR no se combinan con las de moléculas accesorias, Fyn pudiese participar en el mecanismo de inducción de anergia. Por otra parte, reportes previos de nuestro laboratorio, muestran que el reclutamiento de CD43 induce su asociación con la cinasa Fyn y que las señales del TCR sumadas a las de CD43 eliminan dicha asociación [124]. Habría ahora que evaluar la fosforilación de la tirosina 371 de Itch en respuesta a las señales de CD43 y en respuesta a las señales del TCR y CD43. Es posible que, como en el caso de la regulación de la PTP SHP-1 mediada por la actividad de ERK y Lck, cuando las señales de CD43 anteceden o son simultáneas a las del TCR, la actividad de Fyn derivada de las señales de CD43 promueva la fosforilación de Itch, favoreciendo el flujo de las señales río abajo. El análisis de estos circuitos de retroalimentación en células T deficientes para Lck o Fyn (Lck^{-/-} o Fyn^{-/-}) nos permitiría dilucidar el posible papel de moléculas accesorias como CD43 en el proceso de activación de los linfocitos T.

Los miembros de la familia de Cbl participan en el control de la activación de los linfocitos T regulando negativamente el umbral de disparo de la respuesta celular [189]. De una manera general, la deficiencia de alguno de los miembros de esta familia favorece el desarrollo de autoinmunidad. Los resultados mostrados en la publicación *b* y *c* sugieren la existencia de un segundo mecanismo de regulación de las señales del TCR por parte de CD43. En este caso, cuando las señales de CD43 son percibida antes que las

del TCR, las moléculas de PKC θ activadas a través de CD43 (*publicación c*), fosforilan a Cbl en serinas, lo cual a su vez induce una disminución de la actividad de E3 ligasa de Cbl, e inciden sobre eventos de activación más tempranos, incrementando los niveles de las formas fosforilada de Zap-70 y la cadena ζ (*publicación b*) [182]. Si bien estos resultados proponen la existencia de dos mecanismos de regulación de las señales del TCR a través de CD43, uno durante eventos tempranos que involucra la actividad de PKC y Cbl y otro en eventos tardíos en el que participan ERK, Lck y SHP-1, esto no descartan la posibilidad de una conexión entre ambos mecanismos. Por una parte, se ha descrito la asociación entre Cbl y la PTP SHP-1 [190], por lo que sería posible una regulación de ambas moléculas. Cbl podría participar en la degradación de SHP-1 o bien, esta última pudiese regular la fosforilación en tirosinas de Cbl, eliminando el efecto negativo de Cbl. Sumado a esto, se sabe que Lck es un sustrato para la actividad de E3 ligasa de Cbl [191, 192]. Finalmente, el análisis de ratones Cbl^{-/-}, muestra una clara resistencia de los mismos para la inducción de anergia [192].

Otro miembro de la familia de Cbl, Cbl-b también participa en el control del umbral de activación de los linfocitos T, regulando los niveles, y por lo tanto la actividad, del factor intercambiador de nucleótidos de guanina Vav. Se ha reportado que la activación a través de CD3 y CD28 resulta en ubiquitinación y degradación de Cbl-b y que, en la sinápsis inmunológica formada en respuesta al reclutamiento antígeno-específico del TCR, Cbl-b colocaliza con CD3 y proteínas ubiquitinadas, sugiriendo que al contribuir a la desintegración de la sinápsis inmunológica, la actividad de E3 ligasa de Cbl-b es crítica para la regulación de las señales tempranas activadas en respuesta al TCR [38, 189, 192]. Nuestros resultados (*publicación b*), muestran que cuando las señales de CD43 anteceden las del TCR, se observa una mayor ubiquitinación de Cbl-b, que concuerda con la acumulación de señales positivas en el interior de la célula y una mayor respuesta. Por otra parte, observamos que cuando CD43 representa el segundo estímulo, las señales derivadas de CD43 parecen promover una redistribución más uniforme de las moléculas del TCR en la superficie celular, revirtiendo la concentración hacia un polo de la célula que deriva de las señales del TCR (*datos no publicados, CAPITULO II*). El estudio de la distribución de los Cbl y Cbl-b bajo nuestras condiciones de estimulación, nos permitiría

dilucidar su posible participación en la regulación de la distribución del TCR en respuesta a las señales de CD43.

La disponibilidad de IL-2 en el medio favorece la proliferación y diferenciación de las células. Nuestros resultados muestran que, dependiendo del orden en el que CD43 y el TCR sean entrecruzados en la superficie celular, los linfocitos T responden de manera diferencial a nivel de proliferación, secreción de IL-2 y rescate de anergia (*publicación a*). La región -180 del promotor de IL-2 contiene sitios de unión para los factores transcripcionales CREB-1 (cAMP-responsive element-binding protein 1) y CREM (cAMP-responsive element modulator) que inhiben la transcripción. En células anérgicas, se ha reportado la unión de estos factores de transcripción a esta región del promotor del gen de IL-2, lo cual concuerda con la baja producción de IL-2 que caracteriza a estas células [193]. Por otra parte, se sabe que en células anérgicas los niveles de AMPc se elevan. La expresión de CTLA-4 también se ve favorecida por incrementos en los niveles de AMPc, que al aumentar regulan positivamente sitios del promotor de CTLA-4, promoviendo la síntesis de la proteína [194, 195]. De acuerdo a nuestros resultados, el orden de estimulación de los linfocitos T a través de CD43 y el TCR genera respuestas diferentes a nivel de proliferación y anergia. En conjunto, estos datos sugieren que la regulación de los niveles de AMPc representan un punto clave en la generación de anergia. Un estudio más detallado de la regulación de los niveles de AMPc, de la actividad factores transcripcionales como CREM y CREB-1, así como de proteínas que regulan la topografía del DNA y la accesibilidad de este a factores transcripcionales en respuesta a nuestros diferentes protocolos de activación, proporcionaría información más precisa acerca de los eventos que preceden a la generación de diversidad en las respuestas celulares, y de la importancia del orden con el que son percibidos los diferentes estímulos.

Cuando los linfocitos T perciben las señales de CD43 antes o al mismo tiempo que las del TCR producen una compleja mezcla de citocinas implicadas en proliferación, prevención de anergia, maduración y diferenciación, así como de quimiocinas pro-inflamatorias (*publicación a*). Esto concuerda con reportes recientes donde se evaluaron

los niveles de expresión de genes que participan en la regulación de la respuesta inmune como resultado de las señales de CD43, comparando con una estimulación a través de CD3/CD28. Los experimentos mostraron que las señales proporcionadas por CD43 son suficientes para promover la transcripción de genes que codifican para moléculas pro-inflamatorias, sin necesidad de un co-estímulo [165]. A pesar de que nuestras condiciones experimentales son comparables a las de este estudio, nosotros encontramos que las señales de CD43 no son suficientes para que se inicie la traducción de estos genes pero que la integración de las señales de CD43 con las del TCR permite que se alcance el umbral de señalización necesario para promover la traducción de los mRNAs sintetizados. Interesantemente, el análisis de las quimiocinas y citocinas que se producen carga la balanza hacia un perfil pro-inflamatorio, tipo Th1. *In vivo*, la respuesta de ratones CD43^{-/-} a la infección con el virus de coriomeningitis (LCMV) se caracteriza por un reclutamiento pobre de linfocitos T CD8⁺ hacia el sitio de infección, lo que a su vez podría reflejar una deficiencia de citocinas quimioatrayentes en dicho proceso [150].

CD28 es la molécula co-estimuladora mejor estudiada [196] y se sabe que las señales de CD43 pueden compensar las funciones de CD28 en ratones CD28^{-/-} deficientes [96]. A diferencia de lo observado con el binomio CD43/TCR, los experimentos que realizamos a lo largo de este trabajo mostraron que el orden en el que la célula percibe las señales proporcionadas por CD28 y el TCR no afecta la respuesta y que en todos los casos las células proliferaron. Esto sugiere que las señales co-estimuladoras generadas por CD43 y CD28 están mediadas por diferentes mecanismos, permitiendo una fina regulación de las respuestas celulares (*publicación a*). El análisis de diferentes respuestas, así como de las vías de señalización reclutadas por la estimulación a través de CD28 y el TCR, siguiendo diferentes escenarios de activación, nos permitirían dilucidar si el mecanismo propuesto para el binomio CD43-TCR en el que el orden de estimulación parece ser importante, representa un punto de control para las moléculas accesorias con respecto al TCR o es específico para la conversación cruzada entre CD43 y el TCR.

Los contactos intercelulares son indispensables en la generación de una respuesta inmune eficiente y los procesos de adhesión celular son parte inherente de estos eventos.

Además de funcionar como una molécula accesoria que modula las funciones del TCR, CD43 ha sido implicada en procesos de adhesión celular, regulando la interacción de células linfoides con otras células. Los resultados obtenidos con células transfectadas con el gene humano de CD43 o células deficientes en la expresión de CD43 (CD43^{-/-}) sugirieron que la carga negativa conferida por el alto contenido en ácido siálico de CD43 proporciona a la célula fuerzas repulsivas que contribuyen a regular negativamente la adhesión de los linfocitos T con células blanco o APCs [121, 197]. Sin embargo, esto se contrapone con una serie de evidencias experimentales que involucran a CD43 en promover la adhesión entre células. Esto último podría lograrse de dos maneras totalmente distintas: 1) la relocalización de CD43 a regiones distantes del punto de contacto entre dos células removería la carga negativa proporcionada por los altos niveles de ácido siálico presentes en CD43, y permitiría que moléculas pro-adhesivas fidedignas tales como la integrinas realicen las funciones adhesivas y 2) la relocalización de CD43 al punto de contacto entre las células, lo cual pone a esta molécula en el centro de la actividad molecular encargada de llevar a cabo los contactos celulares. Ambas posibilidades han sido reportadas [155, 159, 198, 199].

Entre los resultados que presentamos en este trabajo, mostramos que CD43 induce agregación celular y que se encuentra en el punto de contacto entre las células, lo que sugiere que participa directamente en la adhesión, probablemente a través de la interacción con alguno de sus ligandos (*publicación d*). El hecho de que recientemente se haya demostrado que la presencia de moléculas de CD43 en el c-SMAC, resultante de la delección de la región intracitoplásmica de CD43, a través de la cual la proteína se une a las ERMs y que es responsable de la redistribución de CD43 sobre la superficie de los linfocitos T, no altera la formación de SI estables, apoya nuestros resultados y sugiere que CD43 no solo no representa una barrera negativa para la interacciones linfocito T-APC, sino que posiblemente las señales generadas a partir de la estimulación a través de esta molécula repercutan sobre la generación de respuestas diferentes por parte de los linfocitos T [58] [200]. Desde el punto de vista molecular, encontramos que el proceso de agregación de linfocitos T inducido por CD43 requiere de las cinasas de la familia Src, de la familia SYK/ZAP70, PLC γ 2, varios miembros de la familia de PKC, PI3K, ERK1-2

y p38, así como de la reorganización del citoesqueleto de actina (*publicación d*).

Las interacciones entre los linfocitos T las APCs requieren de la participación de moléculas pro-adhesivas, entre las que se incluyen las integrinas. Entre estas, las integrinas $\beta 2$ desempeñan un papel preponderante en la adhesión y activación celular. Estos receptores de membrana se unen a moléculas de adhesión intercelular (ICAM) y a proteínas solubles involucradas en procesos inflamatorios. Las integrinas no se encuentran en su conformación activa en condiciones basales y requieren de activarse para tener un efecto pro-adhesivo sobre la superficie celular [175]. La conformación activa de las integrinas se adquiere cuando las células son estimuladas. A la fecha, se han descrito cuatro integrinas $\beta 2$, CD11a/CD18 (LFA-1, $\alpha 1\beta 2$), CD11b/CD18 (Mac-1, $\alpha_M\beta 2$), CD11c/CD18 (p150-95, $\alpha_X\beta 2$) y CD11d/CD18 ($\alpha_D\beta 2$). La trascendencia de estas moléculas se evidenció con el hecho de que los individuos con defectos en la expresión de CD11/CD18 funcional debido a mutaciones en $\beta 2$ (CD18), desarrollan LAD (leukocyte adhesion deficiency syndrome type I), que es un síndrome caracterizado por infecciones recurrentes, en el que los individuos afectados presentan múltiples alteraciones a nivel leucocitario, que derivan de defectos en el funcionamiento de las integrinas tipo $\beta 2$ [176, 177]. El papel modulador de CD43 en la adhesión de los linfocitos T [110, 159, 161] y datos preliminares presentados en este trabajo (*CAPITULO II*), sugieren la regulación de la actividad de las integrina $\beta 1$ y $\beta 2$, y en particular LFA-1, como resultado de la estimulación con CD43 y el TCR, mostrando una mayor activación de las mismas en los casos en los que los linfocitos T son estimulados antes o simultáneamente con CD43 y el TCR. Estos resultados, junto con los que hemos presentado en otras secciones de este trabajo, apoyan la idea que CD43, al proporcionar la primeras señales de activación, pone listas las condiciones para que, si el TCR encuentra efectivamente a su antígeno en la superficie de la APC, el linfocito T pueda establecer contactos adhesivos más estables y más rápidamente. Una visión más precisa de la participación de CD43 como molécula responsable de empezar a preparar al linfocito T al eventual encuentro con el Ag en la superficie de una APC, y promover las condiciones para que se efectúe un contacto eficiente entre ambas células podría

determinarse mediante el estudio de la cinética de formación de SI estables de linfocitos T estimulados previamente a través de CD43.

En conjunto, nuestros resultados destacan el papel de CD43 como molécula accesoria en linfocitos T, que genera señales independientes del TCR y participa en la adhesión intercelular, y que funciona también como una molécula co-estimuladora de las señales del TCR. Nuestros resultados ponen en relieve que la secuencia con la que se perciben las señales del medio circundante constituye un mecanismo adicional por medio del cual los linfocitos T definen la ruta de diferenciación que van a tomar. En el caso de CD43, las señales que se generan a través de esta molécula contribuyen a bajar el umbral de activación de las células.

REFERENCIAS

1. Nathan, C., *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 173-82.
2. Cabral, G.A. and A. Staab, *Effects on the immune system*. Handb Exp Pharmacol, 2005(168): p. 385-423.
3. Lanzavecchia, A., *Dendritic cell maturation and generation of immune responses*. Haematologica, 1999. **84 Suppl EHA-4**: p. 23-5.
4. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells*. Science, 2000. **290**(5489): p. 92-7.
5. Germain, R.N., *Imaging dynamic interactions in immune responses*. Semin Immunol, 2005. **17**(6): p. 385-6.
6. Agnello, D., et al., *Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights*. J Clin Immunol, 2003. **23**(3): p. 147-61.
7. Romagnani, S., *The Th1/Th2 paradigm*. Immunol Today, 1997. **18**(6): p. 263-6.
8. Rooney, J.W., et al., *A common factor regulates both Th1- and Th2-specific cytokine gene expression*. Embo J, 1994. **13**(3): p. 625-33.
9. Brekelmans, P. and W. van Ewijk, *Phenotypic characterization of murine thymic microenvironments*. Semin Immunol, 1990. **2**(1): p. 13-24.
10. Cory, S., *Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 513-43.
11. Appleman, L.J. and V.A. Boussiotis, *T cell anergy and costimulation*. Immunol Rev, 2003. **192**: p. 161-80.
12. Lamb, J.R. and N. Green, *Analysis of the antigen specificity of influenza haemagglutinin-immune human T lymphocyte clones: identification of an immunodominant region for T cells*. Immunology, 1983. **50**(4): p. 659-66.
13. Beverly, B., et al., *Reversal of in vitro T cell clonal anergy by IL-2 stimulation*. Int Immunol, 1992. **4**(6): p. 661-71.
14. Greenwald, R.J., et al., *CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo*. Immunity, 2001. **14**(2): p. 145-55.
15. Quill, H., et al., *Optimization of antigen presentation to T cell hybridomas by purified Ia molecules in planar membranes. Ia molecule polymorphism determines the antigenic fine specificity of the response to cytochrome c peptides*. J Immunol Methods, 1987. **98**(1): p. 29-41.
16. Kuhns, M.S., M.M. Davis, and K.C. Garcia, *Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 133-9.
17. Germain, R.N. and I. Stefanova, *The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 467-522.
18. Nel, A.E., *T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **109**(5): p. 758-70.
19. Samelson, L.E., *Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 371-94.

20. Avruch, J., et al., *Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade*. Recent Prog Horm Res, 2001. **56**: p. 127-55.
21. Reynolds, L.F., et al., *Vav1 transduces T cell receptor signals to the activation of phospholipase C-gamma1 via phosphoinositide 3-kinase-dependent and -independent pathways*. J Exp Med, 2002. **195**(9): p. 1103-14.
22. Gardner, P., *Calcium and T lymphocyte activation*. Cell, 1989. **59**(1): p. 15-20.
23. Cannons, J.L. and P.L. Schwartzberg, *Fine-tuning lymphocyte regulation: what's new with tyrosine kinases and phosphatases?* Curr Opin Immunol, 2004. **16**(3): p. 296-303.
24. Veillette, A., S. Latour, and D. Davidson, *Negative regulation of immunoreceptor signaling*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 669-707.
25. Shaw, A. and M.L. Thomas, *Coordinate interactions of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T-cell receptor-mediated signalling*. Curr Opin Cell Biol, 1991. **3**(5): p. 862-8.
26. Mustelin, T., et al., *Role of protein tyrosine phosphatases in T cell activation*. Immunol Rev, 2003. **191**: p. 139-47.
27. Mustelin, T. and K. Tasken, *Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases*. Biochem J, 2003. **371**(Pt 1): p. 15-27.
28. Poole, A.W. and M.L. Jones, *A SHPing tale: perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail*. Cell Signal, 2005. **17**(11): p. 1323-32.
29. Wu, D.W., et al., *SH2-Containing protein tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) association with Jak2 in UT-7/Epo cells*. Blood Cells Mol Dis, 2000. **26**(1): p. 15-24.
30. Henshall, T.L., et al., *Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2, are required for platelet endothelial cell adhesion molecule-1/CD31-mediated inhibitory signaling*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3098-106.
31. Stebbins, C.C., et al., *Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(17): p. 6291-9.
32. Songyang, Z., et al., *SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences*. Cell, 1993. **72**(5): p. 767-78.
33. Gervais, F.G., et al., *The SH2 domain is required for stable phosphorylation of p56lck at tyrosine 505, the negative regulatory site*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(11): p. 7112-21.
34. Gervais, F.G. and A. Veillette, *The unique amino-terminal domain of p56lck regulates interactions with tyrosine protein phosphatases in T lymphocytes*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2393-401.
35. Chiang, G.G. and B.M. Sefton, *Specific dephosphorylation of the Lck tyrosine protein kinase at Tyr-394 by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase*. J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 23173-8.
36. Stefanova, I., et al., *TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 248-54.

37. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 621-63.
38. Thien, C.B. and W.Y. Langdon, *Negative regulation of PTK signalling by Cbl proteins*. *Growth Factors*, 2005. **23**(2): p. 161-7.
39. Huang, J.Y., et al., *Differential interaction of Cbl with Grb2 and CrkL in CD2-mediated NK cell activation*. *Mol Immunol*, 2000. **37**(17): p. 1057-65.
40. Liu, Y.C. and H. Gu, *Cbl and Cbl-b in T-cell regulation*. *Trends Immunol*, 2002. **23**(3): p. 140-3.
41. Clements, J.L. and G.A. Koretzky, *Recent developments in lymphocyte activation: linking kinases to downstream signaling events*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(7): p. 925-9.
42. Pedraza-Alva, G., et al., *Regulation of Cbl molecular interactions by the co-receptor molecule CD43 in human T cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(1): p. 729-37.
43. Wang, H.Y., et al., *Cbl promotes ubiquitination of the T cell receptor zeta through an adaptor function of Zap-70*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(28): p. 26004-11.
44. Wang, L., et al., *Repression of c-Cbl leads to enhanced G-CSF Jak-STAT signaling without increased cell proliferation*. *Oncogene*, 2002. **21**(34): p. 5346-55.
45. Griffiths, E.K., et al., *Cbl-3-deficient mice exhibit normal epithelial development*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(21): p. 7708-18.
46. Sykulev, Y., et al., *Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response*. *Immunity*, 1996. **4**(6): p. 565-71.
47. Harding, C.V. and E.R. Unanue, *Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation*. *Nature*, 1990. **346**(6284): p. 574-6.
48. Rachmilewitz, J. and A. Lanzavecchia, *A temporal and spatial summation model for T-cell activation: signal integration and antigen decoding*. *Trends Immunol*, 2002. **23**(12): p. 592-5.
49. Jenkins, M.K., et al., *T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state*. *Immunol Rev*, 1987. **95**: p. 113-35.
50. Kroczyk, R.A., H.W. Mages, and A. Hutloff, *Emerging paradigms of T-cell co-stimulation*. *Curr Opin Immunol*, 2004. **16**(3): p. 321-7.
51. Kupfer, A., G. Dennert, and S.J. Singer, *Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(23): p. 7224-8.
52. Monks, C.R., et al., *Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells*. *Nature*, 1998. **395**(6697): p. 82-6.
53. Dustin, M.L. and J.A. Cooper, *The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(1): p. 23-9.
54. Huppa, J.B. and M.M. Davis, *T-cell-antigen recognition and the immunological synapse*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(12): p. 973-83.
55. Huppa, J.B., et al., *Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(8): p. 749-55.

56. Davis, M.M., et al., *Dynamics of cell surface molecules during T cell recognition*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 717-42.
57. Lin, J., M.J. Miller, and A.S. Shaw, *The c-SMAC: sorting it all out (or in)*. J Cell Biol, 2005. **170**(2): p. 177-82.
58. Allenspach, E.J., et al., *ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse*. Immunity, 2001. **15**(5): p. 739-50.
59. Delon, J., 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, 2001. **15**(5): p. 691-701.
60. Stowers, L., et al., *Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 5027-31.
61. Grakoui, A., et al., *The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation*. Science, 1999. **285**(5425): p. 221-7.
62. Lee, K.H., et al., *T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation*. Science, 2002. **295**(5559): p. 1539-42.
63. Wulfig, C., et al., *Interface accumulation of receptor/ligand couples in lymphocyte activation: methods, mechanisms, and significance*. Immunol Rev, 2002. **189**: p. 64-83.
64. Favier, B., et al., *Uncoupling between immunological synapse formation and functional outcome in human gamma delta T lymphocytes*. J Immunol, 2003. **171**(10): p. 5027-33.
65. Somersalo, K., et al., *Cytotoxic T lymphocytes form an antigen-independent ring junction*. J Clin Invest, 2004. **113**(1): p. 49-57.
66. Watts, T.H. and M.A. DeBenedette, *T cell co-stimulatory molecules other than CD28*. Curr Opin Immunol, 1999. **11**(3): p. 286-93.
67. Gravestein, L.A. and J. Borst, *Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system*. Semin Immunol, 1998. **10**(6): p. 423-34.
68. Weinberg, A.D., *OX40: targeted immunotherapy--implications for tempering autoimmunity and enhancing vaccines*. Trends Immunol, 2002. **23**(2): p. 102-9.
69. Weinberg, A.D. and R. Montler, *Modulation of TNF receptor family members to inhibit autoimmune disease*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(2): p. 195-203.
70. Flynn, S., et al., *CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1*. J Exp Med, 1998. **188**(2): p. 297-304.
71. Higgins, L.M., et al., *Regulation of T cell activation in vitro and in vivo by targeting the OX40-OX40 ligand interaction: amelioration of ongoing inflammatory bowel disease with an OX40-IgG fusion protein, but not with an OX40 ligand-IgG fusion protein*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 486-93.
72. DeBenedette, M.A., et al., *Costimulation of CD28- T lymphocytes by 4-1BB ligand*. J Immunol, 1997. **158**(2): p. 551-9.
73. DeBenedette, M.A., et al., *Analysis of 4-1BB ligand (4-1BBL)-deficient mice and of mice lacking both 4-1BBL and CD28 reveals a role for 4-1BBL in skin*

- allograft rejection and in the cytotoxic T cell response to influenza virus.* J Immunol, 1999. **163**(9): p. 4833-41.
74. Springer, T.A., *Adhesion receptors of the immune system.* Nature, 1990. **346**(6283): p. 425-34.
75. Bank, I., et al., *Lymphocytes expressing alpha1beta1 integrin (very late antigen-1) in peripheral blood of patients with arthritis are a subset of CD45RO(+) T-cells primed for rapid adhesion to collagen IV.* Clin Immunol, 2002. **105**(3): p. 247-58.
76. Ben-Horin, S. and I. Bank, *The role of very late antigen-1 in immune-mediated inflammation.* Clin Immunol, 2004. **113**(2): p. 119-29.
77. Hahn, W.C., et al., *A distinct cytoplasmic domain of CD2 regulates ligand avidity and T-cell responsiveness to antigen.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(15): p. 7179-83.
78. Davis, S.J. and P.A. van der Merwe, *CD2: an exception to the immunoglobulin superfamily concept?* Science, 1996. **273**(5279): p. 1241-2.
79. Veillette, A. and S. Latour, *The SLAM family of immune-cell receptors.* Curr Opin Immunol, 2003. **15**(3): p. 277-85.
80. Veillette, A., M.E. Cruz-Munoz, and M.C. Zhong, *SLAM family receptors and SAP-related adaptors: matters arising.* Trends Immunol, 2006. **27**(5): p. 228-34.
81. Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone, *CD28/B7 system of T cell costimulation.* Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 233-58.
82. Keir, M.E. and A.H. Sharpe, *The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity.* Immunol Rev, 2005. **204**: p. 128-43.
83. Collins, A.V., et al., *The interaction properties of costimulatory molecules revisited.* Immunity, 2002. **17**(2): p. 201-10.
84. Wang, S. and L. Chen, *T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family.* Cell Mol Immunol, 2004. **1**(1): p. 37-42.
85. Blank, C., T.F. Gajewski, and A. Mackensen, *Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy.* Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(4): p. 307-14.
86. Tuosto, L. and O. Acuto, *CD28 affects the earliest signaling events generated by TCR engagement.* Eur J Immunol, 1998. **28**(7): p. 2131-42.
87. Hutchcroft, J.E. and B.E. Bierer, *Activation-dependent phosphorylation of the T-lymphocyte surface receptor CD28 and associated proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(8): p. 3260-4.
88. Raab, M., et al., *p56Lck and p59Fyn regulate CD28 binding to phosphatidylinositol 3-kinase, growth factor receptor-bound protein GRB-2, and T cell-specific protein-tyrosine kinase ITK: implications for T-cell costimulation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(19): p. 8891-5.
89. Pages, F., et al., *Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling.* Nature, 1994. **369**(6478): p. 327-9.
90. Schneider, H., et al., *T cell antigen CD28 binds to the GRB-2/SOS complex, regulators of p21ras.* Eur J Immunol, 1995. **25**(4): p. 1044-50.

91. Nunes, J.A., et al., *CD28 signal transduction pathways. A comparison of B7-1 and B7-2 regulation of the map kinases: ERK2 and Jun kinases*. Mol Immunol, 1996. **33**(1): p. 63-70.
92. August, A. and B. Dupont, *Activation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK/MAP kinase) following CD28 cross-linking: activation in cells lacking p56lck*. Tissue Antigens, 1995. **46**(3 (Pt 1)): p. 155-62.
93. Cantley, L.C., *The phosphoinositide 3-kinase pathway*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1655-7.
94. June, C.H., et al., *The B7 and CD28 receptor families*. Immunol Today, 1994. **15**(7): p. 321-31.
95. Shahinian, A., et al., *Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice*. Science, 1993. **261**(5121): p. 609-12.
96. Sperling, A.I., et al., *CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28*. J Exp Med, 1995. **182**(1): p. 139-46.
97. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *How does the immune system distinguish self from nonself?* Semin Immunol, 2000. **12**(3): p. 185-8; discussion 257-344.
98. Cyster, J.G., 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, 1991. **10**(4): p. 893-902.
99. Piller, V., F. Piller, and M. Fukuda, *Phosphorylation of the major leukocyte surface sialoglycoprotein, leukosialin, is increased by phorbol 12-myristate 13-acetate*. J Biol Chem, 1989. **264**(31): p. 18824-31.
100. Parkman, R., et al., *Surface protein abnormalities in lymphocytes and platelets from patients with Wiskott-Aldrich syndrome*. Lancet, 1981. **2**(8260-61): p. 1387-9.
101. Giordanengo, V., et al., *Autoantibodies directed against CD43 molecules with an altered glycosylation status on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected CEM cells are found in all HIV-1+ individuals*. Blood, 1995. **86**(6): p. 2302-11.
102. Gallego, M.D., et al., *Altered expression of CD43-hexasaccharide isoform on peripheral T lymphocytes from HIV-infected individuals*. Aids, 2001. **15**(4): p. 477-81.
103. Ardman, B., et al., *Human immunodeficiency virus type 1-infected individuals make autoantibodies that bind to CD43 on normal thymic lymphocytes*. J Exp Med, 1990. **172**(4): p. 1151-8.
104. Shelley, C.S., et al., *Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2819-23.
105. Pallant, A., et al., *Characterization of cDNAs encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(4): p. 1328-32.
106. Kudo, S. and M. Fukuda, *Tissue-specific transcriptional regulation of human leukosialin (CD43) gene is achieved by DNA methylation*. J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 13298-302.
107. Shelley, C.S., N. Da Silva, and J.M. Teodoridis, *During U937 monocytic differentiation repression of the CD43 gene promoter is mediated by the single-*

- stranded DNA binding protein Pur alpha*. Br J Haematol, 2001. **115**(1): p. 159-66.
108. Da Silva, N., A. Bharti, and C.S. Shelley, *hnRNP-K and Pur(alpha) act together to repress the transcriptional activity of the CD43 gene promoter*. Blood, 2002. **100**(10): p. 3536-44.
 109. Rosenstein, Y., et al., *CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1*. Nature, 1991. **354**(6350): p. 233-5.
 110. Sanchez-Mateos, P., et al., *Regulatory role of CD43 leukosialin on integrin-mediated T-cell adhesion to endothelial and extracellular matrix ligands and its polar redistribution to a cellular uropod*. Blood, 1995. **86**(6): p. 2228-39.
 111. Baum, L.G., et al., *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, 1995. **181**(3): p. 877-87.
 112. Sprent, J. and S.R. Webb, *Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(2): p. 196-205.
 113. Stockl, J., et al., *Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation*. J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 1769-79.
 114. Nathan, C., et al., *Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43 (sialophorin, leukosialin)*. J Cell Biol, 1993. **122**(1): p. 243-56.
 115. Abramson, J.S. and H.R. Hudnor, *Role of the sialophorin (CD43) receptor in mediating influenza A virus-induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction*. Blood, 1995. **85**(6): p. 1615-9.
 116. van den Berg, T.K., et al., *Cutting edge: CD43 functions as a T cell counterreceptor for the macrophage adhesion receptor sialoadhesin (Siglec-1)*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3637-40.
 117. Fratazzi, C., et al., *A macrophage invasion mechanism for mycobacteria implicating the extracellular domain of CD43*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 183-92.
 118. Todeschini, A.R., et al., *Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal trans-sialidase: involvement of CD43 signaling*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 5192-8.
 119. Ellies, L.G., et al., *The CD43 130-kD peripheral T-cell activation antigen is downregulated in thymic positive selection*. Blood, 1996. **88**(5): p. 1725-32.
 120. Manjunath, N., et al., *Targeted disruption of CD43 gene enhances T lymphocyte adhesion*. J Immunol, 1993. **151**(3): p. 1528-34.
 121. Manjunath, N., et al., *Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43*. Nature, 1995. **377**(6549): p. 535-8.
 122. Serrador, J.M., et al., *CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts*. Blood, 1998. **91**(12): p. 4632-44.
 123. Cruz-Munoz, M.E., et al., *The CD43 coreceptor molecule recruits the zeta-chain as part of its signaling pathway*. J Immunol, 2003. **171**(4): p. 1901-8.
 124. Pedraza-Alva, G., et al., *CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27564-8.

