



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y  
BIOPROCESOS**

**CD43 CONTRARRESTA LAS SEÑALES ANÉRGICAS INDUCIDAS  
POR EL RECEPTOR DE CÉLULA T A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE  
CREB**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A :**

**Lic. Cecilia Martínez Campos**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Gustavo Pedraza Alva**



**CUERNAVACA, MORELOS 2010**



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.

## **DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Gustavo Pedraza Alva

## **COMITÉ TUTORAL**

Dr. Gustavo Pedraza Alva

Dra. Viviana Valadéz Graham

Dra. Claudia González Espinosa

## **JURADO DE EXAMEN**

Dra. Carmen Beltrán Núñez  
Presidente

Dr. Enrique Ortega Soto  
Secretario

Dra. Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl  
Vocal

Dr. José Luis Montiel Hernández  
Suplente

Dr. Gustavo Pedraza Alva  
Suplente

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Al INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM.

A CONACyT por la beca con número 219268/207226 y por el apoyo derivado del proyecto U46505M.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico DGAPA por el apoyo derivado de los proyectos IN219307 y IN226206.

Al Banco de sangre del Hospital Regional del IMSS, Cuernavaca.

A los miembros de mi Comité Tutorial.

A los miembros del Jurado de Examen.

## **AGRADECIMIENTOS**

Dr. Gustavo Pedraza

Dra. Yvonne Rosenstein

Álvaro Torres

Citlali Márquez

Erika Melchy

Fabrizio Mendoza

Laura Montero

María Elena Bravo

Mireille Santamaría

Montserrat Sandoval

Nohemí Camacho

Oswaldo López

# ÍNDICE

Capítulo	Página
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1 Respuesta Inmune	3
1.2 Respuesta Inmune Innata	3
1.3 Respuesta Inmune Adaptativa	4
1.4 Cascada de Señalización de LT inducida a través del TCR	5
1.5 Señales coestimuladoras	7
1.6 Citocinas	8
1.7 IL-2	9
1.7.1 Factores de transcripción involucrados en la regulación de IL-2	10
1.8 Anergia	14
1.8.1 Anergia clonal	15
1.8.2 Tolerancia Adaptativa	17
1.8.3 CTLA-4	18
1.9 CD43	18
1.9.1. Funciones de CD43	19
1.9.2 Cascada de señalización de CD43	20
<b>2. HIPÓTESIS</b>	<b>22</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>

<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>24</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
5.1 Las señales coestimuladoras de CD43 inducen la fosforilación de CREB	28
5.2 La fosforilación de CREB inducida por las señales coestimuladoras de CD43 es dependiente de PKA.	29
5.3 Regulación de la unión de CREB y CREM al promotor de IL-2 en respuesta a las señales coestimuladoras de CD43.	34
5.4 Las señales coestimuladoras de CD43 no regulan la unión de CREM 24 horas después del estímulo pero mantienen los niveles de fosforilación de CREB.	38
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
6.1 CD43 induce la fosforilación de CREB	40
6.2 Posibles vías alternas de fosforilación de CREB dependientes de CD43	42
6.3 Regulación de la unión de CREB y CREM al promotor de IL-2 por las señales coestimuladoras de CD43	44
6.4 Las señales coestimuladoras de CD43 mantienen la fosforilación de CREB 24 horas después del estímulo: Posibles implicaciones	46
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>48</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	<b>49</b>