125. Alvarado, M., et al., *MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation*. Eur J Immunol, 1995. **25**(4): p. 1051-5.
126. Anzai, N., et al., *Modulation of integrin function in hematopoietic progenitor cells by CD43 engagement: possible involvement of protein tyrosine kinase and phospholipase C-gamma*. Blood, 1999. **93**(10): p. 3317-26.
127. Pedraza-Alva, G., et al., *T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14218-24.
128. Santana, M.A., et al., *CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NFkappa B transcription factors in human T lymphocytes*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 31460-8.
129. Park, J.K., et al., *Enhancement of T-cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott-Aldrich syndrome*. Nature, 1991. **350**(6320): p. 706-9.
130. Hirano, K., et al., *A multifunctional shuttling protein nucleolin is a macrophage receptor for apoptotic cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39284-93.
131. Nusbaum, P., et al., *Distinct signaling pathways are involved in leukosialin (CD43) down-regulation, membrane blebbing, and phospholipid scrambling during neutrophil apoptosis*. J Biol Chem, 2005. **280**(7): p. 5843-53.
132. Remold-O'Donnell, E. and D. Parent, *Specific sensitivity of CD43 to neutrophil elastase*. Blood, 1995. **86**(6): p. 2395-402.
133. Hartshorn, K.L., et al., *Neutrophil deactivation by influenza A virus. Role of hemagglutinin binding to specific sialic acid-bearing cellular proteins*. J Immunol, 1995. **154**(8): p. 3952-60.
134. Seveau, S., et al., *Leukosialin (CD43, sialophorin) redistribution in uropods of polarized neutrophils is induced by CD43 cross-linking by antibodies, by colchicine or by chemotactic peptides*. J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 13): p. 1465-75.
135. Seveau, S., et al., *Neutrophil polarity and locomotion are associated with surface redistribution of leukosialin (CD43), an antiadhesive membrane molecule*. Blood, 2000. **95**(8): p. 2462-70.
136. Seveau, S., et al., *Cytoskeleton-dependent membrane domain segregation during neutrophil polarization*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(11): p. 3550-62.
137. Zadeh, A.D. and H. Keller, *Chemotactically directed redistribution of alpha-actinin precedes morphological polarization and reversal of polarity in human polymorphonuclear leucocytes (PMNs)*. Eur J Cell Biol, 2003. **82**(2): p. 93-6.
138. Campanero, M.R., et al., *Down-regulation by tumor necrosis factor-alpha of neutrophil cell surface expression of the sialophorin CD43 and the hyaluronate receptor CD44 through a proteolytic mechanism*. Eur J Immunol, 1991. **21**(12): p. 3045-8.
139. Lopez, S., et al., *Neutrophil expression of tumour necrosis factor receptors (TNF-R) and of activation markers (CD11b, CD43, CD63) in rheumatoid arthritis*. Clin Exp Immunol, 1995. **101**(1): p. 25-32.
140. Remold-O'Donnell, E. and D. Parent, *Downregulation of neutrophil CD43 by opsonized zymosan*. Blood, 1995. **85**(2): p. 337-42.
141. Nusbaum, P., et al., *Early membrane events in polymorphonuclear cell (PMN) apoptosis: membrane blebbing and vesicle release, CD43 and CD16 down-*

- regulation and phosphatidylserine externalization*. *Biochem Soc Trans*, 2004. **32**(Pt3): p. 477-9.
142. Nieto, M., et al., *Signaling through CD43 induces natural killer cell activation, chemokine release, and PYK-2 activation*. *Blood*, 1999. **94**(8): p. 2767-77.
 143. McCann, F.E., et al., *The size of the synaptic cleft and distinct distributions of filamentous actin, ezrin, CD43, and CD45 at activating and inhibitory human NK cell immune synapses*. *J Immunol*, 2003. **170**(6): p. 2862-70.
 144. Aguado, E., et al., *Functional expression of CD43 on human natural killer cells*. *J Leukoc Biol*, 1999. **66**(6): p. 923-9.
 145. Babina, M., et al., *Signal transduction via CD43 (leucosialin, sialophorin) and associated biological effects in human mast cell line (HMC-1)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **243**(1): p. 163-9.
 146. Weber, S., et al., *Monoclonal antibodies to leucosialin (CD43) induce homotypic aggregation of the human mast cell line HMC-1: characterization of leucosialin on HMC-1 cells*. *Immunology*, 1994. **82**(4): p. 638-44.
 147. Drew, E., et al., *CD34 and CD43 inhibit mast cell adhesion and are required for optimal mast cell reconstitution*. *Immunity*, 2005. **22**(1): p. 43-57.
 148. Babina, M., S. Weber, and B.M. Henz, *CD43 (leucosialin, sialophorin) expression is differentially regulated by retinoic acids*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(5): p. 1147-51.
 149. El-Ghmati, S.M., et al., *Haptoglobin interacts with the human mast cell line HMC-1 and inhibits its spontaneous proliferation*. *Scand J Immunol*, 2002. **55**(4): p. 352-8.
 150. Onami, T.M., et al., *Dynamic regulation of T cell immunity by CD43*. *J Immunol*, 2002. **168**(12): p. 6022-31.
 151. Barat, C. and 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*, 2002. **277**(32): p. 28714-24.
 152. Gluschankof, P., et al., *Cell membrane vesicles are a major contaminant of gradient-enriched human immunodeficiency virus type-1 preparations*. *Virology*, 1997. **230**(1): p. 125-33.
 153. Stockton, B.M., et al., *Negative regulation of T cell homing by CD43*. *Immunity*, 1998. **8**(3): p. 373-81.
 154. Woodman, R.C., et al., *The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice*. *J Exp Med*, 1998. **188**(11): p. 2181-6.
 155. Axelsson, B., et al., *Induction of aggregation and enhancement of proliferation and IL-2 secretion in human T cells by antibodies to CD43*. *J Immunol*, 1988. **141**(9): p. 2912-7.
 156. Layseca-Espinosa, E., et al., *T cell aggregation induced through CD43: intracellular signals and inhibition by the immunomodulatory drug leflunomide*. *J Leukoc Biol*, 2003. **74**(6): p. 1083-93.
 157. McEvoy, L.M., et al., *Anti-CD43 inhibits monocyte-endothelial adhesion in inflammation and atherogenesis*. *Blood*, 1997. **90**(9): p. 3587-94.
 158. McEvoy, L.M., et al., *Anti-CD43 inhibition of T cell homing*. *J Exp Med*, 1997. **185**(8): p. 1493-8.

159. de Smet, W., H. Walter, and L. van Hove, *A new CD43 monoclonal antibody induces homotypic aggregation of human leucocytes through a CD11a/CD18-dependent and -independent mechanism*. Immunology, 1993. **79**(1): p. 46-54.
160. Rosenkranz, A.R., et al., *Induction of neutrophil homotypic adhesion via sialophorin (CD43), a surface sialoglycoprotein restricted to haemopoietic cells*. Immunology, 1993. **80**(3): p. 431-8.
161. Johnson, G.G., et al., *Anti-CD43 monoclonal antibody L11 blocks migration of T cells to inflamed pancreatic islets and prevents development of diabetes in nonobese diabetic mice*. J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5678-85.
162. Revy, P., et al., *Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells*. Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 925-31.
163. Thurman, E.C., et al., *Regulation of in vitro and in vivo T cell activation by CD43*. Int Immunol, 1998. **10**(5): p. 691-701.
164. Bagriacik, E.U., et al., *CD43 potentiates CD3-induced proliferation of murine intestinal intraepithelial lymphocytes*. Immunol Cell Biol, 2001. **79**(3): p. 303-7.
165. Mattioli, I., et al., *Comparative analysis of T-cell costimulation and CD43 activation reveals novel signaling pathways and target genes*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3302-4.
166. Cermak, L., et al., *Molecular mechanisms involved in CD43-mediated apoptosis of TF-1 cells. Roles of transcription Daxx expression, and adhesion molecules*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 7955-61.
167. Brown, T.J., et al., *Characterization of a CD43/leukosialin-mediated pathway for inducing apoptosis in human T-lymphoblastoid cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27686-95.
168. Misawa, Y., et al., *CD43 expression in a B cell lymphoma, WEHI 231, reduces susceptibility to G1 arrest and extends survival in culture upon serum depletion*. Eur J Immunol, 1996. **26**(11): p. 2573-81.
169. Gulley, M.L., et al., *Identification of a murine pan-T cell antigen which is also expressed during the terminal phases of B cell differentiation*. J Immunol, 1988. **140**(11): p. 3751-7.
170. Hardy, R.R. and K. Hayakawa, *A developmental switch in B lymphopoiesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11550-4.
171. Dragone, L.L., et al., *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, 1995. **92**(2): p. 626-30.
172. Ostberg, J.R., et al., *Disregulated expression of CD43 (leukosialin, sialophorin) in the B cell lineage leads to immunodeficiency*. J Immunol, 1996. **157**(11): p. 4876-84.
173. Corinti, S., et al., *Cross-linking of membrane CD43 mediates dendritic cell maturation*. J Immunol, 1999. **162**(11): p. 6331-6.
174. Remold-O'Donnell, E., et al., *Purification and chemical composition of gpL115, the human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome*. J Biol Chem, 1986. **261**(16): p. 7526-30.
175. Gahmberg, C.G. and S. Fagerholm, *Activation of leukocyte beta2-integrins*. Vox Sang, 2002. **83 Suppl 1**: p. 355-8.

176. Gahmberg, C.G., et al., *Leukocyte adhesion--an integrated molecular process at the leukocyte plasma membrane*. Biosci Rep, 1999. **19**(4): p. 273-81.
177. Gahmberg, C.G., et al., *Leukocyte integrins and inflammation*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(6): p. 549-55.
178. Goda, S., et al., *Control of TCR-mediated activation of beta 1 integrins by the ZAP-70 tyrosine kinase interdomain B region and the linker for activation of T cells adapter protein*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5379-87.
179. Chambers, C.A., *The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited*. Trends Immunol, 2001. **22**(4): p. 217-23.
180. Remold-O'Donnell, E., D. Kenney, and F.S. Rosen, *Biosynthesis of human sialophorins and analysis of the polypeptide core*. Biochemistry, 1987. **26**(13): p. 3908-13.
181. Ostberg, J.R., R.K. Barth, and J.G. Frelinger, *The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43*. Immunol Today, 1998. **19**(12): p. 546-50.
182. Del Rio, R., et al., *PKCtheta; is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **325**(1): p. 133-43.
183. Yoon, S. and R. Seger, *The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions*. Growth Factors, 2006. **24**(1): p. 21-44.
184. Pages, G., et al., *Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1374-7.
185. Murphy, L.O., et al., *Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(8): p. 556-64.
186. Rao, N., et al., *The non-receptor tyrosine kinase Syk is a target of Cbl-mediated ubiquitylation upon B-cell receptor stimulation*. Embo J, 2001. **20**(24): p. 7085-95.
187. Yang, C., et al., *Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase itch via Fyn-mediated tyrosine phosphorylation*. Mol Cell, 2006. **21**(1): p. 135-41.
188. Gallagher, E., et al., *Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(6): p. 1717-22.
189. Ryan, P.E., et al., *Regulating the regulator: negative regulation of Cbl ubiquitin ligases*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(2): p. 79-88.
190. Luo, H., et al., *Cross-linking of EphB6 resulting in signal transduction and apoptosis in Jurkat cells*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1362-70.
191. Fusaki, N., et al., *Interaction between Sam68 and Src family tyrosine kinases, Fyn and Lck, in T cell receptor signaling*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6214-9.
192. Jeon, M.S., et al., *Essential role of the E3 ubiquitin ligase Cbl-b in T cell anergy induction*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 167-77.
193. Powell, J.D., et al., *The -180 site of the IL-2 promoter is the target of CREB/CREM binding in T cell anergy*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6631-9.
194. Vendetti, S., et al., *Cyclic adenosine 5'-monophosphate and calcium induce CD152 (CTLA-4) up-regulation in resting CD4+ T lymphocytes*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6231-5.

195. Brunner, M.C., et al., *CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation*. J Immunol, 1999. **162**(10): p. 5813-20.
196. Acuto, O. and F. Michel, *CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(12): p. 939-51.
197. Manjunath, N. and B. Ardman, *CD43 regulates tyrosine phosphorylation of a 93-kD protein in T lymphocytes*. Blood, 1995. **86**(11): p. 4194-8.
198. Wiken, M., et al., *Studies on the role of CD43 in human B-cell activation and differentiation*. Scand J Immunol, 1989. **29**(3): p. 353-61.
199. Youseffi-Etemad, R. and B. Axelsson, *Parallel pattern of expression of CD43 and of LFA-1 on the CD45RA+ (naive) and CD45RO+ (memory) subsets of human CD4+ and CD8+ cells. Correlation with the aggregative response of the cells to CD43 monoclonal antibodies*. Immunology, 1996. **87**(3): p. 439-46.
200. Cullinan, P., A.I. Sperling, and J.K. Burkhardt, *The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse*. Immunol Rev, 2002. **189**: p. 111-22.

APENDICE 1

Proteínas señalizadoras mencionadas en este trabajo

MOLECULA	TIPO DE MOLECULA	FUNCION
Cbl	Adaptadora y E3 ligasa	Regula negativamente las señales del TCR
Cdc42	GTPasa	Al activarse produce filopodios o prolongaciones de actina polimerizada dispuestas en una misma orientación
Crk-L	Proteína adaptadora	Regula la activación de las MAPK
ERK	MAP cinasa	Regula factores de transcripción
ERM	Ezrina-radixina-moesina	Promueven la adhesión de receptores de membrana con citoesqueleto de actina
Fyn	Cinasa de tirosinas	Miembro de la familia Src. Tiene un dominio SH3 y SH2, se asocia al complejo TCR-CD3
Galectina-1	Lectina	Participa en la selección de timocitos
Grb2	Proteína adaptadora	Tiene un dominio SH3 C-terminal y un SH2 central, se une a Shc y SOS y regula la vía de Ras
JUN	MAP cinasa	Regula factores de transcripción
Lck	Cinasa de tirosinas	Miembro de la familia Src, tiene un dominio SH3 y uno SH2. Se asocia con CD4 y CD8 entre otros
PI3k	Cinasa de lípidos	Contiene dos subunidades p110 (catalítica) y p85 (reguladora), p85 tiene un dominio SH3, un dominio rico en prolina y un dominio SH2
PKC#	Cinasa de proteínas	Fosforila en serinas y treoninas y traduce señales a partir de la degradación de PIP2 (fosfatidil inositol bi fosfato)
PLC 2	fosfolipasa	Catabolismo de fosfolípidos de membrana
p38	Cinasa de proteínas	Miembro de la familia de las MAPK
Ras	GTPasa	Hidroliza GTP. Activada por SOS, activa la vía de Raf-MAPK
Rac	GTPasa	Al activarse genera lamelopodios
Rho	GTPasa	Al activarse genera fibras de estrés
SHP-1	Fosfatasa de tirosinas	Regulador negativo de las señales del TCR
SLP-76		
SOS	Factor intercambiador de nucleotidos de guanina	Es GEF de Rac
Vav	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina	Es GEF de Raf
ZAP-70	Cinasa de tirosinas	Se asocia con los ITAMs de la cadena !

APENDICE 2

INHIBIDORES

COMPUESTO	EFEECTO	CONC. FINAL
U73122	Inhíbe PLC-#	2 μ M
Ro31822	Inhíbe PKC	10 μ M
H7	Inhíbe PKC	50 μ M
Go6976	Inhíbe PKC- α , β , γ	10-20 nM
Go6983	Inhíbe PKC α , β , γ , δ & ϵ	5, 10, 60 nM
Genisteína A	Inhíbe PTK	0.1 mM
Wortmanina	Inhíbe PI3K	0.1 μ M
Ly29402	Inhíbe PI3K	200 μ M
PD98059	Inhíbe MEK	50 μ M
PD169316	Inhíbe p38	10 μ M
SB202190	Inhíbe p38 β , p38	10 μ M
Citocalasina B	Inhíbe formación de microfilamentos	20 μ M
Herbimicina A	Inhíbe PTK	1 ng/ml
Ciclosporina A	Inhíbe calcineurina	0.5 ng/ml
KN62	Inhíbe calmodulina	1 μ M
H1004	Inhíbe calmodulina, PKA, PKG	20 μ M
H8	Inhíbe PKA	20 μ M
IBMX	Inhíbe PDE de GMPc	0.1 mM
PTK	Inhíbe PDE de AMPc	0.1 mM
Colchicina	Inhíbe la formación de microtúbulos	20 μ M
Toxina Pertusis	Cataliza ADP_ribosilación de G_i	0.1 ng/ μ l
Toxina cólera	Inhíbe actividad de GTPasa de G_s	0.2 ng/ μ l
8 Br-AMPC	Activa PKA	1 mM
Swainsonina	Bloquea N-glicosilación	5 μ g/ml
Benzil- α -galnac	Bloquea O-glicosilación	20 μ M
Acido okadoico	Inhíbe protein fosfatasa A1 y A2	0.2 μ M
1-butanol	Inhíbe PDL	0.5 %
2-butanol	Inhíbe PDL	0.5 %
Pi	Inhíbe canales de K	100 pM

ANEXO

TCR-Dependent Cell Response Is Modulated by the Timing of CD43 Engagement¹

Nora A. Fierro,*[†] Gustavo Pedraza-Alva,* and Yvonne Rosenstein^{2*}

Binding of Ag by the Ag receptor in combination with other stimuli provided by costimulatory receptors triggers the expansion and differentiation of T lymphocytes. However, it is unclear whether the time when costimulatory molecules interact with their counterreceptors with regards to Ag recognition leads to different T cell responses. Provided that the coreceptor molecule CD43 is a very abundant molecule evenly distributed on the membrane of T cell surface protruding 45 nm from the cell, we hypothesized that CD43 is one of the first molecules that interacts with the APC and thus modulates TCR activation. We show that engaging CD43 before or simultaneously with the TCR inhibited Lck-Src homology 2 domain containing phosphatase-1 interaction, preventing the onset of a negative feedback loop on TCR signals, favoring high levels of IL-2, cell proliferation, and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. In contrast, the intracellular signals resulting of engaging the TCR before CD43 were insufficient to induce IL-2 production and cell proliferation. Interestingly, when stimulated through the TCR and CD28, cells proliferated vigorously, independent of the order with which molecules were engaged. These results indicate that CD43 induces a signaling cascade that prolongs the duration of TCR signaling and support the temporal summation model for T cell activation. In addition to the strength and duration of intracellular signals, our data underscore temporality with which certain molecules are engaged as yet another mechanism to fine tune T cell signal quality, and ultimately immune function. *The Journal of Immunology*, 2006, 176: 7346–7353.

A specific immune response is initiated when T lymphocytes recognize Ag peptides through the interaction of the T cell Ag receptor complex (TCR), with processed peptides displayed by MHC molecules on APCs (1). Yet, TCR-mediated signals are not sufficient to induce T lymphocyte activation. While T cells stimulated through the TCR in the absence of costimulatory signals reach a state of functional unresponsiveness referred to as anergy (2), additional signals provided by the interaction of costimulatory receptors with their ligands on APCs promote cellular proliferation and gene expression (3–6). Most studies have shown efficient T cell activation by engaging simultaneously the TCR and costimulatory molecules; however, it is unclear whether the time when T cell costimulatory molecules interact with their counterreceptors with regards to Ag recognition leads to different biological responses.

It has been suggested that the outcome of a response likely depends on which contacts are first established between T cells and APCs as well as on the relative density and structure of the molecules that participate (7, 8). Based on the fact that the coreceptor molecule CD43 is a very abundant molecule evenly distributed on the membrane of naive T cells and that its elongated structure protrudes 45 nm from the cell surface (9), one could speculate that

CD43 is one of the first molecules that interacts with the APC and thus modulates TCR activation. In T lymphocytes, CD43 transduces multiple activating signals that, ultimately, induce gene expression and cell cycle progression (10–14). In addition, this coreceptor molecule has been found to provide intracellular signals that synergize with those of the TCR (15, 16). Although several independent studies have shown that TCR signaling leads to redistribution of CD43 outside of the mature immunological synapse, and that relocation of CD43 is required for optimal T cell activation (17, 18), none of these studies have addressed the role temporality of coreceptor engagement plays in T cell activation. Data reported herein support the hypothesis that timing of CD43 engagement differentially modulates TCR signaling. CD43 engagement before or simultaneous with TCR ligation resulted in sustained ERK phosphorylation, loss of Lck-Src homology 2 domain containing phosphatase 1 (SHP-1)³ association, and hence enhanced Zap70 and ζ -chain phosphorylation. These signals correlated with high levels of IL-2, cell proliferation, and secretion of several proinflammatory cytokines and chemokines. In contrast, the intracellular signals resulting of engaging the TCR before CD43 were insufficient to induce IL-2 production and cell proliferation. Interestingly, we found that when stimulated through the TCR and CD28, cells proliferated vigorously, independent of the order with which molecules were engaged. Thus, our results indicate that the time where specific coreceptor molecules are engaged during T cell activation modulates T cell response.

*Instituto de Biotecnología and [†]Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

Received for publication December 8, 2005. Accepted for publication March 24, 2006.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was partially funded by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), and the Dirección General de Apoyo al Personal Académico/Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico. N.A.F. is the recipient of a fellowship from CONACYT.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Yvonne Rosenstein, Instituto de Biotecnología/Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62270, Mexico. E-mail address: yvonne@ibt.unam.mx

Materials and Methods

Reagents

L10, a murine IgG1 mAb that recognizes human CD43 (19), and OKT3 (American Type Culture Collection; anti-CD3, IgG2a) were purified from ascites on protein A-Sepharose columns. The anti-CD28 and anti-CTLA-4 mAbs were from Ancell. Rabbit anti-mouse-IgG1 and -IgG2a were from Fisher Biotech. The anti- ζ , anti-pERK, anti-ERK2, anti-JNK, anti-Lck, and

³ Abbreviations used in this paper: SHP-1, Src homology 2 domain containing phosphatase 1; TPA, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate.

anti-SHP-1 were from Santa Cruz Biotechnology. The anti-phosphotyrosine 4G10 was from Upstate Biotechnology. Avidin-FITC was from Molecular Probes. Protein A-Sepharose was from Zymed Laboratories, and Ficoll-Hypaque, 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), and ionomycin were from Sigma-Aldrich. The ERK inhibitor PD98059 and the JNK inhibitor SP600125 were from Calbiochem.

Cell purification and cell culture

Peripheral blood T cells were isolated from healthy adult donors as described previously (11). The resultant purified cells were predominantly TCR⁺ (>90% OKT3⁺) and CD43⁺ (>95% L10⁺), as determined by FACS staining. Alternatively, T lymphocytes were purified by negative selection with magnetic beads (Miltenyi Biotec) (>98% OKT3⁺). Before experimentation, T cells were arrested for an additional 24 h in RPMI 1640 (HyClone) supplemented with 2% FCS.

T cell activation for biochemical assays

Purified T lymphocytes (2×10^7) were incubated in 0.5 ml of cold RPMI 1640 according to different protocols (all Abs were used at 4 μ g/ml).

L10 or OKT3. Cells were stimulated only with L10 or OKT3. Abs were added for 10 min at 4°C before addition of the isotype-specific secondary Ab (anti-IgG1 for L10 or anti-IgG2a for OKT3), and cells were activated at 37°C for the indicated periods.

L10-OKT3. Cells were stimulated first through CD43. L10 was added for 10 min at 4°C to the cell suspension, cross-linked with isotype-specific secondary Ab, following which cells were stimulated at 37°C for the indicated times. Cells were then washed, resuspended in RPMI 1640, and further stimulated with OKT3 cross-linked with isotype-specific secondary Ab for 5 min at 37°C.

OKT3-L10. When cells were first stimulated through the TCR, we followed the same protocol as described above, except that OKT3 was added as a first Ab and L10 provided the second stimulus.

L10 + OKT3. When cells were stimulated simultaneously through CD43 and the TCR, L10 and OKT3 were added at the same time, and cells were incubated for 10 min at 4°C, following which isotype-specific secondary Abs were added and cells were incubated at 37°C for the indicated periods of time.

Cell proliferation assays

A total of 2×10^4 T lymphocytes were prestimulated for 2 h (Ab (1 μ g/ml) was added for 10 min before addition of the isotype-specific secondary Ab (anti-IgG1 for L10 or anti-IgG2a for OKT3)), following which cells were washed to remove excess of the first Ab, and costimulatory signals were applied for 7 days before evaluating cell proliferation. To assess the ability of lymphocytes to respond to secondary stimulation, cells were washed with PBS, adjusted to 2×10^4 cells/well and arrested for 24 h in RPMI 1640 2% FCS before restimulation with OKT3 and anti-IgG2a for 5 days. Alternatively, cells were stimulated with OKT3 and anti-CD28 mAbs, following the same experimental protocols.

To evaluate cell proliferation, 100 μ l of a 0.5 mg/ml solution of MTT were added to each well. After 3 h of incubation at 37°C, 100 μ l of 20% SDS in 0.001 N HCl were added, and plates were incubated at room temperature for 18 h. Absorbance at 570 nm was determined with a microplate reader (Biotek Instruments). Cell numbers in each experimental well were determined based on a standard curve established with known cell numbers.

Cytokine production

For each of the stimulation protocols described above, cytokines present in the tissue-culture medium 48 h following the onset of the assay were detected by using a dot blot-based assay, according to the instructions of the manufacturer (Ray-Biotech). All membranes were treated simultaneously; densitometry analysis was performed with an Alpha-Innotech FluorChem Imaging system. For each membrane, individual background levels were subtracted, and differences were calculated based on levels found in cells treated with secondary Abs only.

Cell lysates, immunoprecipitation, and immunoblotting

Cells were lysed in 25 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.5 mM DTT, 20 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin, and 50 μ g/ml antipain for 30 min at 4°C. Protein A-precleared lysates from activated or nonactivated T cells (2×10^7 cellular equivalents) were immunoprecipitated as described previously (20). Briefly, lysates were incubated with the indicated Ab for 1 h at 4°C,

and immune complexes were harvested with protein A-Sepharose for 60 min on ice and then washed once with cold TNE-T (150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.5% (v/v) Triton X-100), twice with TNE (150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7.5), 5 mM EDTA), and once with H₂O. Cell lysates and immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad); membranes were blocked with 5% nonfat milk in Tris-buffered saline (10 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl), followed by incubation with the indicated Ab diluted in 0.05% Tween 20 (Bio-Rad). After three washes, membranes were exposed to the appropriate secondary Ab coupled to HRP (Biomedex); proteins were visualized by ECL (Amersham Biosciences), following the manufacturer's instructions.

FACS staining

Cells (1×10^6) resuspended in 100 μ l of PBS containing 2% FCS and 1% sodium azide (FACS buffer) were incubated with biotin-labeled anti-CTLA-4 for 30 min at 4°C. Cells were then washed by centrifugation at $300 \times g$ with FACS buffer, incubated with avidin coupled to FITC for 30 min at 4°C and washed as above, before resuspension in FACS buffer and fixation in 1% paraformaldehyde. Cells were analyzed with a FACSort with CellQuest software (BD Biosciences).

Results

The sequence of stimulation modifies the product: proliferation or anergy

CD43 has been shown to provide costimulatory signals for the TCR, increasing T cell proliferation and IL-2 production (Refs. 15 and 16, and Y. Rosenstein, unpublished data). However, little is known about the importance of the sequence with which these stimuli occur. Given its elongated structure that protrudes 45 nm away from the cell surface, we hypothesized that CD43 is one of the first molecules that interacts with an APC and thus modulates TCR activation. To test whether sensing one stimulus before the other resulted in different cellular responses, we evaluated the effect of ligating CD43 before (L10 – OKT3), simultaneously (L10 + OKT3) or after (OKT3 – L10) TCR engagement on cell proliferation. Interestingly, we found that preactivation with anti-CD43 for 2 h or simultaneous engagement of CD43 and the TCR enhanced proliferation (15-fold increase), but that in contrast, TCR engagement 2 h before CD43 costimulation resulted in deficient cellular proliferation. Independent engagement of CD43 or of the TCR on the surface of T lymphocytes did not result in a significant cellular proliferation, as compared with cells stimulated only with the secondary mAbs (Fig. 1A, upper panel).

Because TCR signals induce anergy when provided alone (6), we investigated whether the lack of proliferation we observed in cells stimulated through the TCR before CD43 ligation was a sign of anergy. We evaluated the ability of T lymphocytes activated as above to proliferate in response to a secondary stimulation with OKT3 for 5 days. When provided after TCR engagement, CD43-dependent signals were not sufficient to prevent the anergy-inducing signals of the TCR (Fig. 1A, lower panel). In contrast, cells triggered through CD43 before the TCR (L10 – OKT3) or through both molecules simultaneously (L10 + OKT3) proliferated vigorously in response to TCR restimulation (Fig. 1A, lower panel), suggesting that CD43 signals provided before or at the same time as TCR-mediated signals induce an effective cellular response. However, restimulation of the CD43-activated cells with OKT3 did not result in T cell proliferation, indicating that under these experimental conditions, the CD43-mediated signals are not sufficient to promote cell division (Fig. 1A, lower panel). As expected, cells stimulated through the TCR (OKT3) did not proliferate either in response to secondary stimulation (Fig. 1A, lower panel).

To assess whether cells stimulated through the TCR or CD43 alone, or through the TCR as a first stimulus would proliferate in response to a stronger secondary stimulus, cells were restimulated through TCR and CD28 engagement in parallel experiments. As

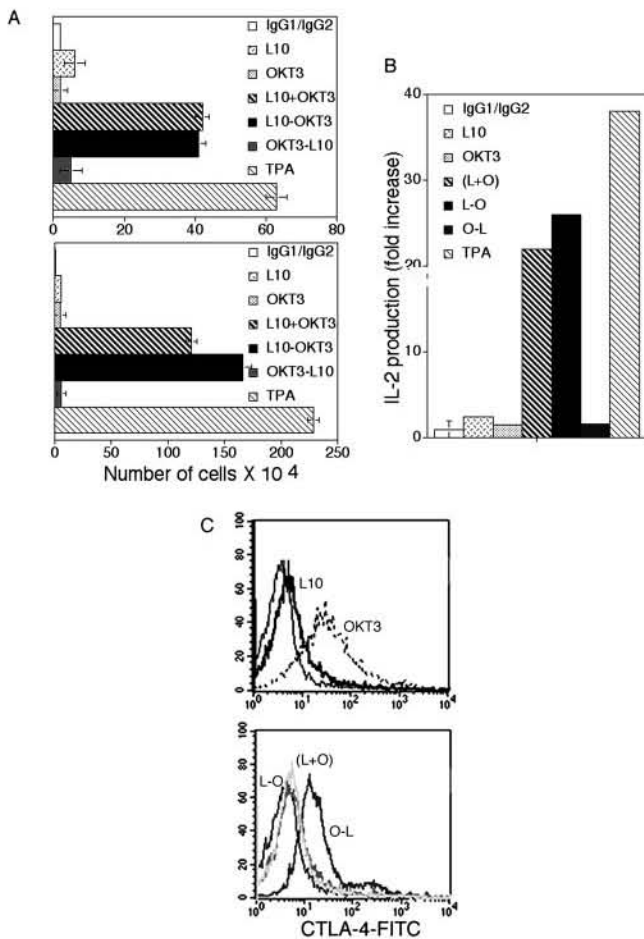


FIGURE 1. CD43 ligation before or at the same time of TCR ligation leads to an efficient T cell proliferation and prevents the establishment of TCR-induced anergy. *A*, Human peripheral blood T lymphocytes were plated in 96-well plates at 2×10^4 cells/well, stimulated with the first stimulus (anti-CD43 mAb, L10, or anti-CD3 mAb, OKT3) for 2 h, following which the second stimulus (OKT3 or L10) was provided; alternatively, cells were stimulated at the same time with both mAbs, or TPA (50 ng/ml)/IONO (1 μ g/ml). Cell proliferation was evaluated by MTT conversion after 7 days (*upper panel*). Anergy induction was assessed by restimulating the cells with OKT3 for 5 days, as described under *Materials and Methods* (*lower panel*). *B*, To evaluate IL-2 secretion, T lymphocytes were stimulated as described in *A*. After 48 h, the supernatant was recovered, and IL-2 secretion was evaluated. *C*, CTLA-4 expression was assessed on T lymphocytes stimulated as in *B*. Data shown represent the mean of triplicate wells and are representative of at least five independent experiments.

previously, only when CD43 and the TCR were cross-linked simultaneously or when CD43 provided the first activation signals cells proliferated, whereas cells that had been stimulated with CD43, the TCR, or the TCR before CD43 did not proliferate (data not shown). In addition, and further supporting the fact that CD43-mediated signals prevent anergy when provided previously or simultaneously to TCR engagement, high levels of IL-2 were detected only when CD43 was ligated before or simultaneously with the TCR. On the contrary, providing TCR signals as the first signal or independent stimulation with CD43 or the TCR resulted in low levels of IL-2 (Fig. 1*B*). The lack of proliferation of cells was not due to cell death and addition of IL-2 at the onset of the second stimulation with OKT3 rescued cells stimulated with the TCR as the first stimulus from anergy as well as those activated only through CD43 or the TCR (data not shown).

Expression of the CTLA-4 molecule on the cell surface as a result of TCR engagement has been related to anergy (21, 22). Consistent

with the lack of proliferation in response to a secondary stimulation with OKT3, cells stimulated through the TCR alone (Fig. 1*C*, *upper panel*) or through the TCR for 2 h before CD43 costimulation (Fig. 1*C*, *lower panel*) expressed CTLA-4. In contrast, ligating only CD43 did not result in CTLA-4 expression (Fig. 1*C*, *upper panel*). Concordant with this, engaging CD43 before or at the same time as the TCR prevented the TCR-induced expression of CTLA-4 (Fig. 1*C*, *lower panel*). Altogether, these results suggest that the sequence with which a cell senses receptor-mediated signals may result in different responses.

The TCR-dependent anergic signals can be prevented by CD43 within a narrow time frame

Multiple reports have analyzed the differential responses generated by stimulating T lymphocytes through the TCR and costimulatory molecules, of which CD28 is the most studied (23). Our data indicated that, if provided before or concurrent with TCR engagement, CD43 costimulatory signals led to T cell activation and proliferation, suggesting that the sequence with which signals are perceived influences cell fate. To investigate whether this is a general mechanism for costimulatory molecules or whether it was specific for CD43, we evaluated the costimulatory function of the CD28 molecule under the same experimental conditions used for CD43. CD28 greatly increased TCR-induced cell proliferation, regardless of the order of the stimuli (Fig. 2*A*). These results suggest that, in contrast to CD43 (Fig. 1*A*), CD28-dependent signals prevent the TCR-mediated anergic signals, and that the sequence with which CD28 and the TCR are engaged is not important to drive cell proliferation.

Because we had found that prestimulating the cells through the TCR for 2 h before CD43 costimulation resulted in anergy, we

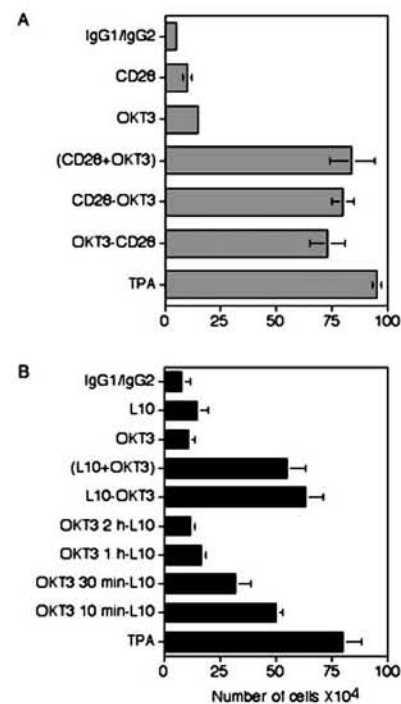


FIGURE 2. T cell activation driven through CD43 costimulatory signals is a time-limited event. *A*, Human T lymphocytes were stimulated through CD28 and the TCR following the same experimental protocol as used in Fig. 1. *B*, T cells were stimulated as described under Fig. 1, or with OKT3 for 1 h, 30 min, or 10 min before costimulation with L10. After 7 days, cell proliferation was assessed by MTT conversion. Data shown represent the mean of triplicate wells and are representative of three independent experiments.

investigated whether there was a time frame wherein the TCR signals leading to anergy could be prevented by a subsequent CD43 engagement. Assays were conducted where the TCR was ligated for shorter periods of time before cross-linking CD43. When cells were stimulated with OKT3 for 1 h, subsequent CD43 ligation did not provide proliferative signals. However, decreasing the time of OKT3 stimulation to 30 or 10 min before engaging CD43 resulted in a marked increase of cell proliferation (Fig. 2*B*), suggesting that there is a critical time window of ~30 min following TCR triggering, where CD43-mediated signals can prevent the TCR-mediated signals leading to anergy.

These results indicate that CD43 and CD28 generate costimulatory signals leading to T cell proliferation through different mechanisms. CD28-mediated signals were able to induce cell proliferation even if provided after 2 h of TCR engagement, whereas CD43-specific signals could only prevent cells from becoming anergic if given within the first 10 min of TCR engagement.

ERK is a key component of CD43-mediated costimulatory signals

Differences in the duration of intracellular signaling have been implicated in different biological responses (24); specifically, the kinetics and phosphorylation levels of ERK have been associated to the regulatory activation of transcriptional factors (25), modulating cellular functions ranging from survival signals to apoptosis. The TCR (26) and CD43 (12, 27) initiate the MAPK pathway when ligated on the surface of T cells. To evaluate whether ERK activation participates in the CD43-mediated signaling cascade that regulates TCR-induced signals, T lymphocytes were stimulated through CD43 and the TCR following the same experimental schemes described above. As soon as 2 min after CD43 pretreatment (L10 + OKT3) or simultaneous costimulation through both molecules (L10 + OKT3), an enhanced ERK phosphorylation that lasted for at least 2 h was observed (Fig. 3*A*). In contrast, triggering the cells through the TCR and subsequent CD43 engagement (OKT3-L10) did not result in sustained ERK phosphorylation (Fig. 3*A*). Stimulation through either CD43 or the TCR alone induced a transient ERK phosphorylation, peaking at 2 h for CD43 and at 30 min for the TCR (Fig. 3*A*). Under our experimental conditions, CD43, the TCR or TCR pretreatment (OKT3-L10) induced preferentially ERK2 (p42) phos-

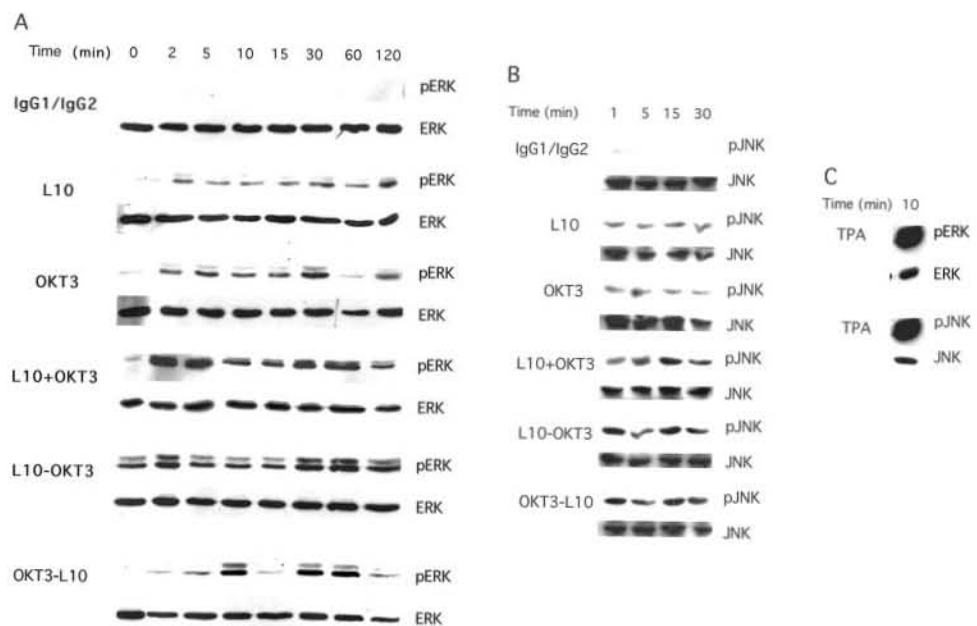
phorylation. Similar to TPA, CD43 pretreatment (L10 + OKT3) or simultaneous stimulation through both molecules (L10 + OKT3) resulted in increased ERK1 (p44) and ERK2 (p42) phosphorylation.

Because the differential activation of ERK and JNK has been found to regulate the generation of diverse cellular responses (28), the kinetics and intensity of JNK phosphorylation were also assessed in the same experiment. Contrary to ERK phosphorylation, JNK phosphorylation was enhanced by costimulation, regardless of the order of the stimuli. Stimulation through CD43 or the TCR alone resulted in JNK phosphorylation (Fig. 3*B*). As expected, TPA stimulation induced ERK and JNK phosphorylation revealing an efficient cell-signaling machinery (Fig. 3*C*). In conjunction, these results suggest that ERK plays a pivotal role integrating and regulating the activation signals driven through CD43 and the TCR.

CD43 ligation before or simultaneous to TCR engagement induces a sustained ζ -chain phosphorylation

Tyrosine phosphorylation of the ζ -chain has been considered as an early event of intracellular activation leading to ERK activity in response to TCR (29) as well as of CD43 cross-linking (13). To evaluate whether ERK activation resulting of ligating CD43 before or simultaneously with TCR engagement correlated with ζ -chain phosphorylation, we followed the kinetics of the ζ -chain tyrosine phosphorylation. When cross-linking both molecules simultaneously (L10 + OKT3), the pattern of ζ -chain phosphorylation reflected a combination of what was observed for the OKT3 and L10 stimuli alone, resulting in a more intense (~10-fold as compared with cells stimulated only through the TCR) and a sustained phosphorylation, lasting for up to 30 min (Fig. 4). Engaging CD43 before the TCR (L10 + OKT3) resulted in an early, intense and prolonged ζ -chain phosphorylation, but pre-stimulating through the TCR before CD43 ligation (OKT3-L10), led to transient ζ -chain phosphorylation. Addition of the isotype specific cross-linking reagents, did not result in ζ phosphorylation (Fig. 4). Thus, differences in the intensity and duration of early signals such as ζ -chain phosphorylation and ERK activation reflect variations in the order with which membrane receptors are engaged.

FIGURE 3. Engagement of CD43 before or simultaneously with TCR ligation results in sustained ERK phosphorylation. A total of 1×10^7 human T lymphocytes were incubated with the first mAb (L10 or OKT3) for 10 min at 4°C, cross-linked with the isotype-specific secondary Ab (anti-IgG1 for L10 or anti-IgG2a for OKT3) for the indicated periods of time at 37°C; after washing to remove excess Ab, cells were costimulated for 5 min at 37°C; alternatively, cells were stimulated at the same time with both mAbs, or received a single stimulus. Total cell lysates were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and subjected to immunoblotting with anti-pERK (*A*) or anti-pJNK (*B*) mAbs. *C*, TPA (50 ng/ml) stimulation was used as a positive control. Membranes were re-probed for total ERK2 or JNK, respectively. Data shown are representative of at least three independent experiments.



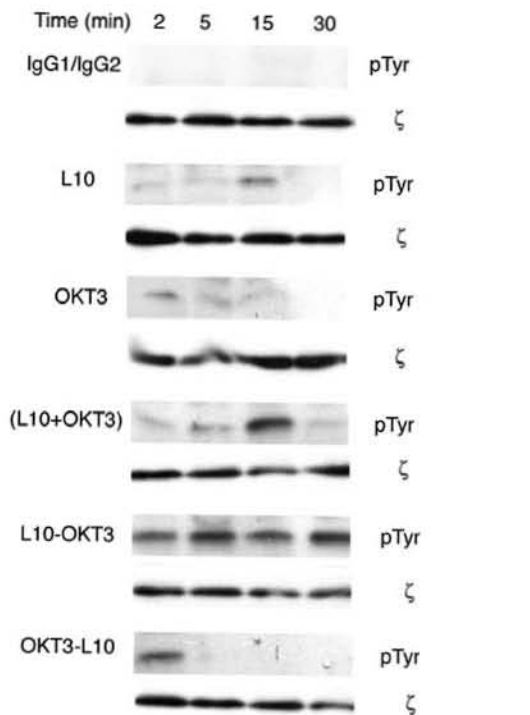


FIGURE 4. Engagement of CD43 before or simultaneously with TCR ligation results in sustained phosphorylation of the ζ -chain. A total of 1×10^7 human T lymphocytes were stimulated as described under Fig. 3A for the indicated times. Total cell lysates were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and subjected to immunoblotting with the anti-phosphotyrosine (pY) 4G10 mAb. Membranes were reprobed with anti- ζ mAb. Data shown are representative of at least three independent experiments.

CD43 signals modulate the TCR-induced SHP-1-Lck association

Our results showed that level of ζ and ERK activation depends on the nature of the first stimulus detected by the T cells. By phosphorylating Lck on Ser⁵⁹, ERK has been shown to prevent the interaction of Lck with the phosphatase SHP-1. This in turn results in prolonged phosphorylation of Lck Tyr³⁹⁴ and increased enzymatic activity of Lck (30–32), ultimately enhancing TCR signaling. We considered the possibility that by preventing the association of SHP-1 to Lck, CD43 costimulatory signals lead to sustained ERK and ζ -chain phosphorylation. Previous reports (30) assessed SHP-1/Lck association to immunoprecipitated TCR complexes and showed that the presence of SHP-1 in these complexes peaked at 40 min. Under our experimental conditions, the presence of SHP-1 in Lck immune complexes was best detected at 2 h (data not shown). Stimulating the cells through either CD43 or the TCR alone or through the TCR followed by a late CD43 ligation led to SHP-1-Lck association (Fig. 5A, upper panel). When CD43 signals preceded TCR engagement, the interaction between SHP-1 and Lck decreased, or was lost when CD43 and the TCR were engaged simultaneously (Fig. 5A, upper panel). These data suggest that CD43 signals provided prior or at the same time to those of the TCR prevented the association of SHP-1 to Lck, favoring the positive feedback loop that enhances TCR signaling.

To evaluate whether the inhibition of the SHP-1-Lck interaction we observed required ERK activity, T lymphocytes were preincubated for 15 min at 37°C with or without PD98059, a specific MEK kinase inhibitor (33), and activated according to the different protocols. When CD43 was the first stimulus or was engaged at the same time as the TCR, ERK inhibition restored SHP-1-Lck association (Fig. 5A, upper panel). In contrast, ERK inhibition did not

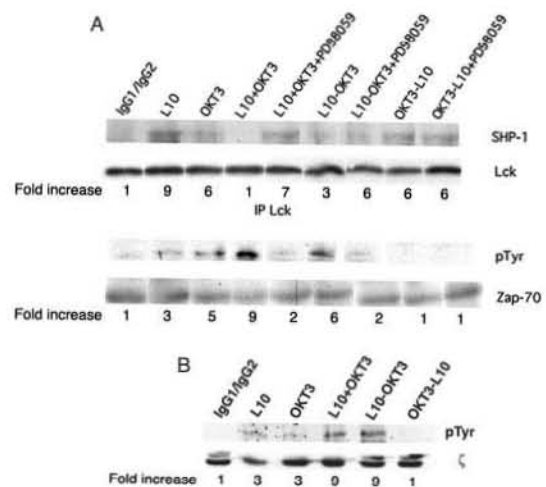


FIGURE 5. ERK and SHP-1 participate in prolonged phosphorylation of Zap70 and ζ -chain. **A**, A total of 2×10^7 human peripheral T lymphocytes were incubated for 15 min at 37°C in the presence or absence of 30 μ M PD98059 and stimulated for 2 h at 37°C with the indicated mAbs. After preclearing with Sepharose-protein A, cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-Lck mAb. Immune complexes were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and blotted with anti-SHP-1, anti-Lck, anti-pTyrosine (p-Tyr) or anti-Zap70 Abs. **B**, A total of 1×10^7 cells were stimulated as described for **A** and membranes were reprobed with anti-pTyrosine (p-Tyr) or anti- ζ mAbs. Data shown are representative of at least three independent experiments.

modify the SHP-1-Lck association that resulted from activating the cells through the TCR before CD43 ligation (Fig. 5A, upper panel). To assess whether preventing SHP-1-Lck association by ligating CD43 before or simultaneous to TCR engagement resulted in enhanced Lck activity, we evaluated the tyrosine phosphorylation of Zap70, a substrate for Lck (34), as both CD43 and the TCR induce Zap70 phosphorylation (1, 13). Consistent with data shown above, ligating CD43 before or simultaneous with the TCR engagement resulted in enhanced Zap70 phosphorylation, compared with cells activated through the TCR as the first stimulus, or only through CD43 or the TCR (Fig. 5A, lower panel). Furthermore, blocking ERK kinase activity reduced Zap70 phosphorylation to levels comparable to those of control cells (Fig. 5A, lower panel). Interestingly, ζ -chain phosphorylation levels remained elevated for up to 2 h in cells that were first activated through CD43 (L10 – OKT3) or through simultaneous stimulation (L10 + OKT3) as compared with cells activated through CD43 or the TCR (Fig. 5B). These data indicate that CD43-mediated signals previous or simultaneous to TCR engagement knockdown the SHP-1-Lck association, resulting in sustained ζ -chain and Zap70 tyrosine phosphorylation via an ERK-mediated mechanism.

The costimulatory effect of CD43 on the TCR-mediated signals is ERK dependent

Our results indicate that within a specific time frame (between 0 and 30 min) TCR anergic signals could be rescued by a second CD43-mediated stimulus, and that this response was under the control of the intensity and duration of ERK signals. We reasoned that addition of PD98059 simultaneously with costimulation would prevent the activation of a new pool of ERK molecules, allowing us to discriminate whether the costimulatory signals that hindered the cells from a TCR-induced anergic state were subjugated to a CD43-dependent ERK activation. To ascertain that PD98059 was acting only on the pool of ERK molecules recruited in response to the second stimulus, we evaluated the levels of ERK phosphorylation in total cell lysates from T lymphocytes activated with L10 or OKT3 with or

without the inhibitor or prestimulated with OKT3 for 10 min and then costimulated with L10 in the presence of PD98059. As expected, ERK activation induced in response to CD43 or TCR cross-linking was reduced in the presence of PD98059 (Fig. 6A). When PD98059 was added at the same time as the L10 mAb, the enhanced pERK levels that resulted of CD43 engagement 10 min after TCR ligation decreased to levels comparable to those observed by engaging only the TCR (Fig. 6A). Consistent with these data, the proliferative response resulting from engaging CD43 10 min after the TCR was prevented by PD98059 (Fig. 6B). Consistent with the fact that JNK activation levels were comparable in response to the different stimuli, inhibiting JNK with SP600125 did not have a significant effect on cell proliferation in any case (Fig. 6C). SP600125 inhibitory effect, was confirmed by the absence of pJun (data not shown). Together, these data suggest that ERK phosphorylation is essential to mediate the costimulatory effect of CD43 on TCR-signals, fine-tuning responses such as proliferation or anergy.

The temporality of CD43- and TCR-mediated signals modulates the titer of cytokines produced.

To further explore how the temporality with which CD43- and TCR-mediated signals are sensed affected cell response, we analyzed the cytokine profile resulting from the different activation schemes. When CD43 was ligated before or at the same time as the TCR, cells produced equivalents amounts of IL-1 α and - β , MCP-2, TGF- β , and TNF- α and - β , as well as of IL-2, -3, and -8. Interestingly, activating the cells first through the CD43 molecule resulted in higher levels (at least 2-fold) of IL-13, IFN- γ , RANTES, and MCP-1, while larger quantities (at least 2-fold) of IL-4 and MIP-1 were detected when CD43 and the TCR were engaged simultaneously. When TCR

engagement preceded CD43 ligation, cells produced primarily IL-8 (Fig. 7).

Altogether, these data suggest that stimulating the cells through CD43 as a first or second stimulus results in subtle differences in the duration and intensity of key intracellular signals, which in turn are translated into different responses in terms of cell proliferation and cytokine production.

Discussion

During T cell activation, the plasma membranes of the T cell and APC are apposed next to one another, allowing for the reciprocal engagement of cell surface receptors, including the TCR and costimulatory molecules, with their counterreceptors. However, little is known about the first contacts between a T cell and an APC and the molecules that direct them. It is possible that the cells are brought together first through adhesive molecules and that the shape and structure of these molecules are important to drive the initial interactions. Abundant and elongated molecules, such as CD43, could be suitable candidates to initiate the cross-talk between T lymphocytes and APCs.

To evaluate whether the temporality with which coreceptor molecules become involved modifies their costimulatory function, we assessed the impact of the sequence with which CD43 and the TCR were engaged on cell response. We found that engaging the CD43 molecule before or simultaneously with the TCR resulted in vigorous IL-2 production, robust proliferation, and lack of CTLA-4 expression. In contrast, cells stimulated through the TCR before CD43 ligation resulted in anergy: these cells expressed CTLA-4, failed to produce IL-2 and to proliferate. The fact that CD43 levels did not significantly change 2 h after TCR engagement (data not shown) indicates that anergy was not the result of the lack of CD43 signals. Interestingly, if applied within the first 30 min following TCR engagement, the CD43-dependent signals prevented the anergizing signals resulting of engaging the TCR before CD43 activation and suggest that the CD43-mediated signals are important in the decision-making process of a cell. Consistent with this, the different combinations of costimulatory signals generated in response to CD43 and TCR engagement produced different sets of cytokines. Cross-linking CD43 before or at the same time as the TCR induced comparable levels of an overlapping set of cytokines involved in cell proliferation, anergy prevention, maturation, and differentiation (IL-1 β , IL-2, IL-3, IFN- γ , and TNF β), as well as chemokines up-regulated during inflammation (MCP-1, MIP-1, and RANTES). Interestingly, when preceding the TCR signals, CD43 ligation up-regulated even more (at least 2-fold) the secretion of IL-13 and IFN- γ , whereas when cells were stimulated simultaneously through CD43 and the TCR, IL-4 secretion was increased. As previously described for anergic cells (35), when the first activating signals were provided by the TCR, we found that cells secreted primarily IL-8. Overall, our data support reports showing that CD43 functions as a coreceptor molecule for the TCR (15, 36, 37) and that CD43-mediated signals up-regulate the expression of several proinflammatory genes (27, 38).

The ERK family members have emerged as pivotal regulators in the translation of signals mediated by receptor engagement. The duration and intensity of ERK1/2 activation differentially regulates diverse cellular functions (28, 39). During successive TCR triggering, accumulation of the activated form of ERK1/2 is determined by the level of TCR engagement, and it is more notorious when costimulatory signals are provided (40). ERK1 and ERK2 have been implicated in proliferation and differentiation; however, the differences between ERK1 and ERK2 function remain unclear (41). Our data show that the intensity of ERK1 and ERK2 phosphorylation was dependent on the order with which costimulatory signals were applied. CD43 signals prior or simultaneous with

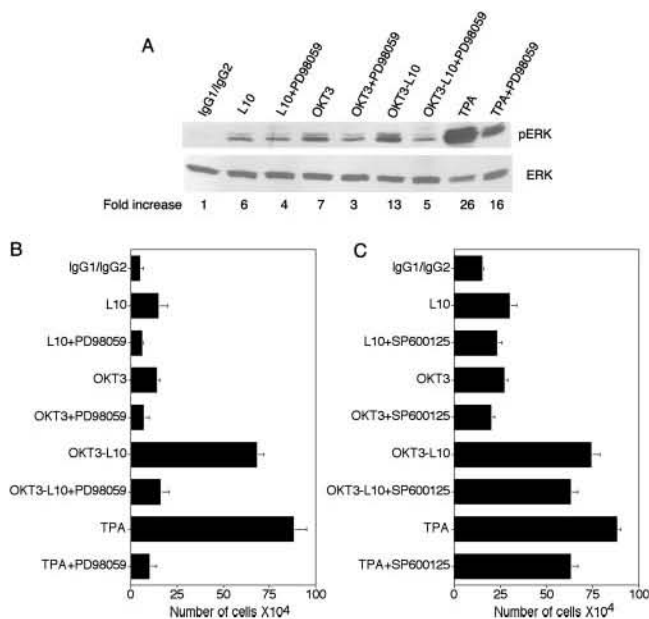


FIGURE 6. The CD43-dependent ERK activity reverts TCR-induced anergy. Human T lymphocytes were stimulated as described under Fig. 1A, with or without PD98059 after the first stimulus. *A*, To verify that PD98059 was acting only on the pool of ERK molecules recruited through the second stimulus, T cells were stimulated for 10 min with the first stimulus, washed, and further stimulated for 5 min with the second stimulus in presence or absence of the ERK inhibitor. Total cell lysates were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and subjected to immunoblotting with anti-pERK and anti-ERK2 mAbs. *B*, After 7 days in vitro at 37°C, 5% CO₂, cell proliferation was assessed by MTT conversion. *C*, Human T lymphocytes were stimulated as described under *B* with or without SP600125. Data shown are representative of at least three independent experiments.

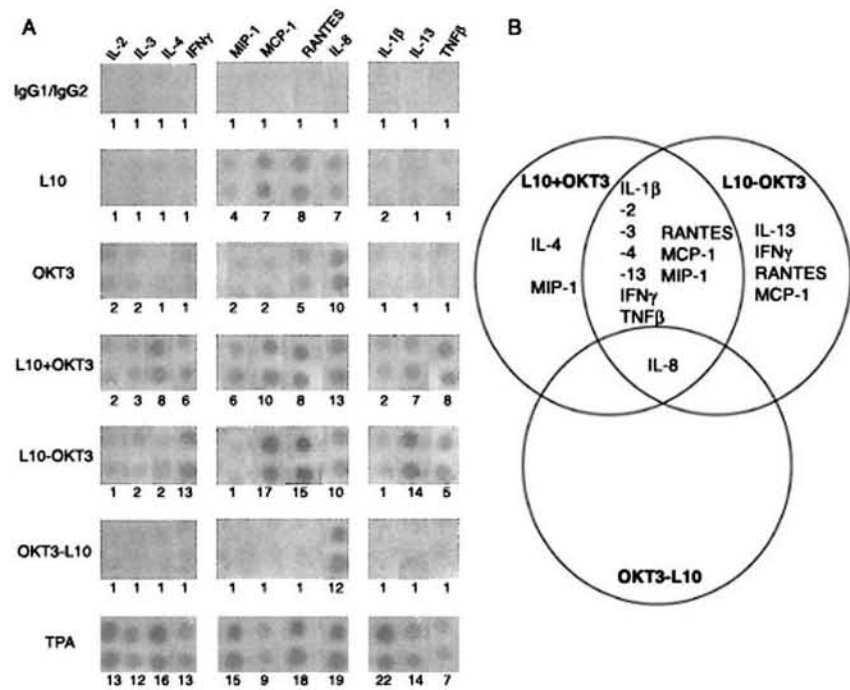


FIGURE 7. Sequential T cell stimulation through CD43 and the TCR induces the production of a complex set of cytokines. Human peripheral T cells (>98% CD3⁺) were stimulated for 24 h with anti-CD43 and -CD3 Abs following the same experimental conditions as described under Fig. 1B. *A*, Cytokines were detected by using a dot-blot assay. *B*, Cytokines detected for each stimulation protocol were considered a set, represented as a circle. The intersection of the three sets constitutes the subset of cytokines that were present in comparable quantities; cytokines annotated in the nonoverlapping sections of each set were scored as higher when their levels increased at least 2-fold as compared with cells treated with secondary Abs only. Data shown are representative of two independent experiments.

those of the TCR favored a faster and sustained phosphorylation of both, ERK1 and ERK2. Stimulating the cells through CD43 or the TCR preferentially led to ERK2 (p42) activation. Interestingly, the ERK1 (p44) phosphorylation resulting of the different stimulation protocols seemed to be subjugated to a more subtle modulation. These differences might reflect differences in signal strength, and they could favor different signaling pathways both quantitatively and qualitatively. Our proliferation and cytokine release data are consistent with this possibility.

Sustained ERK activation prevents SHP-1 association to Lck and dephosphorylation of diverse substrates, including Lck, the ζ -chain and Zap70, thus blocking the activation of a negative regulatory loop, contributing to increased Zap70 and ζ -chain phosphorylation and activation of downstream signals (30). Our data show that the sustained ERK activity resulting of engaging CD43 before or at the same time as the TCR led to SHP-1-Lck dissociation and enhanced ζ -chain and Zap70 phosphorylation. Moreover, our results using PD98059 show that the pool of ERK molecules recruited through the CD43-dependent costimulatory signals prevented the anergy signals provided by the TCR as a first stimulus. In contrast and consistent with what has been described for anergic T cells (42, 43), engaging first the TCR resulted in a transient ERK phosphorylation, a sustained SHP-1-Lck association and a diminished Zap70 and ζ -chain phosphorylation. These fluctuations in the duration and intensity of activation were not detected for JNK, where the kinetics and intensity of phosphorylation were comparable, independent of the activation protocol. Moreover, inhibiting JNK did not result in inhibition of cell proliferation. Thus, the sequence with which cell surface molecules encounter their ligand can generate differences in the early signaling events, which in turn will favor differential cell responses.

CD28 is considered the hallmark of coreceptor molecules (44), and interestingly, CD43 has been shown to compensate for CD28 functions in the CD28^{-/-} mouse (45). We investigated whether the temporality with which the TCR and CD28 were engaged also influenced the quality of T cell response. Surprisingly, under our experimental conditions, we found that independent of the sequence, ligation of the TCR and the CD28 coreceptor molecule resulted in cell

proliferation. These data suggest that the costimulatory functions of CD43 and CD28 are mediated through distinct mechanisms, allowing for a fine regulation of cellular responses generated by means of differences in timing.

Multiple and diverse ligands have been described for CD43. ICAM-1 (46), MHC-I (47), galectin-1 (48), human serum albumin (49), and the macrophage adhesion receptor sialoahesin (siglec-1) (50). ICAM-1, MHC-I, and siglec-1 could play a role during T cell activation through their interaction with CD43, because they are expressed on the cell surface of different APCs. However, because these molecules are also the ligands for other cell surface molecules on the T cell, the significance of the interaction of CD43 with ICAM-1, MHC-I or siglec-1 on the coreceptor functions of CD43 during T cell activation is not clear. Moreover, it is not known whether the sequential interaction of CD43 with its ligands modulates its biological functions. Interestingly, CD43 has been shown to be a costimulatory molecule that can modulate HIV expression in T lymphocytes, potentiating HIV-1 promoter-driven activity and virus production that result of engaging the TCR (51). In addition, sera from HIV-infected individuals have shown to contain auto-antibodies specific for CD43 (52). Whether these Abs are capable of ligating CD43 on the surface of lymphoid cells, and are responsible for the costimulatory function of CD43 remains to be demonstrated.

Our results highlight the role of CD43 both as a coreceptor and as a molecule that participates in proliferation, inflammation, and cell migration/adhesion, modulating immune responses. Moreover, our data support the temporal summation model (53) where by interacting with its counterreceptor(s) on the APC at the same time or before Ag recognition, CD43 induces a signaling cascade that prolongs the duration of TCR signaling. In addition to the strength and duration of intracellular signals, our data underscore temporality with which certain molecules are engaged as yet another mechanism to fine tune T cell response, and ultimately immune function.