**9. ANEXO I**

**50**

**10. BIBLIOGRAFÍA**

**51**

## ABREVIATURAS

APC	del inglés “Antigen Presenting Cell”, Célula Presentadora de Antígeno.
AC	del inglés “Adenylate Cyclase”, Adenilato Ciclasa.
Ag	Antígeno.
ARRE2	del inglés “Antigen Receptor Responsive Element”, Elemento de Respuesta al Receptor de Antígeno 2.
ATF	del inglés “Activating Transcription Factor”
CaMKIV	del inglés “Ca <sup>2+</sup> -calmodulin dependent Kinase IV”, Cinasa IV dependiente de Calcio-Calmodulina.
Cbl-b	del inglés “Casitas B-lineage lymphoma B”.
CBP	del inglés “CREB Binding Protein”, Proteína de unión a CREB.
ChIP	del inglés “Chromatin Immunoprecipitation”, Inmunoprecipitación de cromatina.
CREB	del inglés “cAMP Response-Element Binding protein”, Proteína de unión al Elemento de Respuesta a AMPc.
CREM	del inglés “cAMP Response Element Modulator”.
ERK	del inglés “Extracellular signal-Regulated Kinase”, Cinasa Regulada por señal Extracelular.
GRAIL	del inglés “Gene Related to Anergy In Lymphocytes”, Gen Relacionado a Anergia en Linfocitos.
ITCH	del inglés “Itchy homologue E3 ubiquitin ligase”, Ubiquitin Ligasa E3 homóloga a Itchy.
JNK	del inglés “Jun Kinase”, Cinasa Jun.
LB	Linfocito B
LT	Linfocitos T
MAPK	del inglés “Mitogen-Activated Protein Kinase”, Proteína Cinasa Activada por Mitógeno.
MHC	del inglés “Major Histocompatibility Complex”, Complejo Principal de Histocompatibilidad.
PI3K	del inglés “Phosphoinositide Kinase-3”,
PLC- $\gamma$	del inglés “Phospholipase C- $\gamma$ ”, Fosfolipasa-C $\gamma$ .
PMA	del inglés “Phorbol 12 Myristate 13 Acetate”
SLP-76	del inglés “SH2 domain-containing leukocyte protein 76”, Proteína Leucocítica 76 que contiene un dominio SH2.
PKC	del inglés “Protein Kinase C”, Proteína Cinasa C.
AP1	del inglés “Activator Protein 1”, Proteína Activadora 1.
NF $\kappa$ -B	del inglés “Nuclear Factor $\kappa$ B”, Factor Nuclear $\kappa$ B.
NFAT	del inglés “Nuclear Factor of Activated T cell”, Factor Nuclear de célula T Activada.
OCT	del inglés “Octamer binding protein”.
TLR	del inglés “Toll Like-Receptor”, Receptor Tipo Toll.
MSK	del inglés “Mitogen and Stress activated Kinase”, Cinasa activada por Mitógenos y Estrés.
NEMO	del inglés “NF $\kappa$ B Essential Modulator”, Modulador Esencial de NF $\kappa$ B.
NK	del inglés “Natural killer”
p70S6K	del inglés “p70S6 Kinase”, Cinasa p70S6.
PDE	del inglés “Phosphodiesterase”, Fosfodiesterasa.
RSK	del inglés “Ribosomal S6 Kinase 2”, Cinasa 2 Ribosomal S6.
TRAIL	del inglés “Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand”, Ligando Inductor de Apoptosis relacionado al factor de necrosis tumoral.

## RESUMEN

La interacción entre el Receptor de célula T (TCR) y el complejo formado por una molécula codificada en el Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) y un péptido antigénico (Ag) induce la activación de linfocitos T (LT) durante la respuesta inmune adaptativa. La interacción TCR-MHC/Ag inicia varias cascadas de señalización, las cuales involucran cinasas de tirosina y segundos mensajeros como  $\text{Ca}^{2+}$ , inositol trifosfato y AMPc, los cuales a su vez, regulan la actividad de diferentes factores de transcripción. Sin embargo, las señales dependientes del TCR no son suficientes para promover la activación completa de los LT, las señales coestimuladoras de moléculas como CD4, CD8, CD2, CD28 y CD43 son necesarias para la proliferación, diferenciación y la producción de citocinas. La activación del TCR en ausencia de señales coestimuladoras induce un estado hiporesponsivo conocido como “anergia”, el cual está caracterizado por una disminución de la producción de IL-2 y en consecuencia de la proliferación celular, así como un incremento en la expresión de moléculas con un papel regulador negativo como CTLA-4.

Previamente en el laboratorio se demostró que las señales de la molécula coestimuladora CD43 disminuyen el umbral de activación de los LT, activan factores de transcripción como NF $\kappa$ B, AP-1 y NFAT, aumentan la producción de IL-2 y la proliferación. Cuando las señales del TCR anteceden a las de CD43 por no más de 30 minutos, los LT son capaces de producir IL-2. Lo que nos indica que hay una ventana de tiempo en la que las señales de CD43 pueden prevenir el estado de anergia. Dado que la expresión de IL-2 es esencial para la proliferación y activación de los LT, que en células anérgicas factores de transcripción pertenecientes a la familia de CREB como CREM regulan negativamente la producción de IL-2 y que las señales coestimuladoras de CD43 previenen el estado anérgico, proponemos que CD43 modula el balance entre los factores de transcripción de la familia de CREB que regulan negativamente (CREM) y positivamente (CREB) la producción de IL-2.