Acknowledgments

We thank Drs. G. Koretzky, M. Rincón, and L. Pérez for critical reading of the manuscript; Erika Melchy and Arturo Ocadiz for

technical help; and the Blood Bank from the Hospital de Zona del Instituto Mexicano del Seguro Social, Cuernavaca, Morelos for providing the leukocyte concentrates.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Weiss, A., and D. R. Littman. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76: 263–274.
- Schwartz, R. H. 2003. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 305–334.
- Kroccek, R. A., H. W. Mages, and A. Hutloff. 2004. Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 321–327.
- Tseng, S. Y., and M. L. Dustin. 2002. T-cell activation: a multidimensional signaling network. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 575–580.
- Chambers, C. A. 2001. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol.* 22: 217–223.
- Appleman, L. J., and V. A. Boussiotis. 2003. T cell anergy and costimulation. *Immunol. Rev.* 192: 161–180.
- Montoya, M. C., D. Sancho, G. Bonello, Y. Collette, C. Langlet, H. T. He, P. Aparicio, A. Alcover, D. Olive, and F. Sanchez-Madrid. 2002. Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs. *Nat. Immunol.* 3: 159–167.
- Dustin, M. L. 2004. Stop and go traffic to tune T cell responses. *Immunity* 21: 305–314.
- Cyster, J. G., D. M. Shotton, and A. F. Williams. 1991. The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *EMBO J.* 10: 893–902.
- Alvarado, M., C. Klassen, J. Cerny, V. Horejsi, and R. E. Schmidt. 1995. MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation. *Eur. J. Immunol.* 25: 1051–1055.
- Pedraza-Alva, G., L. B. Merida, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein. 1996. CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 27564–27568.
- Pedraza-Alva, G., L. B. Merida, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein. 1998. T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation. *J. Biol. Chem.* 273: 14218–14224.
- Cruz-Munoz, M. E., E. Salas-Vidal, N. Salaiza-Suazo, I. Becker, G. Pedraza-Alva, and Y. Rosenstein. 2003. The CD43 coreceptor molecule recruits the ζ -chain as part of its signaling pathway. *J. Immunol.* 171: 1901–1908.
- Del Rio, R., M. Rincon, E. Layseca-Espinosa, N. A. Fierro, Y. Rosenstein, and G. Pedraza-Alva. 2004. PKC θ is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325: 133–143.
- Park, J. K., Y. J. Rosenstein, E. Remold-O'Donnell, B. E. Bierer, F. S. Rosen, and S. J. Burakoff. 1991. Enhancement of T-cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Nature* 350: 706–709.
- Bagriacik, E. U., M. Tang, H. C. Wang, and J. R. Klein. 2001. CD43 potentiates CD3-induced proliferation of murine intestinal intraepithelial lymphocytes. *Immunol. Cell Biol.* 79: 303–307.
- Allenspach, E. J., P. Cullinan, J. Tong, Q. Tang, A. G. Tesciuba, J. L. Cannon, S. M. Takahashi, R. Morgan, J. K. Burkhardt, and A. I. Sperling. 2001. ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* 15: 739–750.
- Roumier, A., J. C. Olivo-Marin, M. Arpin, F. Michel, M. Martin, P. Mangeat, O. Acuto, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 2001. The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation. *Immunity* 15: 715–728.
- Remold-O'Donnell, E., A. E. Davis III, D. Kenney, K. R. Bhaskar, and F. S. Rosen. 1986. Purification and chemical composition of gpL115, the human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Biol. Chem.* 261: 7526–7530.
- Perez, L., A. Paasinen, B. Schnierle, S. Kach, M. Senften, and K. Ballmer-Hofer. 1993. Mitosis-specific phosphorylation of polyomavirus middle-sized tumor antigen and its role during cell transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8113–8117.
- Krummel, M. F., and J. P. Allison. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* 182: 459–465.
- Thompson, C. B., and J. P. Allison. 1997. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* 7: 445–450.
- Riley, J. L., and C. H. June. 2005. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* 105: 13–21.
- Werlen, G., B. Hausmann, D. Naehrer, and E. Palmer. 2003. Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science* 299: 1859–1863.
- Murphy, L. O., S. Smith, R. H. Chen, D. C. Fingar, and J. Blenis. 2002. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell Biol.* 4: 556–564.
- Gupta, S., A. Weiss, G. Kumar, S. Wang, and A. Nel. 1994. The T-cell antigen receptor utilizes Lck, Raf-1, and MEK-1 for activating mitogen-activated protein kinase: evidence for the existence of a second protein kinase C-dependent pathway in an Lck-negative Jurkat cell mutant. *J. Biol. Chem.* 269: 17349–17357.
- Mattioli, I., O. Dittrich-Breiholz, M. Livingstone, M. Kracht, and M. L. Schmitz. 2004. Comparative analysis of T-cell costimulation and CD43 activation reveals novel signaling pathways and target genes. *Blood* 104: 3302–3304.
- Johnson, G. L., and R. Lapadat. 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911–1912.
- van Oers, N. S., B. Tohlen, B. Malissen, C. R. Moomaw, S. Afendis, and C. A. Slaughter. 2000. The 21- and 23-kD forms of TCR ζ are generated by specific ITAM phosphorylations. *Nat. Immunol.* 1: 322–328.
- Stefanova, I., B. Hemmer, M. Vergelli, R. Martin, W. E. Biddison, and R. N. Germain. 2003. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat. Immunol.* 4: 248–254.
- Winkler, D. G., I. Park, T. Kim, N. S. Payne, C. T. Walsh, J. L. Strominger, and J. Shin. 1993. Phosphorylation of Ser-42 and Ser-59 in the N-terminal region of the tyrosine kinase p56^{lck}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5176–5180.
- Watts, J. D., J. S. Sanghera, S. L. Pelech, and R. Aebersold. 1993. Phosphorylation of serine 59 of p56^{lck} in activated T cells. *J. Biol. Chem.* 268: 23275–23282.
- Alessi, D. R., A. Cuenda, P. Cohen, D. T. Dudley, and A. R. Saltiel. 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270: 27489–27494.
- Visco, C., G. Magistrelli, R. Bosotti, R. Perego, L. Rusconi, S. Toma, M. Zamai, O. Acuto, and A. Isacchi. 2000. Activation of Zap-70 tyrosine kinase due to a structural rearrangement induced by tyrosine phosphorylation and/or ITAM binding. *Biochemistry* 39: 2784–2791.
- Schall, T. J., R. E. O'Hehir, D. V. Goeddel, and J. R. Lamb. 1992. Uncoupling of cytokine mRNA expression and protein secretion during the induction phase of T cell anergy. *J. Immunol.* 148: 381–387.
- Rosenstein, Y., A. Santana, and G. Pedraza-Alva. 1999. CD43, a molecule with multiple functions. *Immunol. Res.* 20: 89–99.
- Kyoizumi, S., T. Ohara, Y. Kusunoki, T. Hayashi, K. Koyama, and N. Tsuyama. 2004. Expression characteristics and stimulatory functions of CD43 in human CD4⁺ memory T cells: analysis using a monoclonal antibody to CD43 that has a novel lineage specificity. *J. Immunol.* 172: 7246–7253.
- Montufar-Solis, D., T. Garza, and J. R. Klein. 2005. Selective upregulation of immune regulatory and effector cytokine synthesis by intestinal intraepithelial lymphocytes following CD43 costimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 1158–1163.
- Sasagawa, S., Y. Ozaki, K. Fujita, and S. Kuroda. 2005. Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation. *Nat. Cell Biol.* 7: 365–373.
- Borovsky, Z., G. Mishan-Eisenberg, E. Yaniv, and J. Rachmilewitz. 2002. Serial triggering of T cell receptors results in incremental accumulation of signaling intermediates. *J. Biol. Chem.* 277: 21529–21536.
- Pages, G., S. Guerin, D. Grall, F. Bonino, A. Smith, F. Anjuere, P. Auberger, and J. P. Poussegur. 1999. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (ERK 1) knockout mice. *Science* 286: 1374–1377.
- Migita, K., K. Eguchi, Y. Kawabe, T. Tsukada, Y. Ichinose, S. Nagataki, and A. Ochi. 1995. Defective TCR-mediated signaling in anergic T cells. *J. Immunol.* 155: 5083–5087.
- De Silva, D. R., W. S. Feeser, E. J. Tancula, and P. A. Scherle. 1996. Anergic T cells are defective in both jun NH₂-terminal kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Exp. Med.* 183: 2017–2023.
- Acuto, O., and F. Michel. 2003. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 939–951.
- Sperling, A. I., J. M. Green, R. L. Mosley, P. L. Smith, R. J. DiPaolo, J. R. Klein, J. A. Bluestone, and C. B. Thompson. 1995. CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28. *J. Exp. Med.* 182: 139–146.
- Rosenstein, Y., J. K. Park, W. C. Hahn, F. S. Rosen, B. E. Bierer, and S. J. Burakoff. 1991. CD43, a molecule defective in the Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* 354: 233–235.
- Stockl, J., O. Majdic, P. Kohl, W. F. Pickl, J. E. Menzel, and W. Knapp. 1996. Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation. *J. Exp. Med.* 184: 1769–1779.
- Baum, L. G., M. Pang, N. L. Perillo, T. Wu, A. Deleage, C. H. Uittenbogaart, M. Fukuda, and J. Selhamer. 1995. Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, Galectin-1, which binds the core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med.* 181: 877–887.
- Nathan, C., Q. W. Xie, L. Mecarelli-Hawlbachs, and W. W. Jin. 1993. Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43 (sialophorin, leukosialin). *J. Cell Biol.* 122: 243–256.
- van den Berg, T. K., D. Nath, H. J. Ziltener, D. Vestweber, M. Fukuda, I. van Die, and P. R. Crocke. 2001. Cutting edge: CD43 functions as a T cell counter-receptor for the macrophage adhesion receptor sialoadhesin (Siglec-1). *J. Immunol.* 166: 3637–3640.
- Barat, C., and M. J. Tremblay. 2002. Engagement of CD43 enhances human immunodeficiency virus type 1 transcriptional activity and virus production that is induced upon TCR/CD3 stimulation. *J. Biol. Chem.* 277: 28714–28724.
- Ardman, B., M. A. Sikorski, M. Settles, and D. E. Staunton. 1990. Human immunodeficiency virus type 1-infected individuals make autoantibodies that bind to CD43 on normal thymic lymphocytes. *J. Exp. Med.* 172: 1151–1158.
- Rachmilewitz, J., and A. Lanzavecchia. 2002. A temporal and spatial summation model for T-cell activation: signal integration and antigen decoding. *Trends Immunol.* 23: 592–595.

CD43 REGULATES THE THRESHOLD FOR T CELL ACTIVATION BY TARGETING CBL FUNCTIONS.

Gustavo Pedraza-Alva*, Lilia B. Mérida-Long^{*1}, Roxana del Rio^{*2}, Nora A. Fierro*, Mario E. Cruz-Muñoz^{*3}, Norma Olivares*, Vivian Igras[§], Georg, A. Holländer[#], Steven, J. Burakoff[‡] and Yvonne Rosenstein*

*Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor. 62210, Mexico.

[§]The Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, USA.

[#]Pediatric Immunology, Department of Research and Clinical-Biological Sciences, and the Children's Hospital, University of Basel, Basel, Switzerland.

[‡]Skirball Institute of Biomedical Research, New York University School of Medicine, New York, NY 10016, USA.

Present address: ¹The Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, USA. ²The University of Vermont College of Medicine, Burlington, Vermont, USA. ³Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Quebec, Canada.

Address Correspondence to: Yvonne Rosenstein, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Mor. Mexico 62210. Email: yvonne@ibt.unam.mx

T cell activation requires signaling through the TCR and co-receptor molecules. It has been proposed that co-stimulation sets the thresholds for T cell activation, by preventing the negative effect of the Cbl family members on TCR signaling. In this report, we show that T cell pre-stimulation by CD43 ligation before TCR engagement inhibits TCR-dependent Cbl tyrosine phosphorylation and Cbl interaction with the adapter molecule Crk-L, in a PKC Δ -dependent manner. Furthermore, CD43 ligation before TCR engagement also resulted in Cbl-b ubiquitination and delayed ZAP-70 and chain degradation and therefore, enhanced MAPK activation and T cell response. These data demonstrate that CD43-mediated signals lower the threshold for T cell activation by blocking Cbl and Cbl-b inhibitory effect on TCR signaling.

T cell activation requires, in addition to the signal induced by the specific interaction of the antigen receptor (TCR)¹ with peptides presented by MHC molecules on the antigen-presenting cell (APC), an amplification signal resulting from the interaction of other T cell

surface molecules, known as co-receptors, with their ligands on APCs (for review see (1)). Co-stimulatory receptors regulate the threshold for TCR activation and thus determine immunity or tolerance to self-molecules (2,3). However, the molecular mechanisms that integrate co-stimulatory signals with antigen receptor signals in T lymphocytes are poorly understood.

The T cell-surface glycoprotein CD43 is a highly abundant transmembrane glycoprotein (1.5×10^5 molecules/cell). Human CD43 is an integral membrane protein with a 235 amino acids (aa) extracellular domain that has an elongated structure that protrudes 45 nm from the T cell surface, a transmembrane domain of 23 aa and a highly conserved intracytoplasmic domain of 123 aa (4,5). CD43 functions as a co-receptor molecule, co-ligation of CD43 with the TCR enhances T cell proliferation above levels observed when cross-linking the TCR alone, in normal as well as in CD28^{-/-} mice (6). Furthermore, it was shown that CD43 might also modulate TCR signaling and immune response (7). CD43 ligation with monoclonal antibodies (mAbs) induces the generation of diacylglycerol and inositol phosphates, Ca²⁺ mobilization and

PKC activation (8,9), CD43-Fyn kinase interaction and Fyn tyrosine phosphorylation (10). CD43 engagement results in tyrosine-phosphorylation of the Δ chain (11) as well as of the adapter protein Shc and of the GEF Vav, leading to the formation of macromolecular complexes that comprise Shc-Grb2-Vav and Vav-SLP-76, followed by the activation of the MAP kinase (MAPK) pathway (12). Activation of this pathway results in IL-2, CD69 and CD40-L gene expression through activation of the transcription factors AP-1, NFAT and NF Δ B (13). The highly conserved cytoplasmic domain of CD43, mediates these effects, since deletion of this domain abolished the co-receptor functions of CD43 when expressed in an antigen-specific murine T cell hybridoma (14).

Cbl, the oncogene product of the Casitas B-lineage lymphoma has been implicated in several signal transduction pathways. In Jurkat cells, over-expression of Cbl was shown to inhibit the Ras-dependent activation of the MAP kinase pathway and AP-1 transcriptional activity (15). Recent data obtained from the c-Cbl^{-/-} mouse, clearly showed that the absence of Cbl leads to enhanced T cell signaling upon CD3 ligation, involving ZAP-70 and MAPK kinase activity (16). In addition, data obtained from Cbl-b-deficient mice suggest that the Cbl family members play an important role in setting the threshold for signaling in B and T cells, thus negatively regulating the development of autoimmunity (17,18).

Serine phosphorylation of Cbl has been shown to prevent its phosphorylation on tyrosine residues and its interaction with SH2-containing signaling proteins like PI3K and Crk-L (19,20), suggesting a cross-talk between serine/threonine and tyrosine phosphorylation signaling targeted to Cbl. Unlike TCR signaling (21), CD43-specific signals do not lead to Cbl tyrosine phosphorylation. In contrast, CD43 signals prevent the TCR-mediated Cbl tyrosine phosphorylation by inducing its phosphorylation on serine residues. CD43-mediated Cbl serine phosphorylation is PKC-dependent (22). Thus, differential phosphorylation patterns of Cbl may regulate its functions, probably by modifying its capacity to interact with different signaling molecules, hence modulating cellular signaling. Therefore, we hypothesized that the interaction of CD43 with its counter-receptor(s) on the

APC generates a signaling cascade that prevents Cbl negative effect on TCR signaling, lowering the threshold for TCR activation. In the present report we show experimental evidence that supports this hypothesis. CD43 ligation on human peripheral T lymphocytes before TCR engagement prevented TCR-induced Cbl tyrosine phosphorylation, its association with the adapter molecule Crk-L and delayed TCR-induced ZAP-70 and Δ chain degradation. Furthermore, CD43 pre-activation before TCR engagement promoted ubiquitination and degradation of Cbl-b. This resulted in stronger ERK1/2 activation, I Δ B degradation, NF Δ B and NFAT nuclear translocation and AP-1 activation. CD43 activated T cells showed higher IL-2 mRNA levels, as well as CD69 and CD25 expression. Consistent with this, CD43 ligation enhanced T cell proliferation and activation when low numbers of TCR molecules were engaged. Thus, CD43 signaling regulates the threshold for T cell activation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents. L10, an IgG1 mAb that recognizes CD43 (23), was either purified from ascites on protein A-sepharose columns. Anti-murine CD43 mAbs S7 and S11 have been described elsewhere (24). Rabbit anti-mouse IgG antiserum (RaMIG) was generated by repeated immunizations with purified mouse IgG and anti-mouse IgG immunoglobulins were affinity purified. The anti-c-Cbl, Cbl-b, p-ERK, ERK, Ubiquitin, I Δ B, c-Rel, NFAT and p65 antibodies were from Santa Cruz Biotechnology. The anti-phosphotyrosine antibody has been described elsewhere (25). The anti-p-c-Jun antibodies were from Cell signaling. The anti-CD69-FITC, CD25-PE and CD4-PERCP antibodies were from Caltag. The anti-IL-2-FITC antibody was from Pharmingen. Protein A-sepharose was from Zymed and Ficoll-Hypaque was from Sigma.

Cell Culture. Jurkat cells were cultured in RPMI-1640 (Hyclone, Logan, UT) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS) (Hyclone) and 5% bovine iron supplemented calf serum (Hyclone), 2 mM L-glutamine (Sigma), 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml

streptomycin, and 50 μ M Δ -mercaptoethanol. The IL-2 producer murine T cell hybridoma (By155.16) expressing the human CD43 or the CD4 molecules has been described previously (14,26). We used clones expressing equivalent amounts of the wild type CD43 molecule or of a mutant form that lacked all but one of the 123 amino acids of the intracytoplasmic portion of the molecule (Δ CD43, (14)). Peripheral blood T cells were isolated from healthy adult donors by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation as described previously (10). The resultant purified cells were predominantly OKT3⁺ (>80%) and L10⁺ (>95%), as determined by FACS analysis.

T cell activation. Purified T cells (2×10^7) or Jurkat cells (2×10^7) were incubated in 0.5 ml of cold RPMI for 15 min at 4°C in the absence or in the presence of L10 mAb (4 μ g/ml of purified IgG or otherwise indicated). Pre-activation was achieved by incubating the cells with RaMIG (4 μ g/ml) for the indicated period of time at 37°C, following which cells were washed with cold RPMI and resuspended in 0.5 ml of cold RPMI. After that, T cells were further stimulated with or without 4 μ g/ml of OKT3 anti-CD3 mAb and cross-linked with 4 μ g/ml of RaMIG at 37°C for 5 min. Non-activated T cells went through all incubation and centrifugation steps. When used, the PKC (RO31822; 10 μ M), PLC Δ (U73122; 2 μ M) and MEK (PD98059; 50 μ M) inhibitors were added to the cells 30 min before activation. Cells were lysed in 100 μ l of lysis buffer (25 mM HEPES pH 7.7, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5 mM DTT, 20 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 4 mM PMSF, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin) for 30 min at 4°C. Total cell extracts were kept at -20°C. Nuclear extracts were prepared from activated and control cells as previously described (13).

Immunoprecipitation and Immunoblotting. Lysates were spun at 14,000 g for 15 min at 4°C; supernatant volume was adjusted to 300 μ l with fresh lysis buffer and protein A-Sepharose beads were added and incubated for 2 hours at 4°C. Protein A pre-cleared lysates from activated or non-activated T cells (2×10^7 cellular equivalents) were immunoprecipitated with the

indicated antibody (1 μ g/ml) for 2 hr at 4°C. Immune complexes were harvested with protein A-sepharose for 1 hr on ice and washed once with cold TNE-T [150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 5mM EDTA, 1% Triton X-100 (v/v)], twice with TNE (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 5mM EDTA) and once with H₂O, then subjected to SDS-PAGE and immunoblot as described below. Immunoprecipitated proteins, total cell extracts or nuclear extracts were transferred to nitrocellulose (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% non-fat milk in Tris-buffer saline (TBS: 10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl), followed by incubation with the indicated antibody diluted in TBS with 0.05% Tween-20 [(Bio-Rad) TBS-T]. After three washes with TBS-T, membranes were incubated with the appropriate second antibody coupled to HRP (Biomed). Proteins were visualized by ECL (Amersham) following the manufacturer's instructions.

In vitro kinase assay. PKC Δ was immunoprecipitated as described above from stimulated and control cell extracts. The *in vitro* kinase assay was performed as described (9). The amount of PKC Δ precipitated was determined by western blot. Levels of phosphorylated-MBP, MBP and PKC were quantified by densitometry using a Fluor-S Multi-imager (Bio-Rad). PKC Δ activity was calculated as follows: [p-MBP/total MBP]/precipitated PKC Δ .

RT-PCR. 2×10^7 T cells were stimulated as described above for 4 hr at 37°C. Total RNA was obtained using TRIzol (Life Technologies, Inc.) and RT-PCR was performed to determine IL-2- and G3PDH- mRNA levels as described previously (13).

Cellular staining. For intracellular detection of IL-2, 2×10^6 T lymphocytes were stimulated as described above and incubated in completed RPMI medium for 4 hr in the presence of 10 μ g/ml brefeldine A. Cells were collected, washed and surface stained with anti-CD4-TC and stained for intracellular IL-2 with anti-IL2-FITC antibodies. The percentage of CD4⁺ IL-2⁺ cells was determined by gating the CD4⁺

population, using the CellQuest software (Becton-Dickinson).

Murine T cell hybridoma activation assays. By155.16 hybridoma cells expressing the wild type human CD43 or Δ CD43 (13) were stimulated by cross-linking the TCR with the CD43 molecule on the cell surface. 2.5×10^4 cells/well were incubated with sub-optimal doses of the anti-V Δ 8 mAb F23.1 (0 to 10 ng/ml, final concentration) and with saturating amounts of the anti-CD43 mAb L10 (500 ng/ml, final concentration). Antibodies were cross-linked on the cell surface with M280 beads (Dynal) coated with goat anti-mouse IgG at a bead to cell ratio of 10:1. After 24 hours of stimulation at 37°C in 5% CO₂, IL-2 production of cultured cells was assessed. Culture supernatants were harvested, titrated by serial two-fold dilutions and assayed for IL-2 content by their ability to support the proliferation of the IL-2 dependent murine T cell line CTLL-20 (27). Proliferation was assessed by the incorporation of H³-thymidine (1 μ Ci/well) in a 4-6 hour pulse after 18 hours of incubation. Results are expressed as units/ml and were determined by comparison to a standard curve of recombinant IL-2.

Murine lymphocyte proliferation assays. Females B10.BR mice, age 6 to 8 weeks, were maintained in our animal facility in accordance with the Institute's guidelines. Thymus and spleens were removed aseptically, brought into single cell suspension and washed once in PBS. Cells were then cultured in 96-well plates at 2×10^5 thymocytes/well or 5×10^4 splenocytes/well for 4 days at 37°C in 5% CO₂. Before plating, 96-microwell plates were coated overnight at 37°C with rabbit anti-mouse antibodies (5 μ g/ml of PBS), blocked for one hour with 1% gelatin and finally incubated for four hours at 37°C with varying concentrations of the anti-V Δ 8 mAb F23.1 and S7 or S11 culture supernatant. The anti-H-2^k mAb 11.4.2 (1 μ g/ml) was used as a control antibody for co-stimulation experiments. After four hours of incubation, excess of mAb was removed from the plates by washing the wells with RPMI-1640. In addition to the mAbs, IL-2 was added to the plates at the onset of the experiment at 50 IU/ml for thymocyte experiments and at 10 IU/ml for splenocytes.

Proliferation was measured by ³H-thymidine incorporation (1 μ Ci/well) during the final 18 hours of culture.

Human T cell proliferation assays. The proliferative capacity of human T cells obtained from normal human donors, was assessed following a similar stimulation procedure as that described for the By155.16CD43⁺ hybridoma cells. Purified peripheral T cells (4×10^4 /well) were stimulated with sub-optimal doses of OKT3 (0-1 μ g/ml) and PMA (1ng/ml) and saturating amounts of the anti-CD43 mAb L10 (500 ng/ml). M280 beads coated with goat anti-mouse IgG were added to the wells to cross-link the antibodies on the cell surface at a 10:1 bead to cell ratio. Plates were incubated for 72 hours at 37°C in 5% CO₂; eight hours before harvesting, H³-thymidine was added to the cultures.

RESULTS

CD43 ligation before TCR engagement enhances ERK activation. Since CD43 is one of the molecules that protrudes the most from the cell surface (28), it may be one of the first molecules to contact the APC and hence, to signal. In agreement with this, we have recently shown that stimulation of human T cells through CD43 ligation before TCR engagement resulted in elevated IL-2 production and cell proliferation. This correlated with sustained ERK activation and enhanced ZAP-70 and Δ chain phosphorylation (Fierro et al, 2006)². Cbl negatively regulates TCR-induced ERK activation and ZAP-70 and Δ chain phosphorylation (15,29). Our previous data suggested that by inducing Cbl phosphorylation on serine residues by PKC, CD43-mediated signals regulate the molecular associations and functions of the Cbl molecule (22). We therefore hypothesized that by inactivating Cbl negative effects on the TCR signal pathway, CD43 may lower the threshold for T cell activation. To test this possibility we activated human peripheral T lymphocytes or Jurkat cells with the anti-CD43 mAb L10 for different periods of time before activation through the TCR with the OKT3 mAb and evaluated ERK

activation by western blot using anti-phosphorylated ERK mAb. Activation of human peripheral T lymphocytes through CD43 before TCR engagement resulted in a synergistic ERK activation; a 5-7 fold induction was observed after 10 min pre-stimulation with the L10 mAb compared with cells that were not CD43 pre-stimulated or with cells that were only stimulated with L10 mAb for 10 min (Fig. 1A). The pre-stimulation effect was dependent on the amount of anti-CD43 mAb used; 4 $\mu\text{g/ml}$ was optimal to obtain maximal synergism with the TCR signaling pathway leading to ERK activation (Fig. 1B). Therefore, in all further experiments, we pre-stimulated T cells with 4 $\mu\text{g/ml}$ of the L10 mAb for 10 min.

To test whether the strong ERK activation observed when cells were pre-stimulated through CD43 resulted from preventing TCR-dependent Cbl-tyrosine phosphorylation, Cbl was immunoprecipitated from CD43-pre-stimulated or TCR-only activated cells. As previously reported (21) Cbl-tyrosine phosphorylation was enhanced by TCR engagement (Fig. 1C, upper panel). However, when cells were pre-stimulated through CD43, levels of Cbl-tyrosine phosphorylation were reduced below or comparable to background levels (Fig. 1C, upper panel). In agreement with previously published results (19,20), T cells treatment with PMA before TCR engagement also reduced Cbl tyrosine phosphorylation (Fig. 1C, upper panel). Activation through CD43 alone did not induce Cbl tyrosine phosphorylation [data not shown and (22)]. Pre-stimulation through CD43 partially prevented TCR-induced Crk-L association to Cbl, though the effect was no as clear as that observed when cells were pre-stimulated with TPA (Fig. 1C, upper panel). In contrast, p-ERK levels were enhanced when T cells were pre-stimulated through CD43 or with TPA before TCR engagement (Fig. 1C, lower panel). Together these results indicate that CD43 signaling prevented TCR-mediated Cbl-tyrosine phosphorylation and Crk-L association, resulting in enhanced ERK activity.

The CD43-dependent inhibition of Cbl-tyrosine phosphorylation is PKC dependent. Two independent groups have shown that PKC plays

a role in modulating Cbl functions by phosphorylating it on serine residues (19,20). Cbl-serine phosphorylation by PKC Δ prevents Cbl-tyrosine phosphorylation and thus its interactions with molecules such as Crk-L and PI3K (19). We have previously shown that CD43 engagement promotes PKC Δ kinase activity (9) and that phosphorylation of Cbl on serine residues is a PKC-dependent event (22). To test whether CD43-dependent activation of PKC Δ is required to prevent the TCR-induced Cbl tyrosine phosphorylation and ERK activation, we evaluated Cbl-tyrosine phosphorylation levels and ERK activation in the presence of RO-31-8220, a PKC inhibitor. Consistent with this hypothesis, blocking PKC activity restored TCR dependent Cbl-tyrosine phosphorylation (Fig. 2A), and reduced the levels of active ERK resulting from pre-stimulating T lymphocytes through CD43 ligation before TCR engagement (Fig. 2B). The effect of RO-31-8220 on ERK activation was as dramatic as inhibiting the ERK upstream activator MEK with the inhibitor PD98059 (Fig. 2B). To confirm that the inhibitor Ro-31-8220 was blocking PKC Δ activation, we performed in vitro kinase assays on PKC Δ immunoprecipitates. In agreement with our previous results (9), CD43 ligation induced PKC Δ activity (3.4 fold above background levels) (Fig. 2C). Under our experimental conditions, engaging the TCR alone did not induce PKC Δ kinase activity (Fig. 2C) and CD43 ligation before TCR engagement did not result in further PKC Δ kinase activation (3.7 fold). This CD43-dependent PKC Δ activity was reduced when the cells were incubated with the PKC inhibitor RO-31-8220 prior to pre-stimulation with CD43 (2.6 fold) (Fig.2C). This inhibitor also blocked PKC Δ activity from T cells stimulated with TPA before TCR engagement (Fig. 2C). Altogether, these results indicate that activation of PKC Δ resulting from CD43 ligation is required to prevent TCR-induced Cbl-tyrosine phosphorylation, resulting in enhanced ERK activation.

CD43 co-stimulatory signals prevent Cbl-dependent ZAP-70 and TCR ζ chain degradation. TCR engagement induces activation and phosphorylation of the kinase

ZAP-70, leading to phosphorylation of downstream signaling molecules (30). TCR signaling results also in ZAP-70 association to Cbl, leading to ZAP-70 ubiquitination and degradation, thus down-modulating ZAP-70 kinase activity (31-34) and overall the TCR signaling cascade. We asked therefore whether CD43 co-stimulatory signals could prevent the Cbl-mediated ZAP-70 degradation. To test this possibility we evaluated the levels of ZAP-70 associated to Cbl immunoprecipitates after T cell activation on human peripheral T cells. As previously reported, T cell receptor engagement resulted in a transient association between Cbl and ZAP-70 that was not longer observed after 5 min activation (Fig 3A). In contrast, CD43-induced Cbl-ZAP-70 interaction was still observed after 5 min stimulation (Fig 3A). Consistent with this, CD43 ligation prior to TCR engagement prolonged the TCR-induced Cbl-ZAP-70 interactions (Fig. 3A). This suggests that the duration of the Cbl-ZAP-70 interaction in co-stimulated cells results from blocking the ability of Cbl to induce ZAP-70 degradation.

It was recently shown that ZAP-70, which binds to both the TCR Δ -chain and Cbl, plays an adaptor role in the Cbl-dependent ubiquitination and degradation of the Δ chain after TCR activation (29). Δ chain ubiquitination and degradation was shown to be dependent of its tyrosine phosphorylation. Since Cbl-ZAP-70 complexes were readily detectable in cells that were co-stimulated for 5 min (Fig. 3A), we assessed whether CD43 signals could also prevent the TCR-induced degradation of the tyrosine-phosphorylated Δ chain. Δ chain was immunoprecipitated from T cells after 5 min stimulation and the levels of tyrosine phosphorylated Δ chain were determined by western blot analysis. T cells where CD43 was ligated before TCR engagement contained higher levels of tyrosine phosphorylated Δ chain, compared with cells stimulated through the TCR alone or non stimulated T cells (Fig. 3B). At this time point, cells activated through CD43 showed no detectable levels of tyrosine phosphorylated Δ chain (Fig. 3B).

Cbl-b also regulates the threshold for TCR activation by negatively regulating Vav activity (18,35). However, T cell activation through TCR and CD28 engagement reduces

Cbl-b protein levels by a mechanism involving Cbl-b ubiquitination and degradation (3). Since CD43 signaling pathway leads to Vav tyrosine phosphorylation and association with SLP-76, a key step in TCR activation (12), we tested whether ligation of CD43 before TCR engagement promoted Cbl-b-ubiquitination. T cells were stimulated with the anti-CD43 mAb L10 for different periods of time before TCR engagement, and Cbl-b ubiquitination was analyzed on Cbl-b immunoprecipitates using anti-ubiquitin antibodies. Ligation of CD43 for 2 minutes before TCR engagement resulted in substantial Cbl-b-ubiquitination, however ubiquitinated Cbl-b was no longer detected when cells were pre-stimulated for 5 or 15 min through CD43 before TCR engagement (Fig. 3C). This correlated with a reduction in Cbl-b protein levels in CD43 pre-stimulated T cells (Fig. 3D). As expected, TCR engagement was unable to induce Cbl-b ubiquitination (Fig. 3C). Together, these results suggest that CD43 co-stimulation prevented TCR-induced ZAP-70 and Δ chain degradation by Cbl and reduced Cbl-b protein levels by a ubiquitination-dependent mechanism, resulting in elevated tyrosine-phosphorylated Δ chain and ZAP-70 levels leading to enhanced ERK activation.

T cell pre-activation by CD43 enhances TCR-dependent activation of AP-1, NFkB and NFAT transcription factors and IL-2 expression. We have recently shown that engaging CD43 prior or simultaneously with TCR activation on human peripheral T lymphocytes resulted in higher expression levels of IL-2 compared to cells stimulated through the TCR alone (Fierro et al, 2006)². Expression of the IL-2 gene depends on the recruitment of the AP-1, NFAB and NFAT transcription factors (36,37). Therefore, we assessed whether T cell pre-activation by CD43 before TCR ligation resulted also in a stronger activation of these transcription factors. Pre-stimulation resulted in decreased IAB protein levels in the cytoplasm, compared to cells stimulated through the TCR or CD43 alone (Fig. 4A). Although IAB degradation correlated with c-Rel nuclear translocation, no changes in p65 nuclear levels were observed (Fig. 4A). CD43 pre-stimulation resulted also in higher NFAT nuclear levels and

higher levels of phosphorylated c-Jun, compared with those observed in T cells stimulated through the TCR or CD43 alone. In agreement with data shown above, PKC inhibition prevented I κ B degradation, c-Rel and NFAT nuclear localization and c-Jun phosphorylation (Fig. 4A). Consistent with this, the levels of IL-2 mRNA resulting from cross-linking CD43 before TCR engagement were also reduced by the PKC inhibitor RO-31-8220 (Fig. 4B). Furthermore, the levels of intracellular IL-2 resulting from CD43 pre-stimulation were partially diminished by the PLC- Δ inhibitor U73122 (Fig. 4C). We used this inhibitor because the PKC inhibitor RO-31-8220 interfered with the signal in the FL-1 channel of the flow cytometer and because we had previously shown that PLC- Δ activity is required for CD43-dependent PKC Δ activation (9). These results suggest that the enhanced activation of the transcription factors involved in IL-2 gene expression in response to CD43 ligation before TCR engagement required PKC activation.

CD43 lowers the threshold for TCR activation.

To demonstrate that CD43 regulates the thresholds for TCR activation we took advantage of the fact the T cell activation is proportional to the amount of TCR molecules engaged (38,39). Clones of the By155.16 murine T cell hybridoma expressing equivalent amounts (data not shown) of TCR-CD3 and human wild type CD43 or a mutant form of CD43 lacking its cytoplasmic domain (Δ CD43) (14) were activated with increasing amounts of anti-TCR mAb in the absence or presence of CD43 co-stimulation and their ability to produce IL-2 was determined. IL-2 production was proportional to the amount of anti-TCR mAb used for stimulation (Fig. 5, upper panel). Interestingly, TCR-induced IL-2 production by the hybridoma cells expressing the wild type human CD43 was significantly enhanced by CD43 ligation when sub-optimal doses of anti-TCR mAb were used (Fig. 5, upper panel), suggesting that CD43 signaling lowers the threshold for TCR activation. This effect was specific since a anti-CD4 mAb (Leu3a) had no effect on TCR-mediated IL-2 production (fig. 5, middle panel). In agreement with this, hybridoma cells expressing Δ CD43 did not

produce higher amounts of IL-2 in response to co-stimulation through TCR and CD43 cross-linking (Fig. 5 upper panel). This effect could not be attributed to an intrinsic defect of the Δ CD43⁺ cells to produce IL-2, since both By155.16CD43⁺ and Δ CD43⁺ cells produced equivalent amounts of IL-2 when stimulated with saturating quantities of anti-TCR mAb (CD43⁺: 146 U/IL-2; Δ CD43⁺: 135 U/IL-2). A By155.16 hybridoma cell expressing human CD4 instead of human CD43 did not show enhanced responsiveness to sub-optimal anti-TCR mAb and anti-CD43 mAb (Fig. 5, lower panel); in contrast, CD4 engagement enhanced TCR-mediated IL-2 production (Fig. 5, lower panel). Altogether, these results show that the synergistic effect observed upon the TCR-dependent IL-2 production after CD43 co-stimulation requires the cytoplasmic domain of CD43 to generate the co-stimulatory signals that lower the threshold for TCR activation.

Cross-linking CD43 with the TCR-CD3 complex induces proliferation of human and murine T cells. To further corroborate that CD43-mediated signals regulate the threshold for T cell activation, we tested whether CD43 engagement promoted T cell proliferation when low numbers of TCR molecules are engaged. The proliferation of normal human purified T cells in response to a sub-optimal dose of OKT3 mAb (0.1 μ g/ml) was dramatically enhanced when cells were also cross-linked with saturating amounts of the anti-CD43 mAb L10 (Fig. 6A). Consistent with these results, the low levels of ERK activation resulting from engaging the TCR with suboptimal doses of OKT3 were substantially enhanced by CD43 ligation (Fig. 6B). We examined also the ability of the CD43 molecule to enhance TCR-mediated proliferation of murine thymocytes and peripheral T cells. Cross-linking the CD43 molecule enhanced TCR-induced thymocyte (Fig. 6C, upper panel) and splenic T cells (Fig. 6C, lower panel) proliferation. The ability of S7 and S11 to trigger the co-receptor function of CD43 was comparable although they recognize different epitopes of the CD43 molecule (24). In contrast, cross-linking of H-2 class I molecules with the TCR using the 11.4.2 mAb and F23.1 mAb did not increase cell proliferation above that induced by anti-TCR mAb alone (data not

shown). These results show that CD43-dependent signals lower the threshold for TCR activation, enhancing TCR-induced cellular responses in human and mouse T cells.

DISCUSSION

The Cbl family of adapter molecules (Cbl, Cbl-b, and Cbl-3) plays an important role during T cell activation by the TCR (3,16,18,40). After TCR engagement, Cbl becomes tyrosine phosphorylated on several residues, allowing its interaction with downstream effector molecules like PI3K, Vav and Crk-L, ZAP-70 and Syk kinases (reviewed in (30)). The interaction of Cbl with these molecules is important to turn off the signal cascade and constitutes a mechanism to ensure adequate TCR signaling. Cbl targets some of these molecules for degradation by ubiquitination, through its E3 ubiquitin ligase activity (29,41,42). Consistent with this, Cbl^{-/-} and Cbl-b^{-/-} mice show enhanced TCR signaling and develop autoimmune like-diseases, indicating a lower T cell activation threshold in these mice (16,43). On the other hand, Cbl phosphorylation on serine residues by PKC prevents its phosphorylation on tyrosine residues resulting therefore in inhibition of the interaction with PI3K, Vav and Crk-L (19,20).

We have recently shown that CD43-mediated signals provided prior or at the same time as TCR engagement prolongs and enhances TCR-dependent signals and T cell response by preventing the association of the tyrosine phosphatase SHIP-1 to Lck, leading to enhanced and prolonged ZAP-70 and Δ chain phosphorylation (Fierro et al,2006)². This was dependent of a sustained ERK activation (Fierro et al,2006)². Since CD43 signaling pathway involves the phosphorylation of Cbl on serine residues, through a PKC-dependent process (22), we tested the possibility that the co-stimulatory activity of the CD43 molecule may result from lowering the threshold for TCR activation by blocking the negative role of Cbl. Consistent with this hypothesis, CD43 pre-stimulation of peripheral human T cells, Jurkat cells or murine T cells resulted in strong TCR-mediated activation, as measured at different levels of the activation cascade leading to IL-2 production

and cell proliferation. T cell pre-stimulation through CD43 before TCR receptor engagement had a synergistic effect on TCR-dependent ERK activation. This effect was at least in part PKCA-dependent since the PKC specific inhibitor RO-31-8220 prevented both PKCA kinase activity and ERK activation. ERK activation negatively correlated with the levels of Cbl tyrosine phosphorylation and Cbl-b ubiquitination. That is, cells that were pre-activated by CD43 ligation before TCR engagement had low levels of Cbl tyrosine phosphorylation as well as reduced levels of Cbl-Crk-L complexes, but enhanced ERK activation. Blocking PKCA activity restored normal Cbl tyrosine phosphorylation levels in response to TCR activation and reduced ERK activation.

Consistent with previous reports showing opposite effects of serine and tyrosine phosphorylation on Cbl functions (19,20), data presented here suggest that CD43 co-receptor function may result from negatively modulating Cbl functions by preventing its phosphorylation on tyrosine residues and therefore abolishing critical interactions and degradation of signaling molecules like Crk-L and ZAP-70. Cbl binds to ZAP-70 through the interaction of its PTB domain with phosphorylated tyrosine residues, promoting ZAP-70 degradation by ubiquitination (32). In turn, ZAP-70 targets the TCR Δ -chain for degradation (29). The fact that Cbl-associated ZAP-70 levels remained higher in T cells co-stimulated through CD43 and the TCR than those observed in cells stimulated through the TCR only, suggest that CD43 signaling prevents or delays ZAP-70 degradation. Furthermore, at this time point, the levels of tyrosine-phosphorylated TCR Δ -chain were higher in cells co-stimulated through CD43 and TCR engagement, than those observed in cells activated through the TCR alone. Overall, this data indicate that CD43 co-stimulatory signals block Cbl-mediated degradation of ZAP-70 and of the Δ -chain, resulting in stronger T cell response.

The ERK MAP kinase pathway plays a critical role in cell proliferation (44). In T cells, proliferation depends upon the expression of IL-2 and its high affinity receptor (30). Accordingly, IL-2 production and T cell

proliferation require ERK activation. We have recently shown that ERK plays a pivotal role in the CD43 co-stimulatory functions, since preventing ERK activity reduces IL-2 production and T cell proliferation in response to CD43 and TCR engagement (Fierro, et al, 2006)². Moreover, the induction of AP-1 and NFAB in response to CD43 ligation requires ERK activity (9). Consistent with this data, the strong ERK activation observed in cells stimulated through CD43 before TCR engagement correlated with the activation of the transcription factors critical for IL-2 gene expression: NFAT, NFAB and AP-1. The fact that the PKC inhibitor RO-31-8220 blocked ERK activation, induction of these transcription factors, of IL-2 mRNA as well as of intracellular IL-2 levels, suggests that, through the induction of PKC activity, CD43 prevents Cbl negative effects on the ERK pathway, resulting in enhanced IL-2 production and T cell proliferation in both human and murine T cells.

Regulation of the threshold for TCR activation is critical to prevent anergy and autoimmunity (17,43). Co-receptor molecules reduce the threshold for TCR activation by blocking the negative effect of members of the Cbl family on the TCR signaling pathway (2,45), thus, favoring T cell activation and a functional immune response even when low numbers of TCR are being engaged. CD43 ligation enhanced TCR-mediated proliferation and ERK activation regardless of the amount TCR molecules engaged, suggesting that CD43 signaling lowers the threshold for TCR activation. This depended on the signaling cascade generated by the cytoplasmic domain of CD43 and was not the result of mere aggregation of CD43 molecules on the cell surface, since cells expressing the truncated version of CD43 produced similar amounts of

IL-2 than cells stimulated only through the TCR. The fact that IL-2 levels were not enhanced by the L10 mAb in cells expressing the human CD4 molecule demonstrate that the effect observed in the CD43 expressing cells was not due to a non-specific interaction of the L10 mAb with the murine CD43 molecule or other cell surface protein.

Altogether, our results indicate that the co-stimulatory functions of CD43 lower the threshold for T cell activation by targeting the Cbl molecule, negatively modulating its tyrosine phosphorylation and interactions with downstream signaling molecules and promoting Cbl-b ubiquitination and degradation. This early events result in enhanced ERK activation, that is required to prevent the inactivation of tyrosine kinase Lck by its association with the tyrosine phosphatase SHIP-1 resulting in sustained ZAP-70 and Δ chain phosphorylation (Fierro et al, 2006)², this in turns results in sustained ERK activation that is required for cytokine production and T cell proliferation. Thus, when CD43 is engaged by its counter-receptor(s) on the APC prior to the TCR, a T cell may require less TCR molecules to be engaged in order to sustain a productive cellular response.

CD28 also modulates the threshold for T cell activation by targeting Cbl-b (18,45). CD28 co-stimulation was shown to induce higher ubiquitination and degradation of Cbl-b than CD3 stimulation alone, preventing Cbl-b mediated ubiquitination and inactivation of PI3K (35). The fact that CD43 and CD28 mediate Cbl inactivation and Cbl-b ubiquitination and degradation is in agreement with the results showing that CD43 and CD28 complement each other during T cell activation in the CD28^{-/-} and CD43^{-/-} mice, respectively (6,46)

REFERENCES

1. Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000) *Curr Opin Immunol* **12**, 92-98.
2. Li, D., Gal, I., Vermes, C., Alegre, M. L., Chong, A. S., Chen, L., Shao, Q., Adarichev, V., Xu, X., Koreny, T., Mikecz, K., Finnegan, A., Glantz, T. T., and Zhang, J. (2004) *J Immunol* **173**, 7135-7139

3. Zhang, J., Bardos, T., Li, D., Gal, I., Vermes, C., Xu, J., Mikecz, K., Finnegan, A., Lipkowitz, S., and Glant, T. T. (2002) *J Immunol* **169**, 2236-2240
4. Cyster, J., Somoza, C., Killeen, N., and Williams, A. F. (1990) *Eur J Immunol* **20**, 875-881
5. Shelley, C. S., Remold-O'Donnell, E., Davis, A. E., 3rd, Bruns, G. A., Rosen, F. S., Carroll, M. C., and Whitehead, A. S. (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2819-2823
6. Sperling, A. I., Green, J. M., Mosley, R. L., Smith, P. L., DiPaolo, R. J., Klein, J. R., Bluestone, J. A., and Thompson, C. B. (1995) *J Exp Med* **182**, 139-146.
7. Thurman, E. C., Walker, J., Jayaraman, S., Manjunath, N., Ardman, B., and Green, J. M. (1998) *Int Immunol* **10**, 691-701.
8. Silverman, L. B., Wong, R. C., Remold-O'Donnell, E., Vercelli, D., Sancho, J., Terhorst, C., Rosen, F., Geha, R., and Chatila, T. (1989) *J Immunol* **142**, 4194-4200.
9. Del Rio, R., Rincon, M., Layseca-Espinosa, E., Fierro, N. A., Rosenstein, Y., and Pedraza-Alva, G. (2004) *Biochem Biophys Res Commun* **325**, 133-143
10. Pedraza-Alva, G., Merida, L. B., Burakoff, S. J., and Rosenstein, Y. (1996) *J Biol Chem* **271**, 27564-27568.
11. Cruz-Munoz, M. E., Salas-Vidal, E., Salaiza-Suazo, N., Becker, I., Pedraza-Alva, G., and Rosenstein, Y. (2003) *J Immunol* **171**, 1901-1908
12. Pedraza-Alva, G., Merida, L. B., Burakoff, S. J., and Rosenstein, Y. (1998) *J Biol Chem* **273**, 14218-14224.
13. Santana, M. A., Pedraza-Alva, G., Olivares-Zavaleta, N., Madrid-Marina, V., Horejsi, V., Burakoff, S. J., and Rosenstein, Y. (2000) *J Biol Chem* **275**, 31460-31468.
14. Park, J. K., Rosenstein, Y. J., Remold-O'Donnell, E., Bierer, B. E., Rosen, F. S., and Burakoff, S. J. (1991) *Nature* **350**, 706-709.
15. Rellahan, B. L., Graham, L. J., Stoica, B., DeBell, K. E., and Bonvini, E. (1997) *J Biol Chem* **272**, 30806-30811
16. Murphy, M. A., Schnall, R. G., Venter, D. J., Barnett, L., Bertoncetto, I., Thien, C. B., Langdon, W. Y., and Bowtell, D. D. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 4872-4882
17. Bachmaier, K., Krawczyk, C., Kozieradzki, I., Kong, Y. Y., Sasaki, T., Oliveira-dos-Santos, A., Mariathasan, S., Bouchard, D., Wakeham, A., Itie, A., Le, J., Ohashi, P. S., Sarosi, I., Nishina, H., Lipkowitz, S., and Penninger, J. M. (2000) *Nature* **403**, 211-216.
18. Chiang, Y. J., Kole, H. K., Brown, K., Naramura, M., Fukuhara, S., Hu, R. J., Jang, I. K., Gutkind, J. S., Shevach, E., and Gu, H. (2000) *Nature* **403**, 216-220
19. Liu, Y., Liu, Y. C., Meller, N., Giampa, L., Elly, C., Doyle, M., and Altman, A. (1999) *J Immunol* **162**, 7095-7101.
20. Fernandez, B., Czech, M. P., and Meisner, H. (1999) *J Biol Chem* **274**, 20244-20250
21. Donovan, J. A., Wange, R. L., Langdon, W. Y., and Samelson, L. E. (1994) *J Biol Chem* **269**, 22921-22924
22. Pedraza-Alva, G., Sawadikosol, S., Liu, Y. C., Merida, L. B., Cruz-Munoz, M. E., Ocegüera-Yanez, F., Burakoff, S. J., and Rosenstein, Y. (2001) *J Biol Chem* **276**, 729-737.
23. Axelsson, B., Youseffi-Etemad, R., Hammarstrom, S., and Perlmann, P. (1988) *J Immunol* **141**, 2912-2917
24. Baecher-Allan, C. M., Kemp, J. D., Dorfman, K. S., Barth, R. K., and Frelinger, J. G. (1993) *Immunogenetics* **37**, 183-192
25. Druker, B. J., Mamon, H. J., and Roberts, T. M. (1989) *N Engl J Med* **321**, 1383-1391.
26. Rosenstein, Y., Park, J. K., Hahn, W. C., Rosen, F. S., Bierer, B. E., and Burakoff, S. J. (1991) *Nature* **354**, 233-235.
27. Gillis, S., Ferm, M. M., Ou, W., and Smith, K. A. (1978) *J Immunol* **120**, 2027-2032.
28. Cyster, J. G., Shotton, D. M., and Williams, A. F. (1991) *Embo J* **10**, 893-902
29. Wang, H. Y., Altman, Y., Fang, D., Elly, C., Dai, Y., Shao, Y., and Liu, Y. C. (2001) *J Biol Chem* **276**, 26004-26011
30. Cantrell, D. (1996) *Annu Rev Immunol* **14**, 259-274
31. Fournel, M., Davidson, D., Weil, R., and Veillette, A. (1996) *J Exp Med* **183**, 301-306.

32. Meng, W., Sawasdikosol, S., Burakoff, S. J., and Eck, M. J. (1999) *Nature* **398**, 84-90.
33. Lupher, M. L., Jr., Rao, N., Lill, N. L., Andoniou, C. E., Miyake, S., Clark, E. A., Druker, B., and Band, H. (1998) *J Biol Chem* **273**, 35273-35281
34. Rao, N., Lupher, M. L., Jr., Ota, S., Reedquist, K. A., Druker, B. J., and Band, H. (2000) *J Immunol* **164**, 4616-4626.
35. Fang, D., Wang, H. Y., Fang, N., Altman, Y., Elly, C., and Liu, Y. C. (2001) *J Biol Chem* **276**, 4872-4878.
36. Granelli-Piperno, A., and Nolan, P. (1991) *J Immunol* **147**, 2734-2739
37. Brunvand, M. W., Krumm, A., and Groudine, M. (1993) *Nucleic Acids Res* **21**, 4824-4829
38. Homer, R. J., Mamalaki, C., Kioussis, D., and Flavell, R. A. (1993) *Int Immunol* **5**, 1495-1500
39. Feito, M. J., Ballester, S., Diez-Orejas, R., Ojeda, G., Criado, G., Portoles, P., and Rojo, J. M. (1997) *Scand J Immunol* **45**, 166-174
40. Krawczyk, C., Bachmaier, K., Sasaki, T., Jones, G. R., Snapper, B. S., Bouchard, D., Kozieradzki, I., Ohashi, S. P., Alt, W. F., and Penninger, M. J. (2000) *Immunity* **13**, 463-473.
41. Joazeiro, C. A., Wing, S. S., Huang, H., Levenson, J. D., Hunter, T., and Liu, Y. C. (1999) *Science* **286**, 309-312.
42. Ota, S., Hazeki, K., Rao, N., Lupher, M. L., Jr., Andoniou, C. E., Druker, B., and Band, H. (2000) *J Biol Chem* **275**, 414-422.
43. Jeon, M. S., Atfield, A., Venuprasad, K., Krawczyk, C., Sarao, R., Elly, C., Yang, C., Arya, S., Bachmaier, K., Su, L., Bouchard, D., Jones, R., Gronski, M., Ohashi, P., Wada, T., Bloom, D., Fathman, C. G., Liu, Y. C., and Penninger, J. M. (2004) *Immunity* **21**, 167-177
44. Davis, R. J. (1993) *J Biol Chem* **268**, 14553-14556
45. Krawczyk, C. M., Jones, R. G., Atfield, A., Bachmaier, K., Arya, S., Odermatt, B., Ohashi, P. S., and Penninger, J. M. (2005) *J Immunol* **174**, 1472-1478
46. Manjunath, N., Correa, M., Ardman, M., and Ardman, B. (1995) *Nature* **377**, 535-538

FOOTNOTES

*We thank Dr. L. Pérez-Martínez for critical reading of the manuscript. This work was partially funded by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), and the Dirección General de Apoyo al Personal Académico/UNAM, México.

¹Abbreviation used are: TCR, T cell receptor; APC, antigen presenting cell; RaMIG, rabbit anti-mouse IgG; MAPK, mitogen activated protein kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase.

²Nora, A., Fierro, Gustavo Pedraza-Alva and Yvonne Rosenstein (2006). *Journal of Immunology*. In press.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. T cell pre-stimulation through CD43 engagement enhances TCR-mediated ERK activation. Human T cells (2×10^7) were untreated or stimulated with 4 $\mu\text{g/ml}$ of the L10 mAb for different periods of time (A) or with different concentrations of anti-CD43 mAb L10 for 10 min at RT (B). Then cells were washed and stimulated for 5 min with anti-CD3 mAb OKT3 (4 $\mu\text{g/ml}$) at 37°C. Total cell extracts (2×10^6 cellular equivalents) were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and blotted with anti-p-ERK and ERK antibodies. The intensity of the bands was determined by densitometry; the ratio of p-ERK/ERK is shown. C). T cell pre-stimulation by CD43 activation prevents TCR-dependent Cbl tyrosine phosphorylation. Cells were stimulated as described in methods. Cbl was immunoprecipitated from total cell lysates from non-treated cells (-), non pre-stimulated cells (-), CD43-pre-stimulated cells (L10) or TPA pre-stimulated cells (TPA).

Immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and blotted with anti-p-Tyrosine, Crk-L, or Cbl antibodies (upper panel). The levels of p-ERK and ERK were determined by immunoblotting using total cell lysates (2×10^6 ceqs) from the same experiment (lower panel). Data shown represents at least three independent experiments

Fig. 2. PKC Δ mediates the CD43-pre-stimulation effects on TCR-induced Cbl tyrosine phosphorylation and ERK activation. A) Human T lymphocytes were stimulated as described in methods. Cbl was immunoprecipitated from total cell lysates from non pre-stimulated cells (-) or CD43-pre-stimulated cells with (L10) in the absence or presence of 10 μ M RO318220 for 30 min before CD43-pre-stimulation. Immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and blotted with anti-p-Tyrosine, or Cbl antibodies. B) T cells were stimulated as indicated and ERK activation was determined. Total cell extracts (2×10^6 ceqs) were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and blotted with anti-p-ERK and ERK antibodies (upper panel). The intensity of the bands was determined by densitometry; the ratio of p-ERK/ERK is shown (lower panel). C) T cells were stimulated as indicated and PKC Δ was immunoprecipitated from total cell lysates and subjected to *in vitro* kinase assay in the presence of 32 P- Δ ATP and 1 μ g of myelin basic protein as exogenous substrate. Proteins were resolved by SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose. Membranes were exposed to X-ray films, and blotted with anti-PKC Δ antibodies. PKC Δ activity was determined as the ratio of 32 P-MBP/MBP/amount of PKC in the precipitate. Data shown is representative of at least three independent experiments.

Fig. 3. CD43 co-stimulatory signals prevent Cbl-mediated ZAP-70 and TCR chain degradation. A) 2×10^7 Jurkat cells were non treated (-) or stimulated with 4 μ g/ml L10 mAb (L10), with 4 μ g/ml OKT3 mAb (OKT3) or with both L10 and OKT3 mAbs (L10+OKT3), for the indicated period of time. Total cell extracts were prepared and Cbl was immunoprecipitated, proteins were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and blotted with anti-ZAP-70 or anti-Cbl antibodies. B) 2×10^7 Jurkat cells were non stimulated (-), or stimulated with 4 μ g/ml L10 mAb (L10), with 4 μ g/ml OKT3 mAb (OKT3) or both L10 and OKT3 mAbs (L10+OKT3) for 5 min. The Δ chain was immunoprecipitated from total cell extracts and resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and blotted with anti- Δ chain antibodies. C) 2×10^7 T lymphocytes were not pre-stimulated (-) or pre-stimulated with 4 μ g/ml of the L10 mAb for the indicated periods of time before TCR engagement (L10). After 5 min of TCR activation, total cell extracts were prepared and Cbl-b was immunoprecipitated. Cbl-b ubiquitination levels (Ub-Cbl-b) were determined by blotting with anti-ubiquitin antibodies. The immunoglobulin heavy chain is shown as loading control (IgG). D) 1×10^7 T lymphocytes were not pre-stimulated (-) or pre-stimulated with 4 μ g/ml of the L10 mAb for 10 min before TCR engagement (L10). After 5 min of TCR stimulation, total cell extracts were prepared and 2×10^6 cellular equivalents were separated by SDS-PAGE and the protein levels of Cbl-b were determined by blotting with anti-Cbl-b antibodies. ERK-2 levels are shown as loading control. Similar results were obtained in at least three independent experiments.

Fig. 4. CD43 pre-stimulation enhances TCR-induced transcription factors activation and IL-2 expression. A) 2×10^7 T lymphocytes were stimulated as indicated for 4 hr at 37°C. Total or nuclear extracts were prepared and 2×10^6 ceqs were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and blotted with anti-IAB and anti-p-cJun (total cell extracts) or with anti-c-Rel, anti-p65 or anti-NFAT antibodies (nuclear extracts). * Non-specific band. B) 2×10^7 T cells were stimulated as indicated for 4 hr at 37°C, total RNA was prepared and RT-PCR was performed to determine IL-2- and G3PDH- mRNA levels. The intensity of the bands was determined by densitometry and the ratio of IL-2/G3PDH is shown. C) 2×10^6 T lymphocytes were cell surface stained with anti-CD4-TC and intracellular stained with anti-IL2-FITC antibodies after stimulation for 4 hr in the presence of 10 μ g/ml brefeldine A. The percentage of CD4 $^+$ IL-2 $^+$ cells was determined by gating in the CD4 $^+$

population, using the CellQuest software. Data shown are representative of at least three independent experiments.

Fig. 5. CD43 signaling enhances TCR-induced IL-2 production. By155.16 CD43⁺ or Δ CD43⁺ hybridoma cells expressing equivalent amounts of the TCR-CD3 complex and wild type (Wt) or truncated (Δ IC) CD43 molecules were stimulated as described under materials and methods with the indicated amounts of anti-V Δ 8 F23.1 in the presence or absence of saturating amounts of anti-human CD43 L10 or anti human CD4 Leu3a. Cells were cultured for 24 h and supernatant was collected for IL-2 determination. Data shown here are representative of three separate experiments.

Fig. 6. CD43 signaling lowers the threshold for TCR activation and enhances TCR-mediated cell proliferation. A) Human T cells were stimulated with 0.1 μ g/ml of the OKT3 mAb alone or in the presence of 1 μ g/ml of the L10 mAb; proliferation assay was performed as described under materials and methods. B) Human T cells were non-pre-stimulated or pre-stimulated with the L10 mAb as described followed by TCR engagement with suboptimal concentrations of the OKT3 mAb. Total cell extracts were prepared and the levels of active (p-ERK) or total ERK (ERK) were determined by western blot analysis. Thymocytes (upper panel) and spleen cells (bottom panel) from B10.BR mice were cultured in 96-well plates pre-coated with the indicated amounts of anti-TCR (anti-V Δ 8) and with 0.5 μ g/ml of anti-mCD43 (S7 or S11) mAbs. Proliferation was assessed by [³H]-TdR incorporation during the last 24 h of a 96 h culture assay. Results are representative of three independent experiments.