De acuerdo con esta hipótesis, aquí mostramos que las señales coestimuladoras de CD43 inducen la activación de CREB a tiempos cortos (10 min) de manera dependiente de PKA y que su fosforilación se mantiene a tiempos largos (24h) tanto en LT de sangre periférica como células Jurkat. Por otra parte, encontramos que las señales coestimuladoras de CD43 inhiben la unión de CREM al promotor de IL-2.

En conclusión, las señales de CD43 pueden prevenir el estado de anergia modulando positivamente la transcripción de IL-2 al inducir la activación de CREB e inhibir la unión de factores que lo regulan negativamente como CREM.

# 1. Introducción

## *1.1 Respuesta Inmune*

El sistema inmune de los mamíferos está constituido por diferentes moléculas y tipos celulares encargados de proteger al organismo de agentes ajenos a éste, entre los cuales están bacterias, virus, protozoarios, hongos e incluso compuestos químicos inorgánicos; Las moléculas de estos patógenos a las cuales se unen anticuerpos o el TCR se les denomina antígenos (Ag). La respuesta inmune es un evento finamente regulado y para fines prácticos, se divide en respuesta inmune innata y en respuesta inmune adaptativa. En términos evolutivos, la respuesta inmune innata es filogenéticamente más antigua que la respuesta inmune adaptativa. Esta última apareció en los primeros vertebrados mientras que la respuesta inmune innata es un mecanismo de defensa que se encuentra desde organismos invertebrados hasta organismos vertebrados (revisado en Du Pasquier, 2001).

## *1.2 Respuesta Inmune Innata*

La respuesta inmune innata es una respuesta rápida; en ella participan principalmente barreras físicas (piel, epitelios) y químicas (moco, lágrimas, saliva, pH, péptidos antimicrobianos), células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células líticas (NK, del inglés “Natural Killer”), proteínas del torrente sanguíneo (Sistema del Complemento y mediadores inflamatorios) y citocinas, las cuales son secretadas por las células del sistema inmune e inician cascadas de señalización de manera autócrina o parácrina (revisado en Medzhitov, 2007). Las células que participan en esta etapa se caracterizan porque sus componentes reconocen estructuras químicas conservadas entre agentes infecciosos y por tanto, no diferencia entre un patógeno y otro de manera específica.

A pesar de que el sistema inmune innato es muy eficiente, algunos patógenos logran evadir la respuesta montada por esta primera línea de defensa, por lo que se requiere generar otro tipo de respuestas, esto ocurre durante la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, funcionalmente no hay divisiones estrictas entre los mecanismos de defensa utilizados en la respuesta inmune innata y en la respuesta inmune adaptativa, por el

contrario, dichos mecanismos se regulan unos a otros.

### ***1.3 Respuesta Inmune Adaptativa***

El sistema inmune adaptativo se caracteriza por: i) tener la capacidad de reconocer a cada antígeno (Ag) específicamente, esto es, “distingue” entre un patógeno u otro, e incluso puede discriminar entre diferentes dominios de las moléculas que lo constituyen (epítopes) (revisado en Santana & Rosenstein, 2003); ii) tener la capacidad de reconocer alrededor de  $25 \times 10^6$  diferentes epítopes a través del receptor para el antígeno de células T  $\alpha\beta$  (TCR; del inglés “T Cell Receptor”) (Arstila *et al.*, 1999) y iii) ser capaz de generar memoria, de modo que puede montar una respuesta inmune de manera más rápida cuando ocurre una segunda exposición a un antígeno (revisado en Freitas & Rocha, 2000). El sistema inmune adaptativo se auto-regula para mantener la homeostasis y normalmente, no reacciona contra epítopes de moléculas propias del organismo. Las células efectoras de la respuesta inmune adaptativa son los linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB), de modo que la respuesta inmune adaptativa puede clasificarse a su vez, en respuesta inmune celular y humoral (revisado en Freitas & Rocha, 2000). En la respuesta inmune celular, los LT regulan la eliminación de patógenos mediante la producción de citocinas (LT cooperadores) y a través de contactos célula-célula (LT citotóxicos), mientras que en la respuesta humoral los LB lo hacen mediante la producción de anticuerpos. En función de la naturaleza de los antígenos, se generan diferentes mecanismos de defensa, esto le confiere como característica la especialización (revisado en Abbas & Lichtman, 2003).