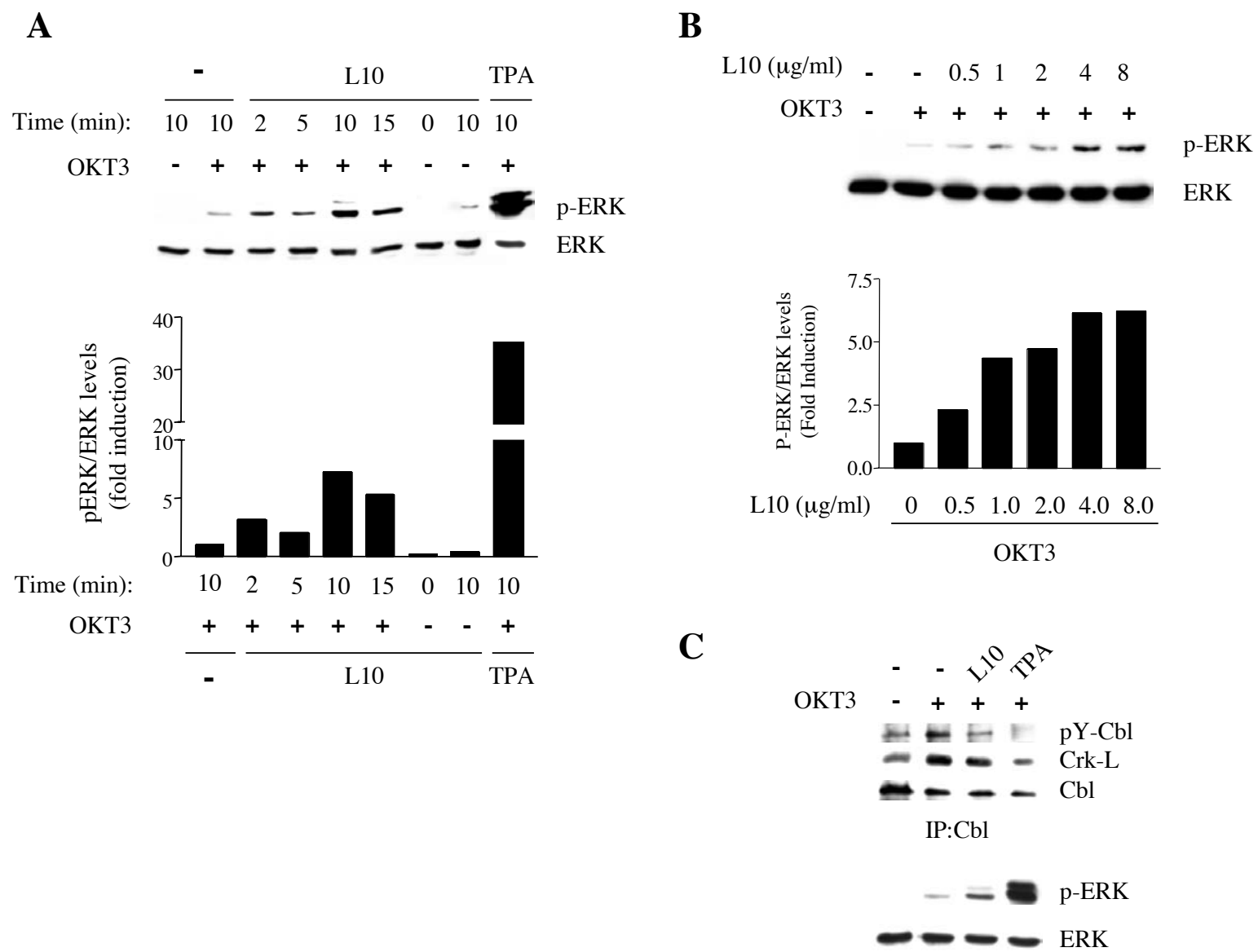


Fig. 1

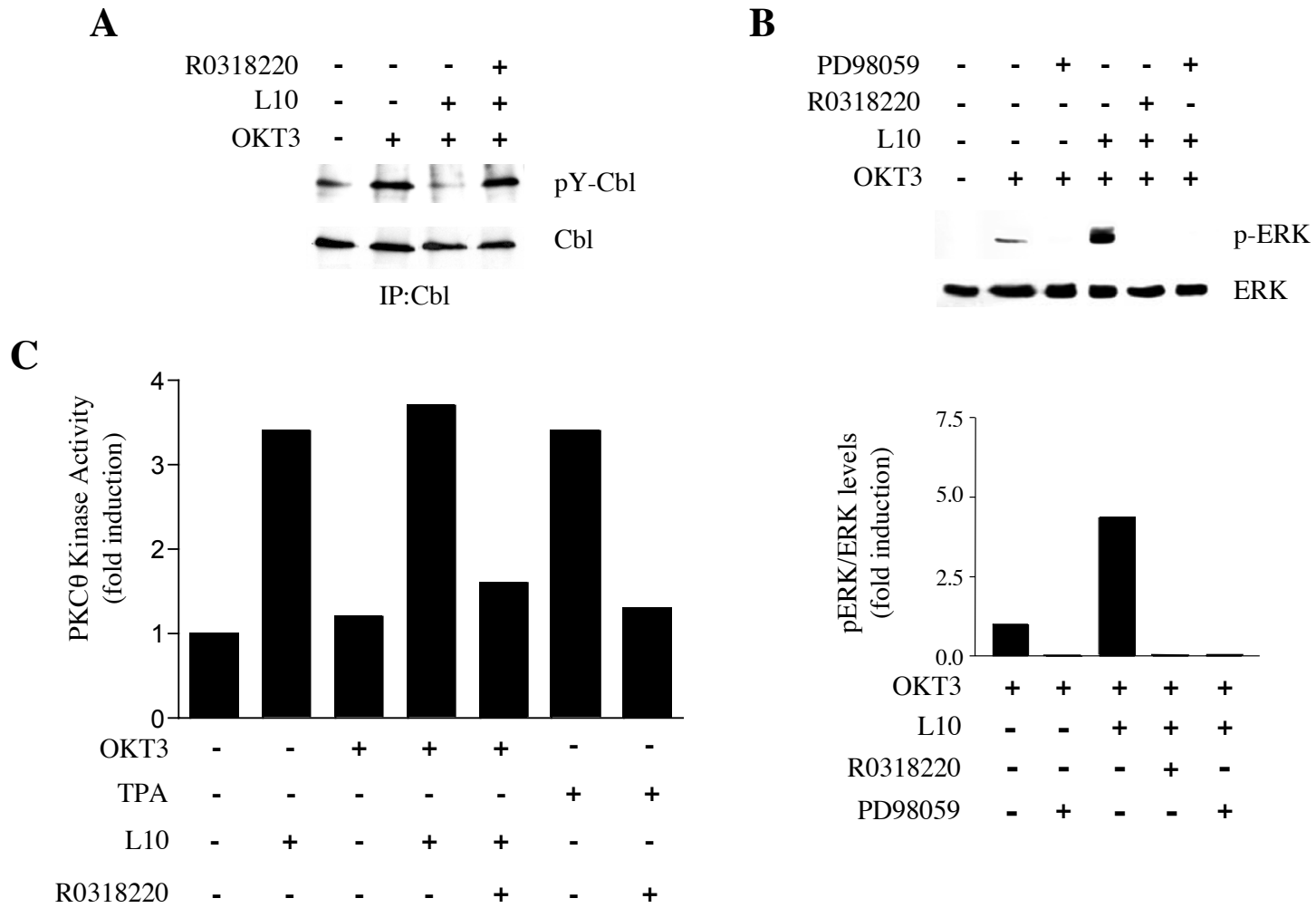


Fig. 2

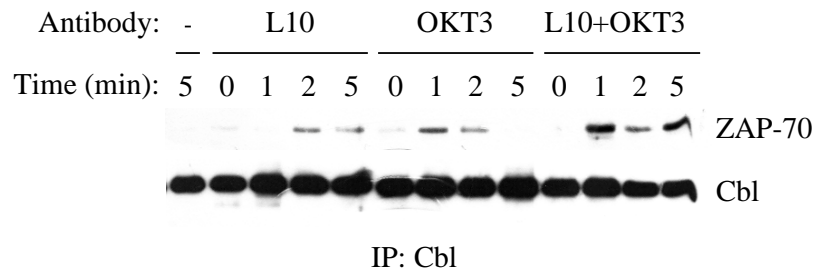
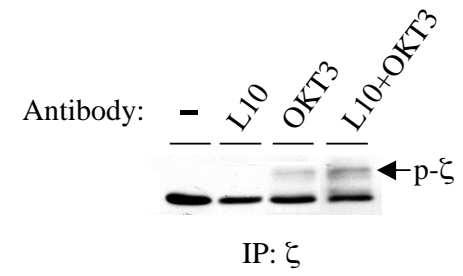
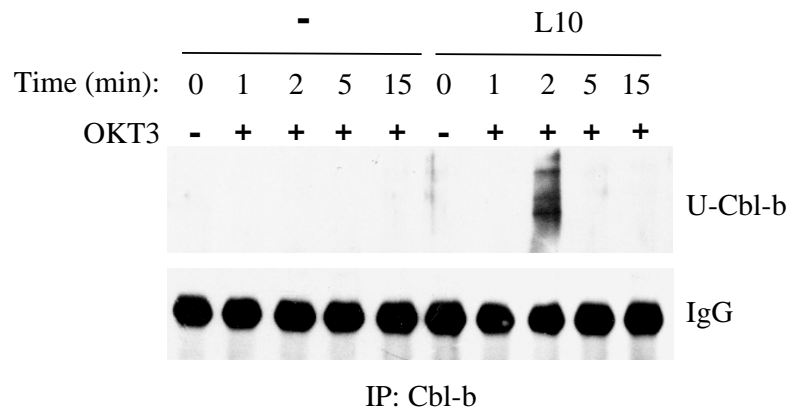
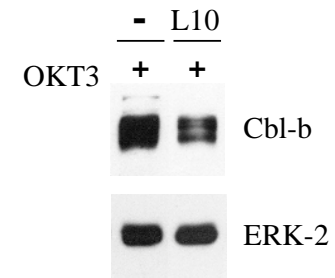
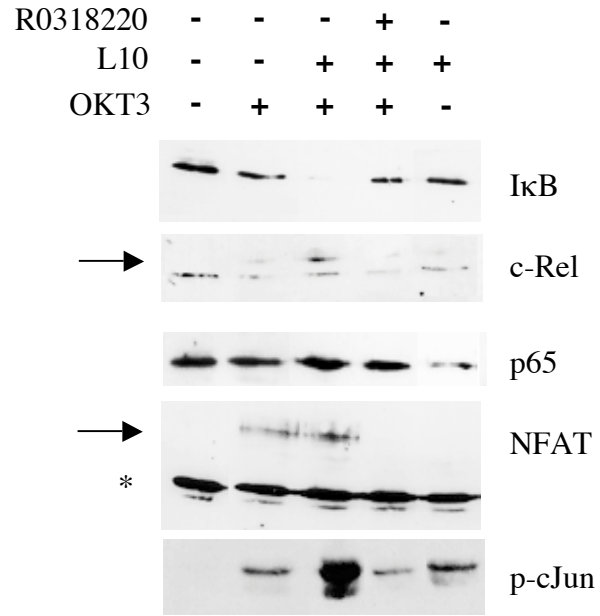
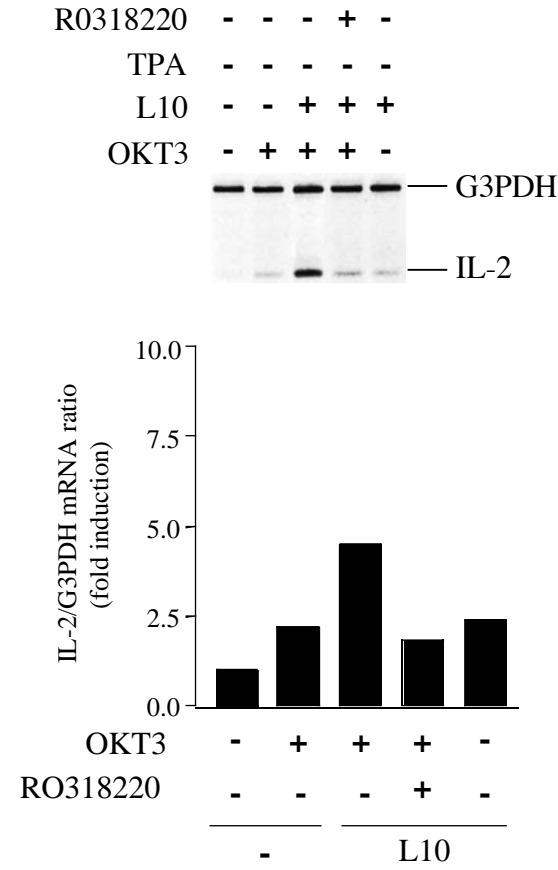
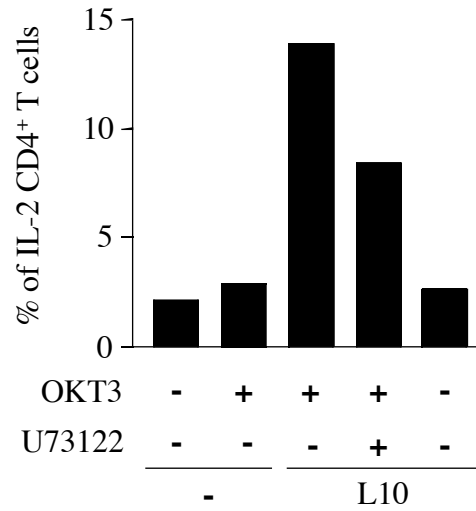
A**B****C****D**

Fig. 3

A**B****C****Fig. 4**

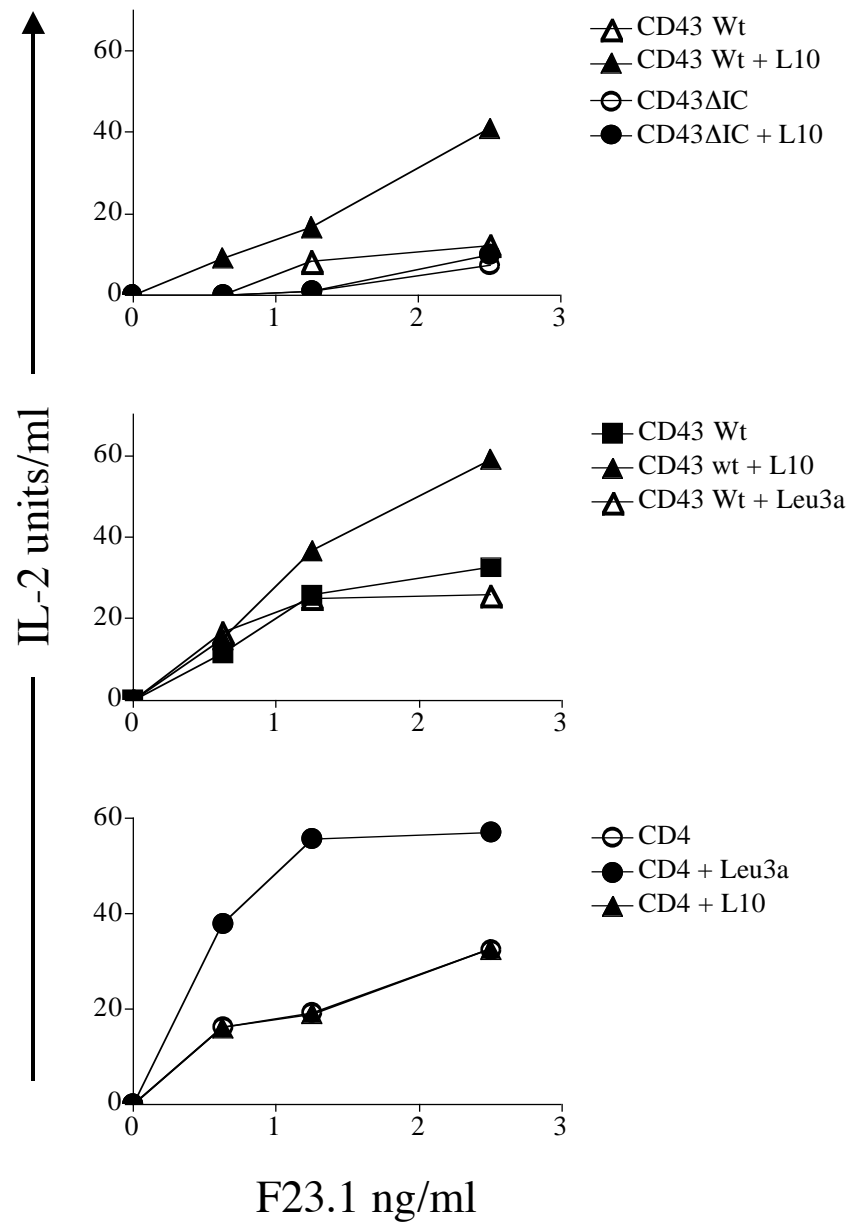


Fig. 5

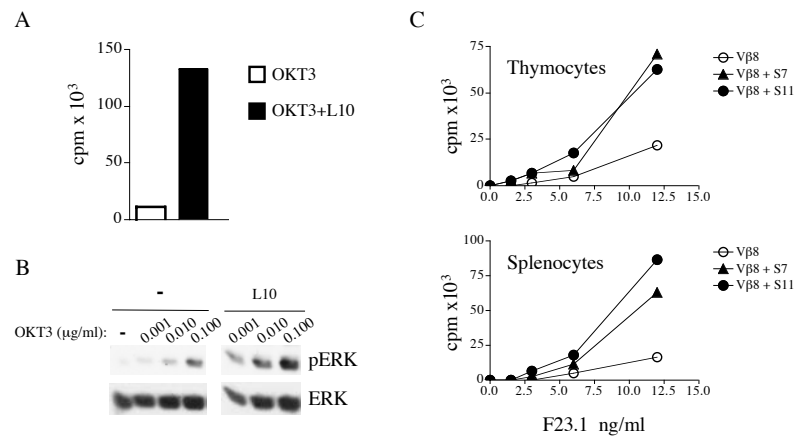


Fig. 6

T cell aggregation induced through CD43: intracellular signals and inhibition by the immunomodulatory drug leflunomide

Esther Layseca-Espinosa,^{*,†} Gustavo Pedraza-Alva,^{*} José Luis Montiel,^{*} Roxana del Río,^{*} Nora A. Fierro,^{*} Roberto González-Amaro,[†] and Yvonne Rosenstein^{*,1}

^{*}Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos; and [†]Department of Immunology, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México

Abstract: The CD43 coreceptor molecule has been shown to participate in lymphocyte adhesion and activation. Leukocyte homotypic aggregation results from a cascade of intracellular signals delivered to the cells upon engagement of different cell-surface molecules with their natural ligands. This phenomenon requires an active metabolism, reorganization of the cytoskeleton, and relocation of cell-surface molecules. The aim of this study was to identify some of the key members of the signaling cascade leading to T lymphocyte homotypic aggregation following CD43 engagement. CD43-mediated homotypic aggregation of T lymphocytes required the participation of Src kinases, phospholipase C- γ 2, protein kinase C, phosphatidylinositol-3 kinase, as well as extracellular-regulated kinase 1/2 and p38. Data shown here suggest that these signaling molecules play a central role in regulating actin cytoskeleton remodeling after CD43 ligation. We also evaluated the ability of immunomodulatory drugs such as leflunomide to block the CD43-mediated homotypic aggregation. Leflunomide blocked the recruitment of targets of the Src family kinases as well as actin polymerization, diminishing the ability of T lymphocytes to aggregate in response to CD43-specific signals, suggesting that this drug might control the migration and recruitment of lymphoid cells to inflamed tissues. *J. Leukoc. Biol.* 74: 1083–1093; 2003.

Key Words: adhesion · leukosialin · cytoskeleton · lymphocyte · signaling pathways

INTRODUCTION

Intercellular adhesion phenomena play an important role in normal and pathological processes, such as immune response, thrombosis, and metastasis of tumor cells. Cell–cell adhesion is essential for the appropriate migration, differentiation, and activation of lymphoid cells [1]. In addition, leukocyte–leukocyte interactions are thought to constitute a mechanism to recruit leukocytes to inflamed tissues. Thus, understanding the molecular interactions that regulate cell aggregation is a first step for the generation of immunomodulatory drugs targeted to reduce recruitment of lymphoid cells to inflammatory foci.

Leukocyte homotypic aggregation results from a cascade of intracellular signals delivered to the cells following engagement of different cell-surface molecules with their natural ligands or with specific antibodies. Molecules such as protein tyrosine kinases (PTKs), phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K), phospholipase C (PLC)- γ , Vav, and mitogen-activated protein kinase (MAPK) participate in cytoskeleton reorganization and relocation of membrane receptors, leading to cell-adhesion phenomena [2–5]. Syk couples activated immunoreceptors to downstream signaling events that mediate diverse cellular responses including adhesion, proliferation, differentiation, and phagocytosis [6–9]. PLC- γ has been involved in multiple cellular processes such as cytoskeletal assembly, mitogenesis, chemotaxis, and secretion. Activation of PLC- γ requires phosphorylation of key tyrosine residues by kinases such as Syk as well as its targeting to the plasma membrane through the association of its PH domain with Pi 3,4,5-triphosphate (PIP₃), a product of PI-3K [10–12]. Two isoforms of PLC- γ have been identified in mammals. PLC- γ 1 is a ubiquitously expressed protein, and PLC- γ 2 is restricted to hematopoietic lineages. PLC- γ 1 is required for T cell and natural killer (NK) function, whereas PLC- γ 2 has been found to be more important in mast cells, NK cells, B cells, and platelets, yet little is known about PLC- γ 2 function in T lymphocytes [13].

The CD43 coreceptor is an abundant glycoprotein ($\sim 1.5 \times 10^5$ molecules/cell) expressed on the membrane of all hematopoietic cells except erythrocytes and resting B cells [14, 15]. CD43 has a 235-amino acid (aa) extracellular domain, a 23-aa transmembrane domain, and a 123-aa cytoplasmic domain, all encoded by a single exon [16]. The intracytoplasmic region of the protein is necessary to transduce signals; it is rich in potentially phosphorylatable threonines and serines [17, 18] but lacks tyrosine residues as well as catalytic activity. CD43 engagement on human peripheral blood T cells and monocytes leads to cell activation and proliferation through the generation of second messengers such as diacylglycerol and inositol phosphates, protein kinase C (PKC) activation and Ca²⁺ mobilization [19, 20]. In addition, CD43 ligation on human T cells induces the association of CD43 with Src family kinases,

¹ Correspondence: Instituto de Biotecnología, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, Mexico. E-mail: yvonne@ibt.unam.mx

Received March 9, 2003; revised July 8, 2003; accepted July 23, 2003; doi: 10.1189/jlb.0303095.

presumably through the interaction of their Src homology 3 domain with a proline-rich region of the CD43 intracytoplasmic tail [21, 22]. Following Fyn and Lck recruitment, CD43-mediated signals result in the formation of macromolecular complexes, which comprise the molecular adapters Shc, Grb2, and SLP-76, as well as the guanine exchange factor Vav, ultimately resulting in the activation of the MAPK pathway and regulation of gene expression [23, 24]. Recently, CD43 was found to interact with members of the ezrin-radixin-moesin (ERM) family of proteins [25, 26], a group of molecules that link membrane receptors to the actin cytoskeleton and play a critical role in processes such as cytokinesis and cell adhesion.

The real function of CD43 remains elusive. This molecule has been implicated in T cell activation, enhancing T cell response to allogeneic or mitogenic stimulation [27, 28] and CD43-specific signals have been reported to be sufficient to activate T cells in the absence of T cell receptor (TCR) engagement [20–24]. Based on its abundance and on its elongated and heavily sialylated structure, this molecule has been considered a barrier to cellular interactions, functioning as an antiadhesive molecule. However, CD43 has been shown to participate in diverse homotypic and heterotypic adhesion phenomena [29, 30], whereby it may be regulating lymphoid cell migration toward antigen-presentation sites [31, 32]. By mimicking the interaction between CD43 and one of its putative ligands [intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, major histocompatibility complex (MHC)-I, human serum albumin; [33–35]], different anti-CD43 monoclonal antibodies (mAb) induce homotypic aggregation of monocytes, neutrophils, and T lymphocytes [29, 36, 37]. The aim of this study was to identify some of the key members of the signaling cascade leading to T lymphocyte homotypic aggregation following CD43 engagement. CD43-dependent signals mediated the homotypic adhesion of T lymphocytes through the participation of Src kinases, PLC- γ 2, PKC, PI-3K, extracellular-regulated kinase (ERK), and p38. Interestingly, the MAPKs ERK and p38 seemed to be recruited through independent pathways. Furthermore, our data suggest that Src kinases, ERK, p38, and PI-3K play a central role in regulating the actin cytoskeleton remodeling, resulting in CD43 engagement. We also found that the immunomodulatory drug leflunomide inhibited the CD43-mediated signaling pathway leading to cytoskeleton remodeling, decreasing the CD43-mediated lymphocyte aggregation.

MATERIALS AND METHODS

Cells

Jurkat cells and the Lck-deficient JCaM.1 cells were cultured in RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT), supplemented with 5% fetal calf serum (FCS), 5% bovine calf serum, 2 mM L-glutamine, 50 units/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, and 50 μ M β -mercaptoethanol. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from healthy adult donors by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation as described previously [21]. Prior to stimulation, T cells were arrested for 24 h at 37°C in RPMI-2% FCS.

Antibodies

L10, an immunoglobulin G (IgG)₁ mAb that recognizes CD43 [14], was used pure or from ascites and cross-linked with rabbit anti-mouse IgG (RaMIG). The anti-PLC- γ 2, anti-Syk, anti-p-ERK, anti-ERK, anti-p-p38, anti-p38, and anti-

Vav antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The antiphosphotyrosine 4G10 mAb was from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY).

Chemicals

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), cytochalasin B, colchicine, and 1-butanol were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). U73122, Ro318220, LY294002, PD98059, PD169316, SB202190, SB202474, PP2, PP3, herbimycin A, cyclosporin A, and pertussis toxin were from Calbiochem (San Diego, CA). All inhibitors were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO).

Homotypic aggregation assays

T cells (1×10^6) in supplemented RPMI were incubated into 48-well plates in the presence or absence of each inhibitor at 37°C for 1 h. Thereafter, anti-CD43 mAb L10 (1 μ l ascites) and RaMIG (1 μ g/ml) were added, and plates were incubated at 37°C for an additional 2 h. Finally, cells were fixed by adding 2% p-formaldehyde, and aggregates were evaluated by microscopy. The degree of cell aggregation was scored as follows: 0, the majority of cells were nonaggregated, as observed when cells were left unstimulated or incubated with cytochalasin B; +, 30% of cells were forming aggregates; ++, 60% of cells were forming aggregates; and +++, >90% of cells were forming aggregates as observed with L10 + RaMIG.

Confocal microscopy analysis

T lymphocytes were incubated in the presence of the L10 mAb plus RaMIG-fluorescein isothiocyanate (FITC) for 1 h at 37°C in 5% CO₂. Then, cells were washed with phosphate-buffered saline to remove excess antibody and were fixed with 1% p-formaldehyde at room temperature. CD43 localization was evaluated with a MRC-600 confocal scanning system equipped with a krypton/argon laser (Bio-Rad, Hercules, CA) coupled to an Axioscope microscope (Zeiss, Germany) with a PlanNeofluar 63X W Korr (aperture 1.2) objective.

T cell activation, immunoprecipitation, and immunoblot

Purified T cells (2×10^7) were incubated in 500 μ l cold RPMI with L10 (4 μ g/ml) mAb for 15 min at 4°C. Thereafter, RaMIG (4 μ g/ml) was added to each tube, and the cells were further incubated for 15 min at 4°C. When cells were activated with PMA, the chemical was added to the cells just before activation. Following preincubation, cells were activated at 37°C for different periods of time and lysed in 100 μ l lysis buffer (25 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5 mM dithiothreitol, 10 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 4 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin) for 45 min at 4°C. Lysates were spun (14,000 rpm for 10 min at 4°C), and cellular equivalents were run on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels, or precleared supernatants were incubated overnight with the indicated antibody at 4°C. Immune complexes were collected with protein A-Sepharose 4B for 1 h at 4°C and were washed twice with cold TNE-T (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100), twice with TNE (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5, 5 mM EDTA), and once with dH₂O. Immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in TBS-T (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) or with 3% bovine serum albumin in TBS-T for 2 h at room temperature and incubated with the indicated antibody. After three washes with TBS-T, the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Biomeda, Foster City, CA) was added to the membranes, and proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, UK). To probe with another antibody, membranes were stripped, washed, and then blotted.

Actin polymerization assays

Purified human T lymphocytes (1×10^6) were preincubated in the presence or absence of each inhibitor for 2 h at 37°C. Subsequently, cells were incubated with the anti-CD43 mAb L10 and RaMIG or were left untreated and then activated at 37°C for 10 min. Thereafter, changes in actin polymerization were evaluated as described [38]. Briefly, T lymphocytes were fixed, permeabilized, stained with BODIPY® FL phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR), and

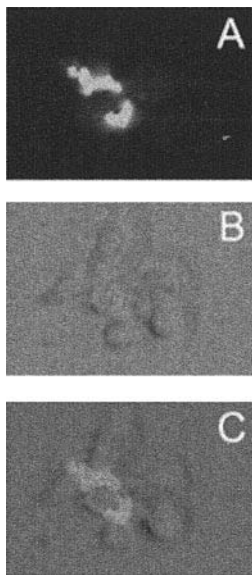


Fig. 1. CD43 is concentrated at the cell-cell contact area in T lymphocyte aggregates resulting from CD43 engagement. Normal peripheral blood T lymphocytes were incubated with the L10 mAb + RaMIG-FITC for 1 h at 37°C before fixation with 1% p-formaldehyde and observation by confocal microscopy (100×). (A) Localization of CD43 is shown in a typical cell aggregate; (B) differential interference contrast image of the same aggregate; (C) merge.

analyzed by flow cytometry on a FACSort. Results are displayed as the percentage of increase in the mean fluorescence intensity (MFI) relative to unstimulated cells.

RESULTS

CD43 localizes at the site of cell-cell contact

The CD43-specific signals have been shown to induce homotypic aggregation of lymphoid cells [29, 36, 37]. To further assess the role of this molecule in the CD43-dependent cell

aggregation, we evaluated its membrane distribution by confocal microscopy. It is interesting that we found that CD43 concentrated at cell-cell contact areas in CD43-induced T lymphocyte aggregates (**Fig. 1**), whereas when T cells were induced to aggregate with PMA, CD43 was evenly distributed on the cell surface (data not shown). These data suggest that under our experimental conditions, CD43 is an important element for the formation of supramolecular complexes necessary for intercellular adhesion of T cells induced through this receptor.

Signaling pathway involved in the CD43-dependent homotypic aggregation of T lymphocytes

To characterize the pathway involved in the homotypic adhesion of T lymphocytes resulting from CD43-specific signals, we evaluated the effect of different pharmacological inhibitors. At the concentration and length of incubation each inhibitor was used, cell viability was always greater than 90%, and none of the inhibitors altered the CD43 expression level on the surface of T lymphocytes, as determined by flow cytometry analysis (data not shown). As shown in **Table 1** and **Figure 2**, cells incubated with the L10 mAb for 2 h formed large aggregates (**Fig. 2B**), whereas those treated with cytochalasin B did not (**Fig. 2C**), indicating that remodeling of the actin cytoskeleton is required for the CD43-dependent, homotypic aggregation. In addition, we confirmed that homotypic aggregation was temperature-dependent [39], as we observed aggregate formation at 37°C but not at 4°C (data not shown). The Src tyrosine kinases, PLC- γ -, PKC-, and PI-3K-specific inhibitors (PP2, U73122, Ro318220, and LY294002, respectively) completely

TABLE 1. Effect of Different Inhibitors on T Lymphocyte Aggregation Mediated by CD43

Culture conditions	Target of inhibitors	Concentration of inhibitors	Degree of aggregation
T cells alone	–	–	–
T cells + L10	–	–	+++
T cells + L10 + DMSO	–	1:100	+++
T cells + L10 + cytochalasin B	Microfilaments	20 μ M	–
T cells + L10 + herbimycin A	PTK	1 ng/ml	+
T cells + L10 + PP2	Src-kinases	10 μ M	–
T cells + L10 + PP3	PP2 control	10 μ M	+++
T cells + L10 + U73122	PLC- γ	2 μ M	–
T cells + L10 + Ro318220	PKC	10 μ M	–
T cells + L10 + PD98059	MEK 1/2	50 μ M	+
T cells + L10 + PD169316	p38	10 μ M	+
T cells + L10 + SB202190	p38	10 μ M	+
T cells + L10 + SB202474	SB 202190 control	10 μ M	+++
T cells + L10 + LY294002	PI3-K	200 μ M	–
T cells + L10 + colchicine	Microtubules	20 μ M	+++
T cells + L10 + pentoxifylline	cAMP-PDE	1 mM	+++
T cells + L10 + leflunomide	Src-kinases	200 μ M	+
T cells + L10 + pertussis toxin	G α_i	0.1 ng/ μ l	+++
T cells + L10 + cyclosporine A	Calcineurin	0.5 ng/ml	+++
T cells + L10 + 1-butanol	PLD	0.5%	+++

T lymphocytes were incubated in the presence or absence of each inhibitor at the indicated concentrations for 1 h at 37°C. Thereafter, anti-CD43 mAb and RaMIG were added, and cells were incubated at 37°C for 2 h. Then, cells were fixed in 2% p-formaldehyde, and aggregate formation was evaluated by microscopy according to the following scale: –, the majority of cells were not aggregated; +, 30% of cells were forming aggregates; ++, 60% of cells were forming aggregates; and +++, >90% of cells were forming aggregates. MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; cAMP-PDE, cyclic adenosine monophosphate-phosphodiesterase; PLD, phospholipase D.

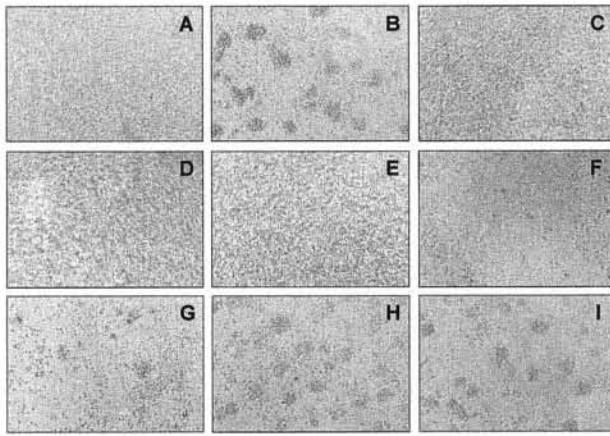


Fig. 2. Signaling pathway involved in the CD43-mediated T lymphocyte aggregation. T lymphocytes were preincubated without inhibitor (A and B) or with cytochalasin B (C), PP2 (D), U73122 (E), LY294002 (F), PD98059 (G), PP3 (H), or cyclosporine A (I) for 1 h at 37°C and subsequently, were activated with the anti-CD43 mAb L10 and RaMIG (B–I) or left untreated (A). After 2 h of incubation at 37°C, cells were fixed in 2% p-formaldehyde, and aggregation was evaluated by microscopy. Identical data were obtained in five separate experiments.

abrogated the CD43-mediated, homotypic adhesion of T lymphocytes (Fig. 2, D–F, and Table 1). The MAPK inhibitors PD98059 (MEK1/2; Fig. 2G), PD169316 (p38), and SB202190 (p38) and the general inhibitor of PTK herbimycin A induced only a partial blockade (Table 1). As expected, PP3 (Fig. 2H) and SB202474, the negative controls for PP2 and SB202190, or DMSO had no effect. Finally, molecules, such as calcineurin (Fig. 2I), PLD, the α subunit of heterotrimeric G proteins, or the microtubule machinery, were not found to participate in the CD43-mediated adhesion. Altogether, these data suggest that Src family tyrosine kinases, PLC- γ , PKC, and PI-3K, together

with the MAPKs ERK1/2 and p38, are important players in the CD43-dependent pathway leading to homotypic aggregation of T lymphocytes.

Src kinases, MAPKs, and PI-3K participate in CD43-mediated actin polymerization

To assess the participation of all these molecules in cytoskeleton rearrangements, we evaluated the binding of phalloidin as a measure of actin cytoskeleton remodeling in response to CD43 signals in the presence or absence of different pharmacological inhibitors. As shown in **Figure 3**, CD43 ligation resulted in enhanced actin polymerization, and the PI-3K and Src-kinase inhibitors LY294002 and PP2 as well as the MAPK inhibitors PD98059 (MEK1/2) and SB202190 (p38) all significantly reduced the CD43-mediated enhancement in F-actin levels, suggesting that these molecules participate in the signaling pathway leading to the CD43-dependent actin remodeling required for homotypic aggregation.

Src kinases are upstream of Syk and PLC- γ 2 in the CD43-mediated signaling pathway

Next, we assessed the recruitment of the signaling molecules involved in the CD43-dependent homotypic aggregation of T cells. Activation of PLC- γ requires the phosphorylation of tyrosine residues [13]. Although PLC- γ 1 predominates in T cells, we could not detect tyrosine phosphorylated PLC- γ 1 upon CD43 engagement (data not shown) but found that the basal level of tyrosine phosphorylation of PLC- γ 2 increased in a time-dependent manner, up until 2 h after activation, the time at which aggregate formation was evaluated (data not shown and **Fig. 4A**, compare lanes 3, 5, and 8 vs. 1). The antiphosphotyrosine blot revealed the presence of a tyrosine-phosphorylated 72-kDa protein that paralleled the phosphory-

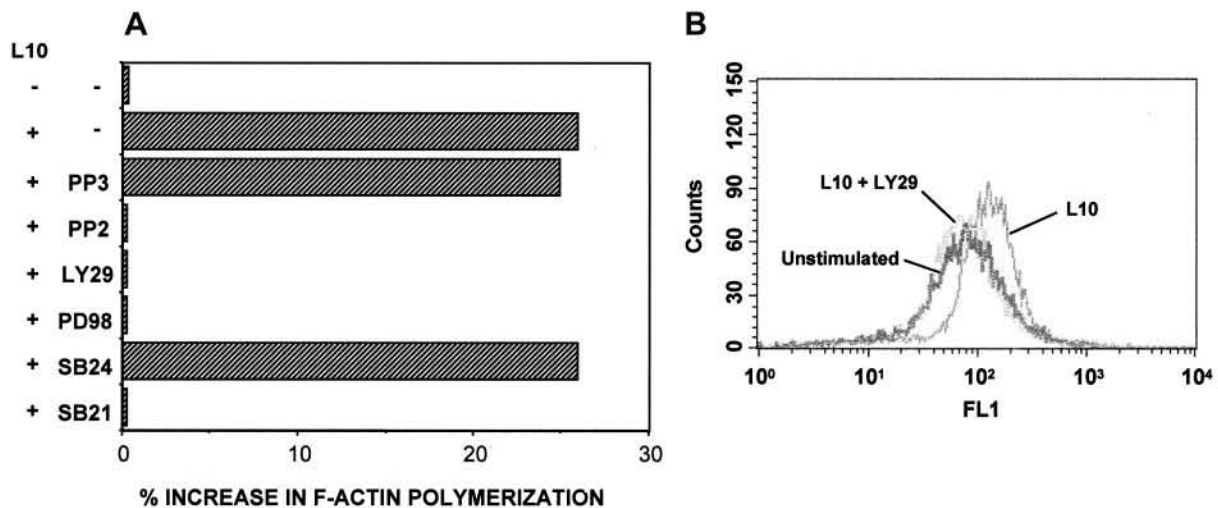


Fig. 3. Src kinases, MAPKs, and PI-3K participate in the CD43-mediated actin polymerization. (A) Purified human T lymphocytes (1×10^6) were preincubated in the presence or absence of each inhibitor for 2 h at 37°C. Subsequently, cells were incubated with the anti-CD43 mAb L10 and RaMIG or were left untreated and then activated at 37°C for 10 min. Thereafter, T lymphocytes were fixed, permeabilized, and stained with BODIPY® FL phalloidin and analyzed by flow cytometry. Results are displayed as the percentage of increase in MFI relative to unstimulated cells. Data shown are representative of three independent experiments (LY29, LY294002; PD98, PD98059; SB24, SB202474; SB21, SB202190). (B) Representative histogram from an experiment with the LY294002 inhibitor. The bold line corresponds to unstimulated cells (MFI, 113); the thin line, to CD43-activated T lymphocytes that were not pretreated with inhibitor (MFI, 143); and the dotted line, to CD43-activated T cells pretreated with LY294002 (MFI, 111).

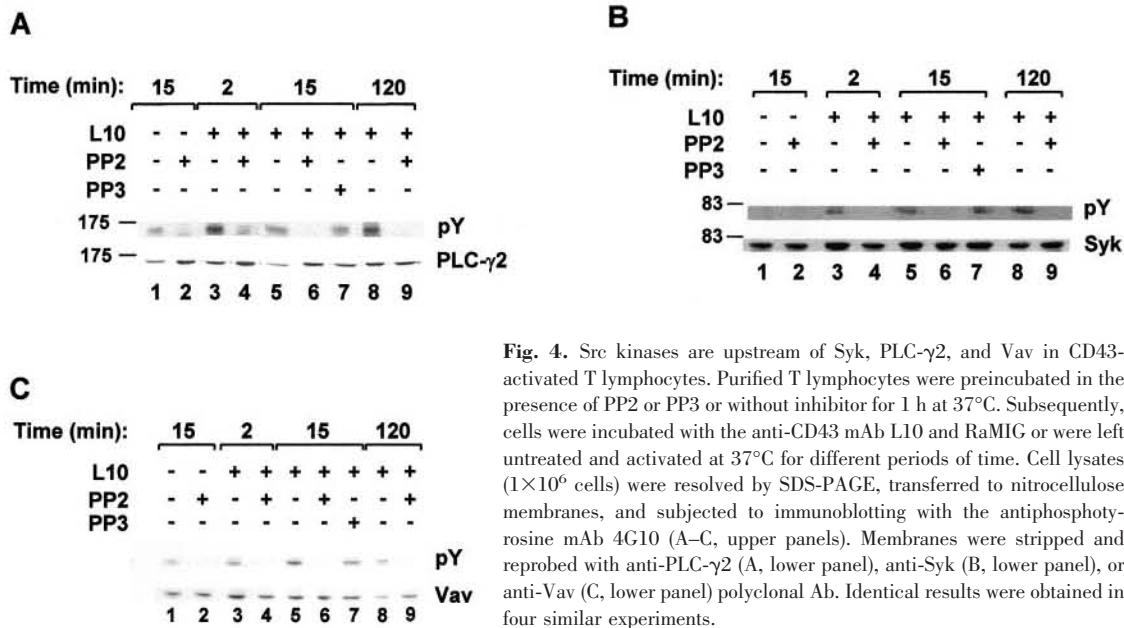


Fig. 4. Src kinases are upstream of Syk, PLC- γ 2, and Vav in CD43-activated T lymphocytes. Purified T lymphocytes were preincubated in the presence of PP2 or PP3 or without inhibitor for 1 h at 37°C. Subsequently, cells were incubated with the anti-CD43 mAb L10 and RaMIG or were left untreated and activated at 37°C for different periods of time. Cell lysates (1×10^6 cells) were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and subjected to immunoblotting with the antiphosphotyrosine mAb 4G10 (A–C, upper panels). Membranes were stripped and reprobed with anti-PLC- γ 2 (A, lower panel), anti-Syk (B, lower panel), or anti-Vav (C, lower panel) polyclonal Ab. Identical results were obtained in four similar experiments.

lation of PLC- γ 2 (data not shown). The fact that Syk has been found to associate with and to phosphorylate PLC- γ 2 [40, 41] prompted us to investigate whether this protein was Syk. The anti-Syk blot of the PLC- γ 2 immunoprecipitates showed that there is a constitutive association of Syk with PLC- γ 2 (data not shown). However, Syk tyrosine phosphorylation increased in a time-dependent manner in response to CD43-mediated signals and was still detectable 2 h after activation (Fig. 4B, compare lanes 3, 5, and 8 vs. 1).

Src kinases are thought to phosphorylate and activate Syk [8, 42]. As the Src-kinase inhibitor PP2 blocked the CD43-dependent homotypic cell adhesion (Fig. 2D and Table 1), we evaluated whether the CD43-induced phosphorylation of PLC- γ 2 and Syk was dependent on Src-kinase activity. Tyrosine phosphorylation of PLC- γ 2 was abolished by PP2 (Fig. 4A, compare lanes 4, 6, and 9 with lanes 3, 5, and 8, respectively). In addition, Syk tyrosine phosphorylation was inhibited when T lymphocytes were preincubated with PP2 (Fig. 4B, lanes 4, 6, and 9 vs. lanes 3, 5, and 8, respectively). As expected, PP3 did not affect tyrosine phosphorylation of Syk or PLC- γ 2. Furthermore, the tyrosine phosphorylation of Vav, a downstream substrate for Syk implicated in cytoskeleton rearrangement [5], was inhibited by PP2 but not PP3 (Fig. 4C). Altogether, these results suggest that activation of Src kinases is necessary to recruit Syk, PLC- γ 2, and Vav, ultimately promoting cell adhesion in response to CD43 ligation.

Lck is necessary for PLC- γ 2 recruitment in response to CD43 signals

Fyn and Lck have been reported to be activated in response to CD43-specific signals [21, 22]. To investigate the specific role of Lck or Fyn in the CD43-dependent homotypic aggregation, we evaluated the participation of Lck and Fyn on PLC- γ 2 phosphorylation in response to CD43 engagement in Jurkat cells and the Lck-deficient cell line JCaM.1. In Jurkat cells, as in resting normal T lymphocytes, PLC- γ 2 was constitutively phosphorylated (Fig. 5, lane 1), and following CD43 ligation, its phosphorylation levels increased, reaching a maximum at 2 min and decreasing below basal levels thereafter (Fig. 5, lanes 2–6). In contrast, in JCaM.1 cells, PLC- γ 2 tyrosine phosphorylation was difficult to detect throughout the experiment (Fig. 5, lanes 7–12), suggesting that Lck is necessary for PLC- γ 2 tyrosine phosphorylation and that Fyn is not sufficient.

PI-3K is upstream of Syk and PLC- γ 2 in the CD43-mediated signaling pathway

PIP₃ promotes the activation and recruitment of PLC- γ to the membrane through its N-terminal PH domain [11, 12]. Based on the fact that PI-3K inhibitors blocked CD43-mediated aggregation and actin remodeling, we investigated whether there was a cross-talk between PI-3K and the Syk and PLC- γ 2 molecules in the pathway leading to homotypic adhesion fol-

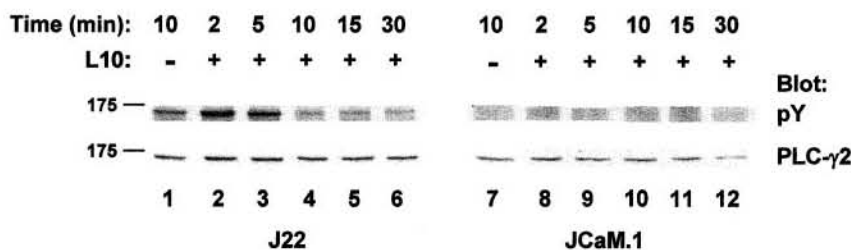


Fig. 5. Lck recruitment following CD43 ligation is necessary for PLC- γ 2 tyrosine phosphorylation. J22 or JCaM.1 cells were stimulated with the anti-CD43 mAb L10 and RaMIG or were left untreated for the indicated times. Cell lysates (1×10^6) were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and subjected to immunoblot with the antiphosphotyrosine mAb 4G10 (upper panels). Membranes were stripped and rebotted with an anti-PLC- γ 2 polyclonal Ab (lower panels). Similar results were obtained in three separate experiments.

lowing CD43 engagement. The PI-3K inhibitor LY294002 reduced the tyrosine phosphorylation of PLC- γ 2 throughout the duration of the experiment (Fig. 6A, lanes 4, 6, 8, and 10 vs. 3, 5, 7, and 9, respectively). In contrast, Syk tyrosine phosphorylation was only inhibited at longer times of stimulation (30 and 60 min; Fig. 6B, lanes 8 and 10 vs. 7 and 9, respectively) and at early times, was not affected. These data suggest that PI-3K regulates PLC- γ 2 recruitment and that at longer times, it modulates Syk activation.

ERK and p38 are recruited through independent pathways following CD43 ligation

Src kinases activation results in tyrosine phosphorylation of substrates such as PLC- γ and Vav as well as activation of several signaling pathways including the MAPK pathway. Our data with pharmacological inhibitors led us to evaluate whether ERK activation was dependent on Src-kinase activity in the CD43-specific signaling cascade. We found that ERK phosphorylation increased within 2 min of activation with L10 and remained so up until 2 h following activation (Fig. 7A, lanes 3, 6, and 8 vs. 1). ERK2 was predominantly activated in response to CD43 stimulation, whereas ERK1 was phosphorylated to a lesser extent at all time points. ERK phosphorylation was significantly reduced by PP2 (Fig. 7A, lanes 4, 7, and 9 vs. lanes 3, 6, and 8, respectively) but not PP3 (lane 5), suggesting that Src kinases are upstream of ERK in this signaling pathway.

PKC plays an important role in ERK activation in response to TCR and CD43 engagement [43]. As the role of PLC- γ in the activation of PKC is well established, we decided to explore the involvement of PLC- γ 2 and PKC in the activation of the MAPK pathway induced through CD43. The PKC inhibitor Ro318220 abrogated the CD43-mediated ERK phosphorylation (Fig. 7B, compare lanes 6, 9, and 12 vs. lanes 4, 7, and 10, respectively), whereas it was only partially reduced by the PLC- γ 2 inhibitor U73122 (Fig. 7B, compare lanes 5, 8, and 11 vs. lanes 4, 7, and 10, respectively). As expected, Ro318220 blocked PMA-induced ERK phosphorylation, whereas U73122 had no effect.

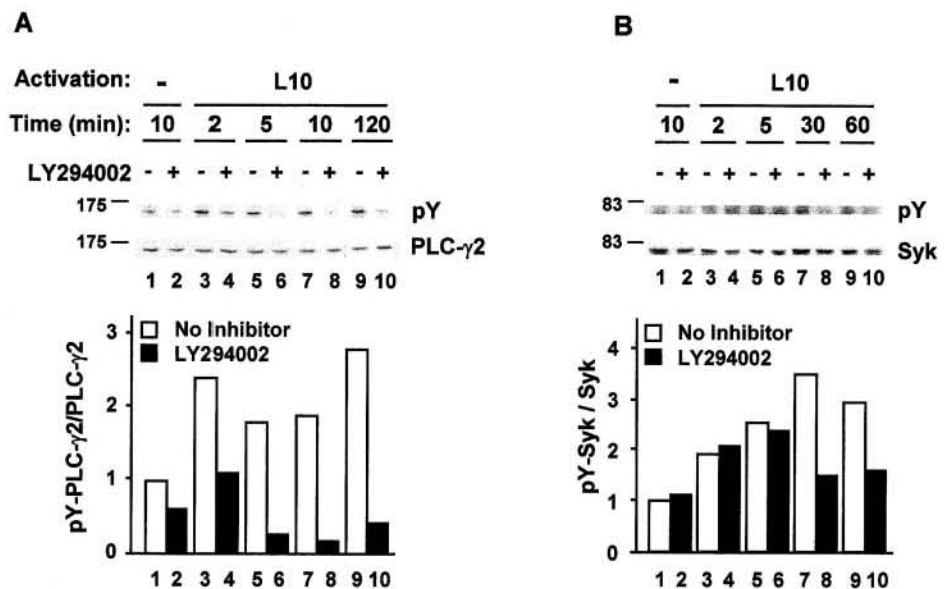
Finally, the PI-3K inhibitor LY294002 also diminished ERK phosphorylation (Fig. 7C, lanes 4, 6, and 8 vs. 3, 5, and 7, respectively). Overall, these data suggest that in the signaling pathway leading to the CD43-mediated, intercellular adhesion of T lymphocytes, Src kinases, PLC- γ , PKC, and PI-3K participate in ERK recruitment.

p38 has been implicated in actin-filament dynamics in mammalian cells [44, 45]. Data from Table 1 and the actin-remodeling assays (Fig. 3) suggested that p38 also participated in the CD43-mediated signaling pathway leading to adhesion. It is interesting that the CD43-induced p38 phosphorylation was enhanced by the PKC inhibitor Ro318220 (Fig. 8A, lanes 4, 6, and 8 vs. 3, 5, and 7, respectively) and the PI-3K inhibitor LY294002 (Fig. 8B, lanes 4, 6, and 8 vs. 3, 5, and 7, respectively), indicating that ERK and p38 are likely activated through different pathways in response to CD43 signals.

Leflunomide inhibits CD43 signals leading to homotypic aggregation of T lymphocytes

We evaluated the effect of two drugs known to regulate T lymphocyte adhesion on the CD43-dependent T lymphocyte aggregation. Leflunomide is an immunomodulatory drug that reduces spontaneous clustering of mononuclear cells in rheumatoid arthritis patients [46]. Pentoxifylline is a nonselective phosphodiesterase inhibitor with immunoregulatory and anti-inflammatory effects [47]. A771726 (200 μ M), the active metabolite of leflunomide, induced a significant reduction in the CD43-mediated homotypic aggregation (Table 1 and Fig. 9A), whereas pentoxifylline (1 mM) had no effect (Table 1). Furthermore, A771726 partially inhibited actin polymerization (Fig. 9B). Consistent with previous reports, where A771726 was found to inhibit Fyn and Lck kinase activity [48], we found that this compound was able to inhibit PLC- γ 2 (Fig. 9C) and ERK phosphorylation (Fig. 9D). In contrast, A771726 had no effect on CD69 expression by T lymphocytes activated through CD43 (Fig. 9E). These data suggest that leflunomide has a selective, inhibitory effect on CD43-mediated homotypic ad-

Fig. 6. PI-3K is upstream of Syk and PLC- γ 2 in T lymphocytes stimulated through CD43. Purified T lymphocytes were preincubated in the presence of LY294002 or with DMSO for 1 h at 37°C. Subsequently, cells were activated at 37°C with the anti-CD43 mAb L10 and RaMIG for different periods of time. Cell lysates (1×10^6 cells) were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and subjected to immunoblotting with the antiphosphotyrosine mAb 4G10 (A and B, upper panels). Membranes were stripped and reprobed with anti-PLC- γ 2 (A) or anti-Syk (B) polyclonal Ab. Graphs represent tyrosine phosphorylation fold increase corrected for the amount of protein loaded in each lane. Similar data were obtained in two additional experiments.



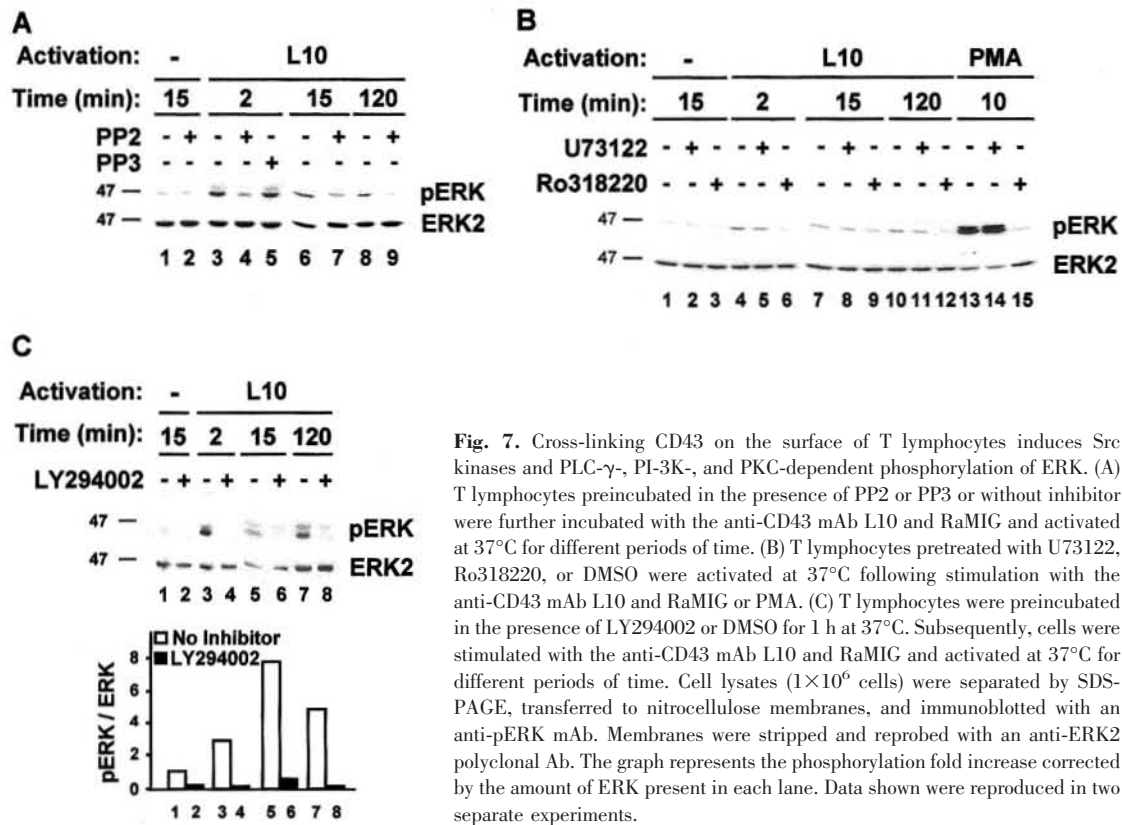


Fig. 7. Cross-linking CD43 on the surface of T lymphocytes induces Src kinases and PLC- γ -, PI-3K-, and PKC-dependent phosphorylation of ERK. (A) T lymphocytes preincubated in the presence of PP2 or PP3 or without inhibitor were further incubated with the anti-CD43 mAb L10 and RaMIG and activated at 37°C for different periods of time. (B) T lymphocytes pretreated with U73122, Ro318220, or DMSO were activated at 37°C following stimulation with the anti-CD43 mAb L10 and RaMIG or PMA. (C) T lymphocytes were preincubated in the presence of LY294002 or DMSO for 1 h at 37°C. Subsequently, cells were stimulated with the anti-CD43 mAb L10 and RaMIG and activated at 37°C for different periods of time. Cell lysates (1×10^6 cells) were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and immunoblotted with an anti-pERK mAb. Membranes were stripped and reprobed with an anti-ERK2 polyclonal Ab. The graph represents the phosphorylation fold increase corrected by the amount of ERK present in each lane. Data shown were reproduced in two separate experiments.

hesion of T lymphocytes by affecting Src-tyrosine kinase activation and cytoskeleton rearrangements.

DISCUSSION

A better knowledge of the molecules that regulate cell aggregation as well as of the signaling pathways that participate in these phenomena is necessary to have a deeper understanding of the molecular mechanisms involved in extravasation and migration of leukocytes toward inflammatory foci. Anti-CD43 mAb, such as L11, have been reported to inhibit T lymphocyte migration toward lymphoid tissues as well as sites of inflammation [31, 32]. In addition, several anti-CD43 mAb have been

found to induce lymphocyte aggregation [29, 39]. Although several molecules have been identified in the signaling cascade initiated in response to CD43 engagement, the specific pathways involved in T lymphocyte adhesion through this receptor have not been elucidated yet. Using the homotypic aggregation of T lymphocytes as a model to study the intercellular adhesion phenomena triggered through CD43 [49], we identified specific molecules required for the homotypic aggregation of T lymphocytes following CD43 ligation with the L10 mAb. Although the use of natural ligands is the most physiological way to study the role of a cell-surface molecule, we mimicked the interaction between CD43 and its potential ligands with an anti-CD43 mAb instead of the natural ligands, as these molecules (e.g., MHC-I molecules or ICAM-1) interact with other important

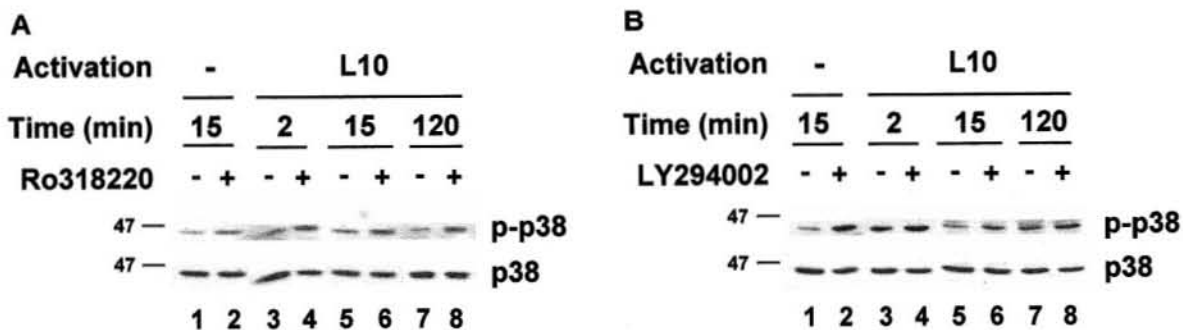


Fig. 8. CD43-induced activation of p38 occurs independently of PKC and PI-3K. Purified T lymphocytes were preincubated in the presence of Ro318220 (A), LY294002 (B), or with DMSO for 1 h at 37°C. Subsequently, cells were incubated with the anti-CD43 mAb L10 and RaMIG or were left untreated and activated at 37°C for different periods of time. Cell lysates (1×10^6 cells) were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and immunoblotted with an anti-p-p38 mAb. Membranes were stripped and reprobed with an anti-p38 polyclonal Ab. Data shown were reproduced in two separate experiments.

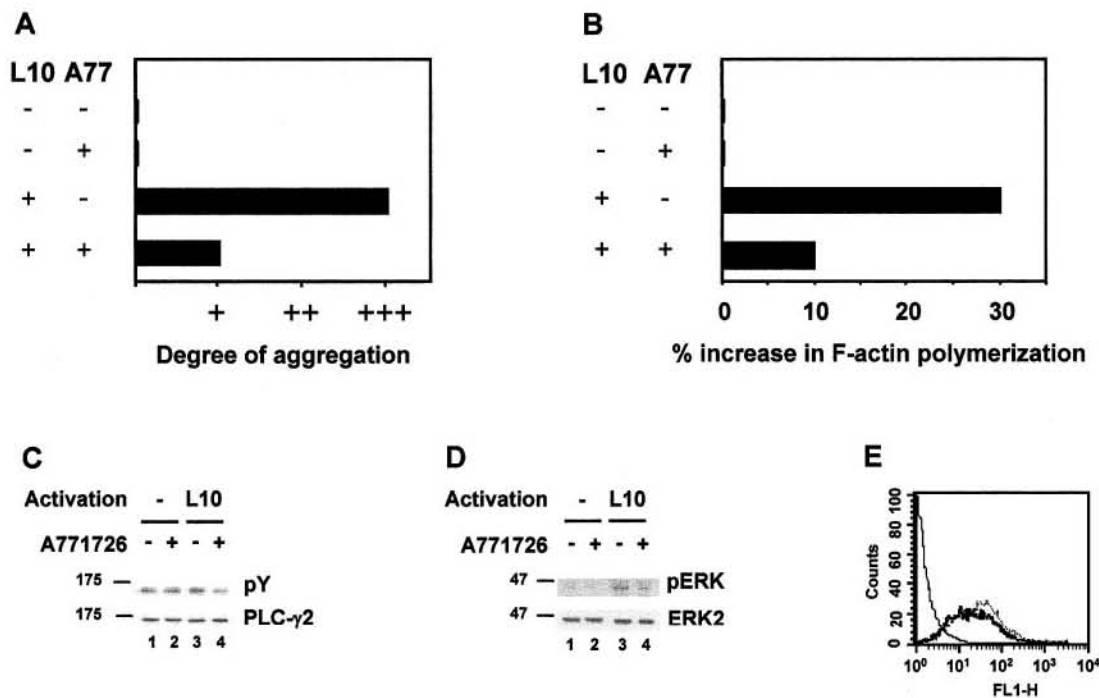


Fig. 9. Leflunomide inhibits homotypic aggregation but not activation of T cells. (A, B) T lymphocytes were preincubated in the presence of A771726 or DMSO for 1 h at 37°C. Subsequently, cells were activated or not with the anti-CD43 mAb L10 and RaMIG, and after 2 h of incubation at 37°C, cells were fixed, and lymphocyte aggregation (A) and actin polymerization (B) were assessed as described in Materials and Methods. (C, D) Cell lysates (1×10^6) of T lymphocytes preactivated at 37°C for 5 min with the L10 anti-CD43 mAb were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with the indicated antibodies. (E) T lymphocytes preincubated or not with A771726 were stimulated or not with the activating L10 anti-CD43 mAb and analyzed for CD69 expression by flow cytometry. The thin line corresponds to unstimulated cells; the bold line, to CD43-activated T lymphocytes pretreated with A771726; and the dotted line, to CD43-activated T cells that were not pretreated with A771726. Similar data were obtained in two separate experiments.

receptors on the T cell. The specific mAb we used has been shown by us and others to recruit multiple signaling molecules [21, 23, 24, 50].

Our data indicate that CD43 engagement promotes cell–cell interactions. It is feasible that CD43 induces homotypic aggregation of T lymphocytes by two distinct mechanisms. CD43 might trigger a signaling cascade that results in cell aggregation through activation of adhesion molecules such as integrins. Alternatively, CD43 might interact with its putative ligand(s) [33–35], directly mediating cell–cell interactions. The fact that anti-CD43 mAb promote homotypic adhesion of leukocytes through lymphocyte function-associated antigen-1-dependent and -independent pathways [29] supports either possibility. Data reported here also provide evidence that CD43-mediated signals are sufficient to induce cytoskeleton rearrangements as well as CD43 relocalization to the cell–cell contact area in resting, normal human T lymphocytes. Furthermore, the fact that in all experiments reported here, anti-CD43 mAb were added in solution suggests that in contrast to what was previously reported [49], a contact area with a substratum is not required for the CD43-mediated cell adhesion and CD43 relocalization.

Results from aggregation assays and biochemical data reported here allowed us to identify Lck, Syk, PLC- γ 2, PKC, PI-3K, Vav, ERK, and p38 as key components of the CD43-mediated reorganization of actin cytoskeleton and homotypic adhesion of human, normal peripheral blood T lymphocytes. The CD43-induced signaling pathway leading to homotypic

aggregation of T cells is proposed in **Figure 10**. CD43 engagement results in Fyn/Lck tyrosine phosphorylation [21, 22], facilitating the activation of PLC- γ 2, Syk, and Vav. Recruitment of PLC- γ 2 and PLC- γ -dependent PKC isoforms would lead to ERK phosphorylation. Conversely, PI-3K could participate in Syk and PLC- γ 2 activation as well as in the recruitment of novel isoforms of PKC and through them, of ERK [51]. Altogether, these molecules induce rearrangements of the actin cytoskeleton and contribute to the formation of cell aggregates.

The fact that the PLC- γ -specific inhibitor U73122 abrogated the CD43-mediated homotypic aggregation of T lymphocytes pointed at this enzyme as an important player in the CD43 signaling pathway leading to cell adhesion. Consistent with data published by Anzai et al. [52], we found that CD43 engagement resulted in tyrosine phosphorylation of PLC- γ 2 but not PLC- γ 1 (data not shown). Furthermore, we show that following CD43 ligation, Src kinases, particularly Lck, participate in PLC- γ 2 recruitment, as this molecule was not tyrosine-phosphorylated in the Lck-deficient but Fyn-positive JCaM.1 cells (Figs. 4 and 5). CD43 engagement also resulted in large aggregates of Jurkat but not of JCaM.1 cells (data not shown), suggesting that Lck is necessary for PLC- γ 2 recruitment and further downstream events leading to CD43-mediated cytoskeleton remodeling and cell–cell aggregation. Our data also suggest that PLC- γ 2 is downstream of PI-3K in the CD43-mediated aggregation of T lymphocytes. In contrast with our results, Anzai and colleagues [52] did not observe an active role for PI-3K in the CD43-mediated adhesion. This discrepancy may

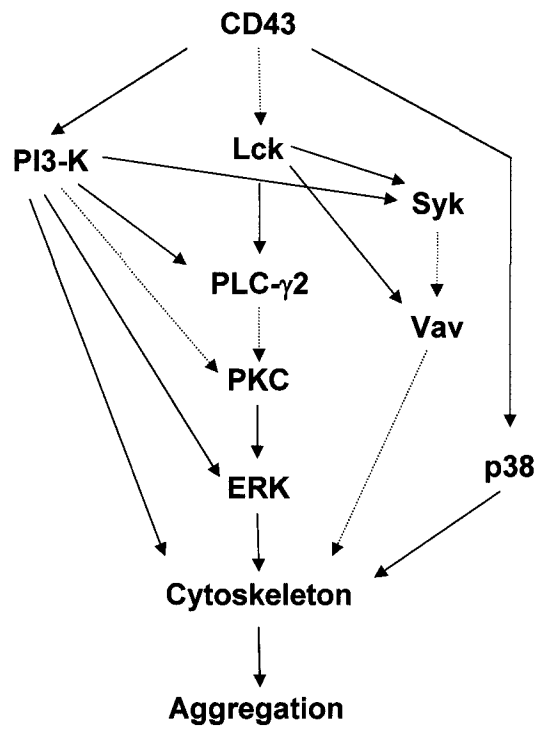


Fig. 10. Signaling pathway leading to CD43-mediated, homotypic aggregation of human T lymphocytes. CD43 engagement results in Fyn/Lck tyrosine phosphorylation, facilitating the activation of PLC- γ 2, Syk, and Vav. Recruitment of PLC- γ 2 and PLC- γ -dependent PKC isoforms would lead to ERK phosphorylation. Conversely, PI-3K could participate in Syk and PLC- γ 2 activation as well as in the recruitment of novel isoforms of PKC and through them, of ERK. Altogether, these molecules induce rearrangements of the actin cytoskeleton and contribute to the formation of cell aggregates. Continuous lines correspond to data reported in this work and dotted lines, to data previously published.

arise from different experimental systems: They investigated the signals, delivered by a mAb (DF-T1) that recognizes a CD43 neuraminidase-sensitive epitope in the myeloid cell line MO7e, adhered to fibronectin, whereas we analyzed fresh, normal peripheral blood T lymphocytes stimulated by a mAb (L10), which recognizes a neuraminidase-resistant epitope.

PLC- γ 1 and PLC- γ 2 are expressed in hematopoietic cells. PLC- γ 1 is the predominant isoform activated in T cells downstream of the TCR, and PLC- γ 2 has been reported to be critical for mast cell degranulation, NK cell activation, platelet aggregation induced by collagen, and B cell activation through the B cell receptor [53, 54]. However, little is known about the role of PLC- γ 2 in T cells. The fact that this particular isoform is recruited in T lymphocytes in response to CD43-specific signals may help to elucidate the factors that determine the selective activation of PLC- γ isoforms in T lymphocytes and other cells as well as the functional consequences of this selection in intercellular adhesion phenomena of T cells.