La eliminación de patógenos mediante la respuesta inmune adaptativa involucra varias etapas: el reconocimiento del antígeno, la expansión clonal de las células que reconocieron dicho antígeno, la diferenciación de estas células en poblaciones antígeno específicas y finalmente, la fase efectora, en la que el antígeno es eliminado (revisado en Santana & Esquivel-Guadarrama, 2006). Posteriormente se requiere detener la respuesta inmune para regresar a un estado de homeostasis, etapa en la cual muchas de las células involucradas sufren apoptosis y solo unas células antígeno-específicas sobreviven para generar memoria.

Existen dos poblaciones de LT, caracterizados por la expresión de proteínas de superficie específicas (marcadores moleculares): LT cooperadores, los cuales expresan la proteína CD4 y LT citotóxicos que expresan la proteína CD8 (revisado en Freitas & Rocha,

2000). Los antígenos son presentados mediante dos tipos de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC; del inglés “Major Histocompatibility Complex”), el MHC I y el MHC II, reconocidos por los LT citotóxicos y cooperadores, respectivamente (revisado en Freitas & Rocha, 2000).

El MHC clase I es expresado por todas las células nucleadas y consiste en dos cadenas polipeptídicas unidas de manera no covalente, la cadena  $\alpha$  y la  $\beta_2$ -microglobulina. Los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del extremo amino-terminal de la cadena  $\alpha$  forman el surco de unión para el péptido presentado, mientras que el segmento  $\alpha 3$  se pliega en un dominio de inmunoglobulina conservado en todas las moléculas del MHC I, el cual sirve como sitio de unión con CD8. Por otro lado, el MHC II se expresa únicamente en células presentadoras de antígeno (APC; del inglés “Antigen Presenting Cell”), categoría en la que se encuentran las células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, células endoteliales vasculares, células epiteliales y células mesenquimales. El MHC II consiste de dos cadenas polipeptídicas  $\alpha$  y  $\beta$  unidas no covalentemente. Los segmentos amino terminal de  $\alpha$  y  $\beta$ ,  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  respectivamente, interaccionan para formar el surco de unión al péptido presentado, mientras que los extremos  $\alpha 2$  y  $\beta 2$  se pliegan en un dominio de inmunoglobulina y es  $\beta 2$  el dominio que interactúa con CD4 (revisado en Abbas & Lichtman, 2003).

Los antígenos son presentados en las APCs por estos dos tipos de moléculas dependiendo de la vía de procesamiento del antígeno. Los antígenos presentados por MHC I son procesados proteolíticamente por el proteosoma y por lo general son antígenos endógenos, mientras que los presentados por MHC II son procesados por vía fagosoma-endosoma y suelen ser antígenos exógenos (revisado en Abbas & Lichtman, 2003).

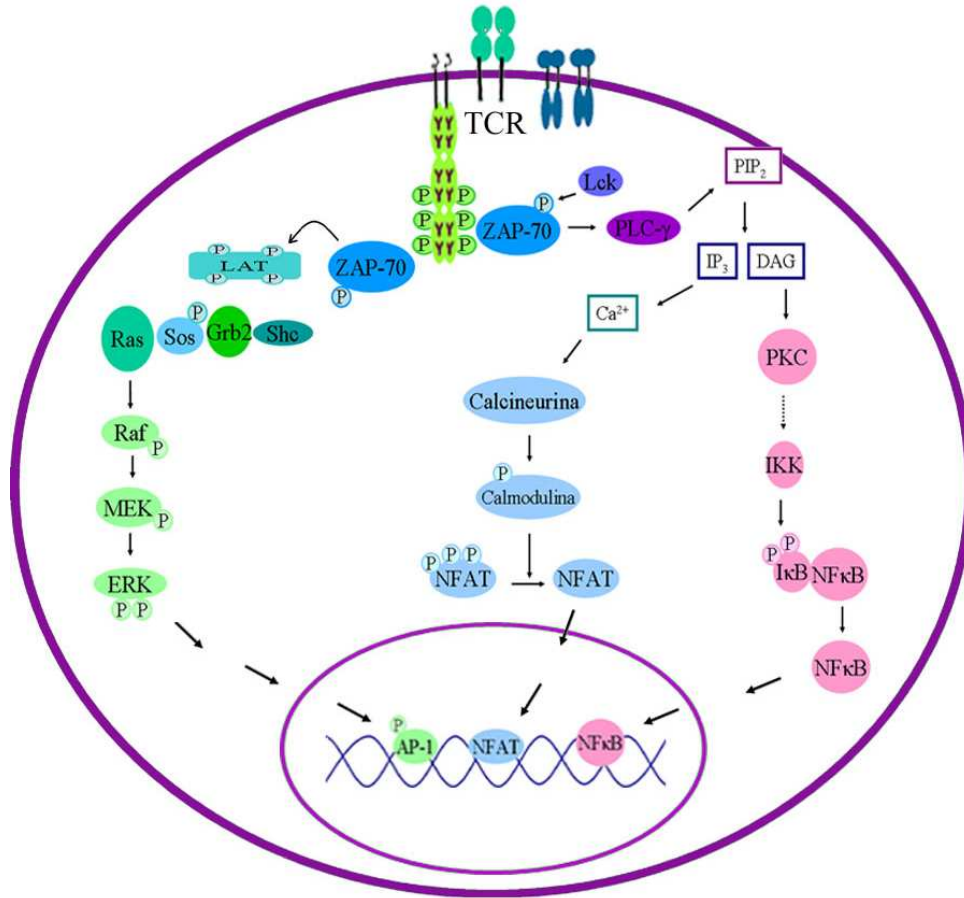
#### ***1.4 Cascada de Señalización de LT inducida a través del TCR***