It has been shown that members of the MAPK family take part in cell adhesion-related events and that specific isoforms of PKC are able to recruit ERK to focal adhesions [55, 56]. In addition, ERK participates in the actin reorganization required for the establishment of integrin-induced adhesions [57]. Our experiments using the MEK1/2 inhibitor PD98059 suggest that ERK is involved in the CD43-mediated cell adhesion. The fact

that PI-3K and PKC inhibitors abrogated the CD43-dependent phosphorylation of ERK, whereas the PLC- γ inhibitor only had a partial effect (Fig. 7) suggests that in addition to the PLC- γ 2-dependent PKC isoforms, other isoforms, recruited through PI-3K but in a PLC- γ 2-independent manner, lead to the CD43-specific activation of ERK.

p38 MAPK has been implicated in cell adhesion as well as in monocyte chemotaxis [58, 59]. We found that the p38 inhibitors PD169316 and SB202190 partially blocked the CD43-mediated homotypic adhesion of human T lymphocytes (Table 1) and actin cytoskeleton remodeling (Fig. 3), suggesting that p38 also participates in these phenomena. It is interesting that opposed to what we found for ERK, PKC and PI-3K seem to play a negative, regulatory role on p38 recruitment, as the CD43-induced phosphorylation of p38 was augmented in the presence of PKC and PI-3K inhibitors (Fig. 8). PD169316 had no effect on the CD43-dependent ERK phosphorylation (data not shown), ruling out the possibility that p38 inhibitors might affect the CD43-mediated activation of ERK and as a consequence, block lymphocyte adhesion. Overall, our data suggest that p38 and ERK are recruited through different pathways in response to CD43 signals, consistent with reports describing that distinct members of the MAPK family have differential activation requirements [4, 60]. Additional investigation will provide information about the specific pathways involved in these phenomena.

Intercellular adhesion is essential throughout the different facets of the immune response. It has been postulated that CD43 is involved in T cell adhesiveness, traffic, homing, and activation. Certain immunomodulatory drugs exert their action, at least partially, by regulating the adhesion process of lymphoid cells. In patients with rheumatoid arthritis, a decrease of the spontaneous clustering of mononuclear cells is achieved after leflunomide therapy [46]. The plasma level of leflunomide in patients taking 25 mg/day is 190 μ M [61]. At this concentration, leflunomide has been reported to inhibit protein tyrosine kinases of the Src family [48]. Data we report here show that this drug significantly reduces the CD43-mediated aggregation of T lymphocytes, the actin polymerization, and tyrosine phosphorylation of PLC- γ 2 and ERK (Fig. 9), suggesting that by blocking Fyn and/or Lck, leflunomide affects the CD43-signaling pathway leading to cell aggregation. The fact that leflunomide did not inhibit CD69 expression on T lymphocytes suggests that this drug has a selective effect on adhesion/motility, and it does not seem to affect other facets of T cell activation. It has been described that expression of CD69 requires activation of members of the PKC family [62]. In our system, specific PKC isoforms activated by CD43 through a Src-independent pathway could mediate the expression of CD69.

Recently, the interaction of CD43 with the ERM molecules, a family of proteins linking membrane receptors to the actin cytoskeleton and participating in cell-shape remodeling, was found to be essential for CD43 relocalization to the uropod and formation of the immunological synapse following TCR engagement [27, 28, 49, 63]. Syk has also been shown to participate in actin cytoskeleton reorganization through the phosphorylation of Vav [5] and association with ezrin and moesin [64]. In addition, recent data from our laboratory suggest that ζ -asso-

ciated protein-70 (ZAP-70) is also recruited in response to CD43 [65]. Whether the CD43-induced movement of CD43 toward the cell-cell contact area is also dependent on ERM function and interaction with Syk or ZAP-70 is under present investigation.

Our data suggest that CD43 signals participate in T cell homotypic aggregation through a signaling machinery that involves Src kinases, PI-3K, PKC, PLC- γ 2, ERK, as well as p38, ultimately leading to cytoskeleton remodeling and relocalization of CD43 toward the site of cell-cell contact. A better knowledge of the molecular mechanisms underlying lymphocyte traffic and activation will lead to the identification of targets for new, therapeutic agents aimed to treat diverse inflammatory disorders.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grant IN209400 (Y. R.) from Dirección General de Apoyo al Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, and Grants 25307-M (Y. R.) and G35943-M (R. G-A. and Y.R) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. E. L-E. was the recipient of a doctoral fellowship from CONACyT. We thank Dr. Eduardo Huerta for leukocyte concentrates, Drs. Angélica Santana and Carlos Rosales for critical reading of the manuscript, and Erika Melchy and Xóchitl Alvarado for technical help.

REFERENCES

- Hogg, N., Landis, R. C. (1993) Adhesion molecules in cell interactions. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 383–390.
- Khunkeawla, P., Moonsom, S., Staffler, G., Kongtawelert, P., Kasinrerker, W. (2001) Engagement of CD147 molecule-induced cell aggregation through the activation of protein kinases and reorganization of the cytoskeleton. *Immunobiology* **203**, 659–669.
- Martin, T. F. J. (1998) Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 231–264.
- Hahn, M. J., Yoon, S. S., Sohn, H. W., Song, H. G., Park, S. H., Kim, T. J. (2000) Differential activation of MAP kinase family members triggered by CD99 engagement. *FEBS Lett.* **470**, 350–354.
- Fischer, K. D., Tedford, K., Penninger, J. M. (1998) Vav links antigen-receptor signaling to the actin cytoskeleton. *Semin. Immunol.* **10**, 317–327.
- Mocsai, A., Zhou, M., Meng, F., Tybulewicz, V. L., Lowell, C. A. (2002) Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* **16**, 547–558.
- Cheng, A. M., Rowley, B., Pao, W., Hayday, A., Bolen, J. B., Pawson, T. (1995) Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* **378**, 303–306.
- Chu, D. H., Morita, C. T., Weiss, A. (1998) The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol. Rev.* **165**, 167–180.
- Crowley, M. T., Costello, M. T., Fitzer-Attas, C. J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V. L. J., DeFranco, A. L. (1997) A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc γ receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* **186**, 1027–1039.
- Rhee, S. G. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 281–312.
- Bae, Y. S., Cantley, L. G., Chen, C. S., Kim, S. R., Kwon, K. S., Rhee, S. G. (1998) Activation of phospholipase C- γ by phosphatidil inositol 3,4,5-triphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**, 4465–4469.
- Falasca, M., Logan, S. K., Lehto, V. P., Baccante, G., Lemmon, M. A., Schlessinger, J. (1998) Activation of phospholipase C γ by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J.* **17**, 414–422.
- Carpenter, G., Ji, Q. S. (1999) Phospholipase C- γ as a signal-transducing element. *Exp. Cell Res.* **253**, 15–24.
- Remold-O'Donnell, E., Zimmerman, C., Kenney, D., Rosen, F. S. (1987) Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* **70**, 104–109.
- Remold-O'Donnell, E., Rosen, F. S. (1990) Sialophorin (CD43) and the Wiskott-Aldrich syndrome. *Immunodef. Rev.* **2**, 151–174.
- Cyster, J., Somoza, C., Killeen, N., Williams, A. F. (1990) Protein sequence and gene structure for mouse leukosialin (CD43), a T lymphocyte mucine without introns in the coding sequence. *Eur. J. Immunol.* **20**, 875–881.
- Shelley, C. S., Remold-O'Donnell, E., Davis, A. E., Bruns, G. A., Rosen, F. S., Carroll, M. C., Whitehead, A. S. (1989) Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2819–2823.
- Chatila, T. A., Geha, R. S. (1988) Phosphorylation of T cell membrane proteins by activators of protein kinase C. *J. Immunol.* **140**, 4308–4314.
- Silverman, L. B., Wong, R. C. K., Remold-O'Donnell, E., Vercelli, D., Sancho, J., Terhorst, C., Rosen, F., Geha, R., Chatila, T. (1989) Mechanism of mononuclear cell activation by an anti-CD43 (sialophorin) agonistic antibody. *J. Immunol.* **142**, 4194–4200.
- Wong, R. C. K., Remold-O'Donnell, E., Vercelli, D., Sancho, J., Terhorst, C., Rosen, F., Geha, R., Chatila, T. (1990) Signal transduction via leukocyte antigen CD43 (sialophorin). Feedback regulation by protein kinase C. *J. Immunol.* **144**, 1455–1460.
- Pedraza-Alva, G., Merida, L. B., Burakoff, S. J., Rosenstein, Y. (1996) CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 27564–27568.
- Alvarado, M., Klassen, C., Cerny, J., Horejsi, V., Schmidt, R. E. (1995) MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1051–1055.
- Pedraza-Alva, G., Merida, L. B., Burakoff, S. J., Rosenstein, Y. (1998) T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and MAPK pathway activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 14218–14224.
- Santana, M. A., Pedraza-Alva, G., Olivares-Zavaleta, N., Madrid-Marina, V., Horejsi, V., Burakoff, S. J., Rosenstein, Y. (2000) CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NF κ B transcription factors in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 31460–31468.
- Allenspach, E. J., Cullinan, P., Tong, J., Tang, Q., Tesciuba, A. G., Cannon, J. L., Takahashi, S. M., Morgan, R., Burkhardt, J. K., Sperling, A. I. (2001) ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* **15**, 739–750.
- Delon, J., Kaibuchi, K., Germain, R. N. (2001) Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* **15**, 691–701.
- Rosenstein, Y., Santana, A., Pedraza-Alva, G. (1999) CD43, a molecule with multiple functions. *Immunol. Res.* **20**, 89–99.
- Ostberg, J. R., Barth, R. K., Frelinger, J. G. (1998) The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43. *Immunol. Today* **19**, 546–550.
- De Smet, W., Walter, H., Van Hove, L. (1993) A new CD43 monoclonal antibody induces homotypic aggregation of human leukocytes through a CD11a/CD18-dependent and -independent mechanism. *Immunology* **79**, 46–54.
- Sanchez-Mateos, P., Campanero, M. R., del Pozo, M. A., Sanchez-Madrid, F. (1995) Regulatory role of CD43 leukosialin on integrin-mediated T-cell adhesion to endothelial and extracellular matrix ligands and its polar redistribution to a cellular uropod. *Blood* **86**, 2228–2239.
- Johnson, G. G., Mikulowska, A., Butcher, E. C., McEvoy, L. M., Michie, S. A. (1999) Anti-CD43 monoclonal antibody LI1 blocks migration of T cells to inflamed pancreatic islets and prevents development of diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* **163**, 5678–5685.
- McEvoy, L. M., Sun, H., Frelinger, J. G., Butcher, E. C. (1997) Anti-CD43 inhibition of T cell homing. *J. Exp. Med.* **185**, 1493–1498.
- Rosenstein, Y., Park, J. K., Hahn, W. C., Rosen, F. S., Bierer, B. E., Burakoff, S. J. (1991) CD43, a molecule defective in the Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* **354**, 233–235.
- Stöckl, J., Majdic, O., Kohl, P., Pickl, W. F., Menzel, J. E., Knapp, W. (1996) Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation. *J. Exp. Med.* **184**, 1769–1779.
- Nathan, C., Xie, Q., Halbwachs-Mecarelli, L., Jin, W. W. (1993) Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43 (sialophorin, leukosialin). *J. Cell Biol.* **122**, 243–256.

36. Nong, Y. H., Remold-O'Donnell, E., LeBien, T. W., Remold, H. G. (1989) A monoclonal antibody to sialophorin (CD43) induces homotypic adhesion and activation of human monocytes. *J. Exp. Med.* **170**, 259–267.
37. Kuijpers, T. W., Hoogerwerf, M., Kuijpers, K. C., Schwartz, B. R., Harlan, J. M. (1992) Cross-linking of sialophorin (CD43) induces neutrophil aggregation in a CD18-dependent and a CD18-independent way. *J. Immunol.* **149**, 998–1003.
38. Villalba, M., Coudronniere, N., Deckert, M., Teixeira, E., Mas, P., Altman, A. (2000) A novel functional interaction between Vav and PKC θ is required for TCR-induced T cell activation. *Immunity* **12**, 151–160.
39. Cyster, J. G., Williams, A. F. (1992) The importance of cross-linking in the homotypic aggregation of lymphocytes induced by anti-leukosialin (CD43) antibodies. *Eur. J. Immunol.* **22**, 2565–2572.
40. Gross, B. S., Melford, S. K., Watson, S. P. (1999) Evidence that phospholipase C- γ 2 interacts with SLP-76, Syk, Lyn, LAT and the Fc receptor γ -chain after stimulation of the collagen receptor glycoprotein VI in human platelets. *Eur. J. Biochem.* **263**, 612–623.
41. Takata, M., Sabe, H., Hata, A., Inazu, T., Homma, Y., Nukada, T., Yamamura, H., Kurosaki, T. (1994) Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *EMBO J.* **13**, 1341–1349.
42. Turner, M., Schweighoffer, E., Colucci, F., Di Santo, J. P., Tybulewicz, V. L. (2000) Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol. Today* **21**, 148–154.
43. Pedraza-Alva, G., Sawadikosol, S., Liu, Y. C., Merida, L. B., Cruz-Muñoz, M. E., Ocegüera-Yañez, F., Burakoff, S. J., Rosenstein, Y. (2001) Regulation of Cbl molecular interactions by the co-receptor molecule CD43 in human T cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 729–737.
44. Saklatvala, J., Rawlinson, L., Waller, R. J., Sarsfield, S., Lee, J. C., Morton, L. F., Barnes, M. J., Farndale, R. W. (1996) Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue. *J. Biol. Chem.* **271**, 6586–6589.
45. Guay, J., Lambert, H., Gingras-Breton, G., Lavoie, J. N., Huot, J., Landry, J. (1997) Regulation of actin filament dynamics by p38 MAP kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J. Cell Sci.* **110**, 357–368.
46. Dimitrijevic, M., Bartlett, R. R. (1996) Leflunomide, a novel immunomodulating drug, inhibits homotypic adhesion of peripheral blood and synovial fluid mononuclear cells in rheumatoid arthritis. *Inflamm. Res.* **45**, 550–556.
47. Dominguez-Jimenez, C., Sancho, D., Nieto, M., Montoya, M. C., Barreiro, O., Sanchez-Madrid, F., Gonzalez-Amaro, R. (2002) Effect of pentoxifylline on polarization and migration of human leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 588–596.
48. Xu, X., Williams, J. W., Bremer, E. G., Finnegan, A., Chong, A. S. F. (1995) Inhibition of protein tyrosine phosphorylation in T cells by a novel immunosuppressive agent, leflunomide. *J. Biol. Chem.* **270**, 12398–12403.
49. Serrador, J. M., Nieto, M., Alonso-Lebrero, J. L., del Pozo, M. A., Calvo, J., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Lozano, F., Gonzalez-Amaro, R., Sanchez-Mateos, P., Sanchez-Madrid, F. (1998) CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* **91**, 4632–4644.
50. Barat, C., Tremblay, M. J. (2002) Engagement of CD43 enhances human immunodeficiency virus type 1 transcriptional activity and virus production that is induced upon TCR/CD3 stimulation. *J. Biol. Chem.* **277**, 28714–28724.
51. Li, X., Carter, R. H. (2000) CD19 signal transduction in normal, human B cells: linkage to downstream pathways requires phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C and Ca²⁺. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1576–1586.
52. Anzai, N., Gotoh, A., Shibayama, H., Broxmeyer, H. E. (1999) Modulation of integrin function in hematopoietic progenitor cells by CD43 engagement: possible involvement of protein tyrosine kinase and phospholipase C- γ . *Blood* **93**, 3317–3326.
53. Wang, D., Feng, J., Wen, R., Marine, J. C., Sangster, M. Y., Parganas, E., Hoffmeyer, A., Jackson, C. W., Cleveland, J. L., Murray, P. J., Ihle, J. N. (2000) Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity* **13**, 25–35.
54. Hashimoto, A., Takeda, K., Inaba, M., Sekimata, M., Kaisho, T., Ikehara, S., Homma, Y., Akira, S., Kurosaki, T. (2000) Essential role of phospholipase C-gamma 2 in B cell development and function. *J. Immunol.* **165**, 1738–1742.
55. Ku, H., Meier, K. E. (2000) Phosphorylation of paxillin via Erk in EL4 thymoma cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 11333–11340.
56. Besson, A., Davy, A., Robbins, S. M., Yong, V. W. (2001) Differential activation of ERKs to focal adhesions by PKC epsilon is required for PMA-induced adhesion and migration of human glioma cells. *Oncogene* **20**, 7398–7407.
57. Brunton, V. G., Fincham, V. J., McLean, G. W., Winder, S. J., Paraskeva, C., Marshall, J. F., Frame, M. C. (2001) The protrusive phase and full development of integrin-dependent adhesions in colon epithelial cells require FAK- and ERK-mediated actin spike formation: deregulation in cancer cells. *Neoplasia* **3**, 215–226.
58. Paine, E., Palmantier, R., Akiyama, S. K., Olden, K., Roberts, J. D. (2000) Arachidonic acid activates mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase 2 and mediates adhesion of a human breast carcinoma cell line to collagen type IV through a p38 MAP kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 11284–11290.
59. Ashida, N., Arai, H., Yamasaki, M., Kita, T. (2001) Distinct signaling pathways for MCP-1-dependent integrin activation and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **276**, 16555–16560.
60. Maulon, L., Mari, B., Bertolotto, C., Ricci, J. E., Luciano, F., Belhacene, N., Deckert, M., Baier, G., Auberger, P. (2001) Differential requirements for ERK1/2 and p38 MAPK activation by thrombin in T cells. Role for p59^{lyn} and PKC ϵ . *Oncogene* **20**, 1964–1972.
61. Mladenovic, V., Domljan, Z., Rozman, B., Jajic, I., Mihajlovic, D., Dordevic, J., Popovic, M., Dimitrijevic, M., Zivkovic, M., Campion, G. (1995) Safety and effectiveness of leflunomide in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. Results of a randomized, placebo-controlled, phase II study. *Arthritis Rheum.* **38**, 1595–1603.
62. Cebrián, M., Redondo, J., López-Rivas, A., Rodríguez-Tarduchy, G., De Landazuri, M. O., Sánchez-Madrid, F. (1989) Expression and function of AIM, an activation inducer molecule of human lymphocytes, is dependent on the activation of protein kinase C. *Eur. J. Immunol.* **19**, 809–815.
63. Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S. (1998) Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J. Cell Biol.* **140**, 885–895.
64. Urzainqui, A., Serrador, J. M., Viedma, F., Yañez-Mo, M., Rodriguez, A., Corbi, A. L., Alonso-Lebrero, J. L., Luque, A., Deckert, M., Vazquez, J., Sanchez-Madrid, F. (2002) ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1. *Immunity* **17**, 401–412.
65. Cruz-Muñoz, M. E., Salas-Vidal, E., Salaiza-Suazo, N., Becker, I., Pedraza-Alva, G., Rosenstein, Y. (2003) The CD43 coreceptor molecule recruits the zeta-chain as part of its signaling pathway. *J. Immunol.* **171**, 1901–1908.

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 I/ 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 I-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. Rottlerin, G δ 6976, 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 $^{\circ}$ 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, rottlerin (6 μ M), PD98059 (50 μ M), G δ 6976 (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 $^{\circ}$ C. Cells were washed, resuspended in FACS solution, and fixed with 2% paraformaldehyde. Cells were analyzed with a FACSort 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 $^{\circ}$ C. Cell lysates were spun at 13,000g for 15 min at 4 $^{\circ}$ 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 (Biomedica). 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 [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 nucleofector 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.

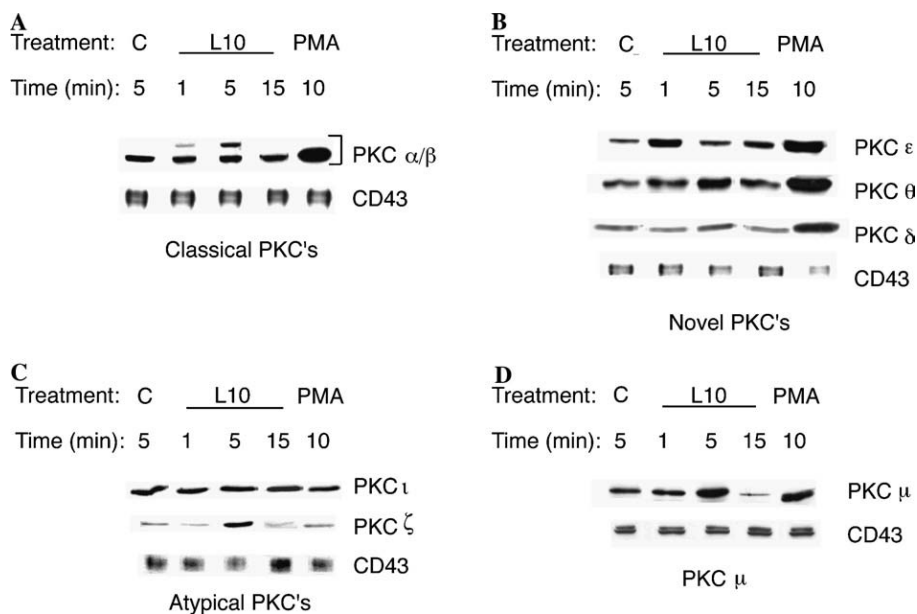


Fig. 1. CD43 induces the translocation to the membrane of PKC α/β , ϵ , θ , ζ , and μ . Jurkat cells were activated as described under Materials and methods with R α MIg only ("C"), the anti-CD43 L10 mAb or PMA. Membrane fractions were prepared and the levels of (A) PKC α/β , (B) PKC ϵ , PKC θ , and 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 Gö6976, 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, Gö6976, 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 Gö6976 (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

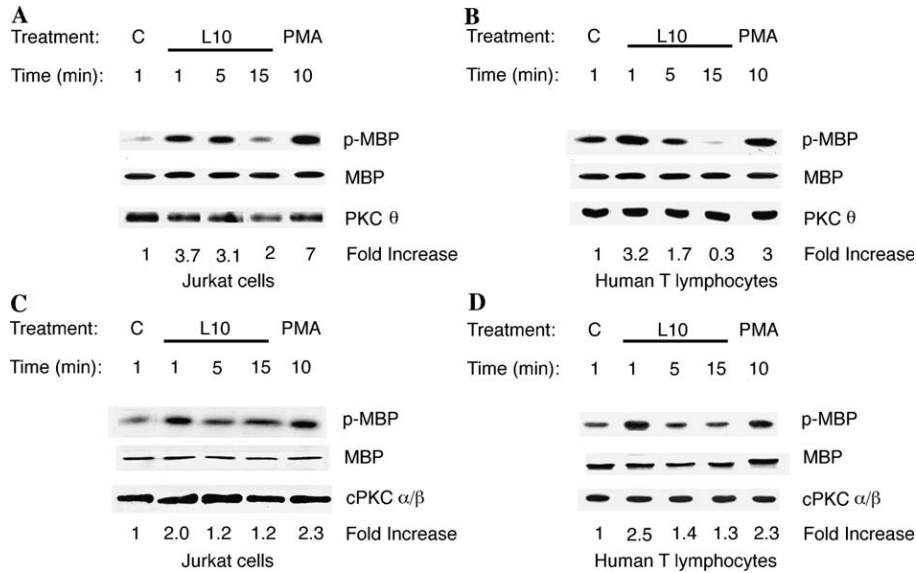


Fig. 2. CD43 engagement promotes PKC θ and PKC α/β catalytic activity. Jurkat cells (A,C) or human T lymphocytes (B,D) were stimulated as described under Materials and methods with R α MIg only (“C”), the anti-CD43 L10 mAb or with PMA. PKC θ (A,B) or PKC α/β (C,D) were immunoprecipitated from precleared 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-PKC θ or PKC α/β antibodies (bottom panel). “Fold Increase” represent the phosphorylation levels of MBP corrected for the amount of MBP present, and PKC θ or cPKC immunoprecipitated in each experimental condition was compared with the value obtained in control cells. A representative experiment of three is shown.

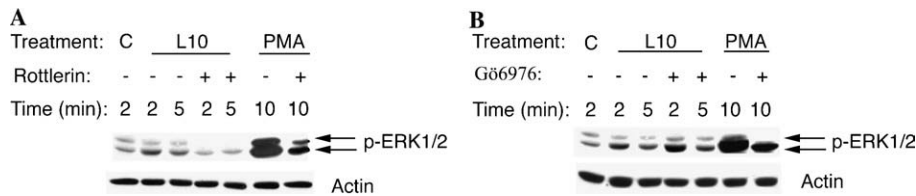


Fig. 3. Activation of the MAP kinase pathway induced in response to CD43-mediated signals is PKC θ -dependent. Jurkat cells were activated with R α MIg (“C”), with the anti-CD43 L10 mAb or with PMA. Before activation, cells were incubated with rottlerin (A) or Gö6976 (B). Whole cell extracts were prepared 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- κ B, 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 PKC θ -ERK pathway. Blocking PKC θ 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 PKC θ 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 PKC θ in the CD43-mediated signaling cascade leading to AP-1 DNA binding, we tested whether PKC θ 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 PKC θ inhibitor rottlerin, while blocking MEK or cPKC α/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

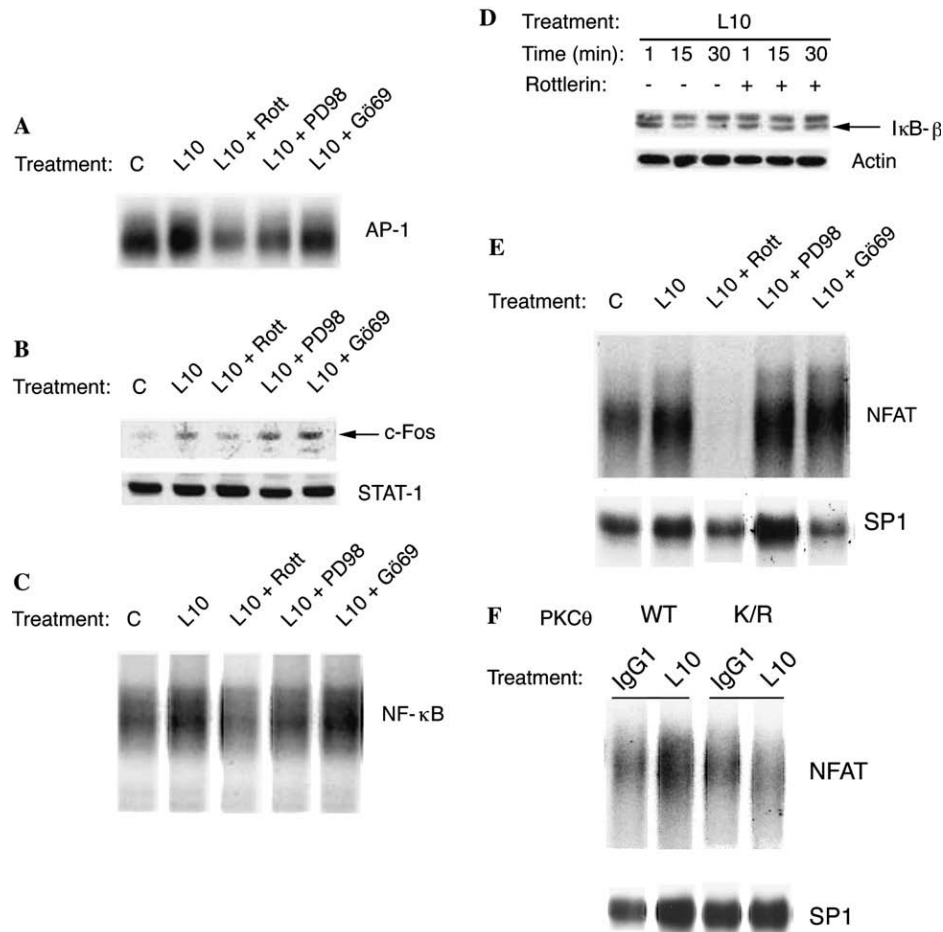


Fig. 4. PKC θ activation is required to induce AP-1, NF- κ B, and NFAT DNA binding in response to CD43 engagement. (A) Jurkat cells were stimulated as described under Materials and methods with α MiG only ("C") or the anti-CD43 mAb L10 for 8 h. Where indicated, cells were stimulated in the presence of rottlerin (Rott), PD98059 (PD98), or Gö6976 (Gö69). 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 Gö6976 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

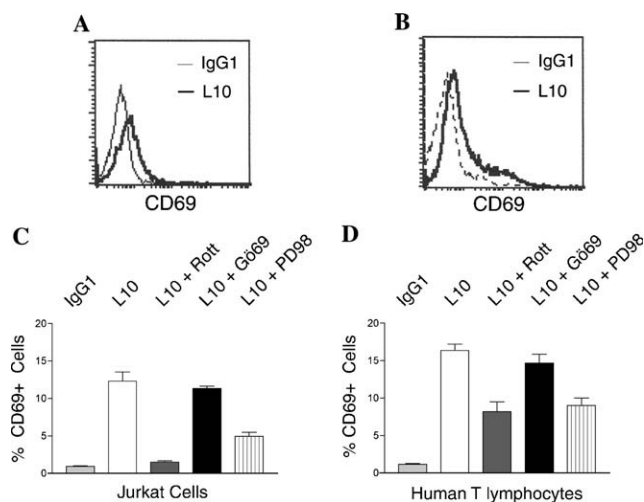


Fig. 5. CD43-dependent CD69 expression requires PKC θ activation. (A) Jurkat cells (1×10^6) or (B) human T lymphocytes (1×10^6) were stimulated for 24 h as described under Materials and methods with isotype control antibody (IgG1) or with the anti-CD43 L10 mAb, then cells were stained and CD69 expression 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 cPKC α/β and nPKC (ϵ and θ).

The activation of PKC θ has been shown to activate PKC μ in T cells [62], in agreement with this the activation of PKC θ precedes the recruitment to the membrane of PKC μ in response to CD43 engagement, thus it is possible that the activation of PKC μ resulting from CD43 ligation is mediated by PKC θ . Although, there is experimental evidence suggesting that the activation of PKC ζ 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 PKC ζ activation remains to be elucidated.

CD43 engagement resulted not only in the membrane localization of cPKC α/β and PKC θ 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 PKC θ but not PKC α/β 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 cPKC α/β 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 PKC θ -deficient mice show no defect in ERK activation in response to TcR/CD28 ligation [23,24] suggests that the activation of ERK by PKC θ 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, PKC θ participates in the CD43-dependent signaling leading to activation of these transcription factors, since the PKC θ 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 PKC θ on c-Fos expression is independent of ERK activation, and that PKC θ may use an alternative pathway to regulate SRF or Elk1 transcriptional activities to promote c-Fos expression. In agreement with this, PKC α and PKC ϵ have been shown to

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

Induction of NF- κ B by PKC θ 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 PKC θ suggests that the PKC θ 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 PKC ϵ [71] and PKC ζ [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 PKC θ 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, PKC θ deficiency abrogated the TcR/CD28-dependent NFAT activation, suggesting that PKC θ participates in NFAT activation [24]. Consistent with this, we show that NFAT activation in response to CD43 ligation on human T cells requires PKC θ 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 PKC θ mutant prevented NFAT binding activity. This, together with the fact that CD43 engagement did not induce the membrane localization of PKC δ and failed to induce the phosphorylation of PKC δ on Thr⁵⁰⁵ (data not shown), which has been shown to correlate with PKC δ activation [73], strongly suggests that the effect of rottlerin on NFAT binding resulted from the specific inhibition of PKC θ . The data obtained with T lymphocytes from the PKC θ -deficient mice indicate that PKC θ is necessary for the generation of IP₃ 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 PKC θ is an upstream regulator of PLC γ , in human cells however, PLC γ is required for PKC θ activation in response to TcR/CD28 engagement [74]. In the CD43 signaling pathway, PKC θ is most likely located downstream of PLC γ , since preventing PLC γ activity with the inhibitor U73122 blocked PKC θ 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. Dienz 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. Ticchioni, 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 Ca^{2+} 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. Sawadkiosol, 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 Ca^{2+} , 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. Teitel, 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 etheta 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. Kortzenjann, 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-kappa B family: friend and foe, *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 434–440.
- [57] Q. Li, I.M. Verma, NF-kappaB 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-alpha-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 Ctheta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291 (2002) 444–452.
- [63] H. Nakanishi, K.A. Brewer, J.H. Exton, Activation of the zeta isozyme 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 gamma 9V delta 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-[kappa]B activity, *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000) 621–663.
- [69] F.S. Lee, R.T. Peters, L.C. Dang, T. Maniatis, MEKK1 activates both IkappaB kinase alpha and IkappaB 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 IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 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-alpha, -epsilon, and -zeta 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-kappaB 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-kappa B activation and lipid raft recruitment of protein kinase C theta 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.