Durante la activación de los LT se reclutan receptores y componentes de señalización tales como proteínas co-estimuladoras, tirosina cinasas, cinasas de serinas y treoninas y moléculas adaptadoras hacia el punto de contacto entre las dos células (región a la cual se le conoce como sinapsis inmunológica), lo que resulta finalmente en la activación de factores de transcripción y en la regulación de la expresión génica.

En humanos, el complejo TCR/CD3 está formado por dos cadenas peptídicas,  $\alpha$  y  $\beta$ , altamente polimórficas las cuales constituyen el módulo de reconocimiento propiamente

dicho, cuatro moléculas accesorias que en conjunto se denominan complejo CD3 ( $\epsilon\gamma$  y  $\epsilon\delta$ ) y una o dos cadenas  $\zeta$ . Estas proteínas no tienen una actividad enzimática intrínseca pero constituyen un puente molecular en la transmisión de la señal (revisado en Sefton & Taddie, 1994; Abbas & Lichtman, 2003). La interacción del complejo TCR/CD3 con el Ag dispara una cascada de señalización que involucra la fosforilación en residuos de tirosina de la cadena  $\zeta$  por Lck, una tirosina cinasa miembro de la familia de Src. Esto a su vez promueve la asociación de la tirosina cinasa ZAP-70 a la cadena  $\zeta$  y su fosforilación por Lck, lo que resulta en su activación. ZAP-70 fosforila varios sustratos, entre los que se encuentran la proteína adaptadora LAT y la fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ; del inglés “Phospholipase C- $\gamma$ ”) (revisado en Latour & Veillette, 2001). Estos eventos tempranos promueven la formación de complejos macromoleculares que permiten transducir las señales río abajo. La fosforilación de LAT en varias tirosinas genera sitios de anclaje donde se reclutan moléculas tales como la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3K; del inglés “Phosphoinositide Kinase-3”), SLP-76 (del inglés “SH2 domain-containing leukocyte protein 76”) y PLC- $\gamma$ 1, las cuales a su vez se asocian a Grb2/Sos/Ras y Vav (Fig.1) (revisado en Sefton & Taddie, 1994; Chan & Shaw, 1995; Latour & Veillette, 2001; Mustelin & Taskén, 2003).

La cascada de activación resulta en el incremento de segundos mensajeros tales como  $\text{Ca}^{2+}$ , inositol 3 fosfato y diacilglicerol además de la activación de miembros de la familia de las proteínas cinasas C (PKC; del inglés “Protein Kinase C”) y fosfatasa como calcineurina, que promueven la activación y unión de varios factores de transcripción a sus genes blanco. Entre los factores de transcripción más importantes que participan en las etapas iniciales de la activación de los LT se encuentran AP-1 (del inglés “Activator Protein 1”), NF $\kappa$ -B (del inglés “Nuclear Factor  $\kappa$ B”) y NFAT (del inglés “Nuclear Factor of Activated T cell”) (Fig.1) (revisado en Mustelin & Taskén, 2003; Veillette & Davidson, 1992).



**Figura 1. Cascada de señalización durante la activación de los LT inducida a través del TCR.** Las señales del TCR inducen la activación de cinasas y el aumento de segundos mensajeros como el calcio lo que conduce a la amplificación de diferentes cascadas de señalización las cuales culminan en la activación de factores de transcripción. Estos factores de transcripción regulan la expresión de genes importantes para la proliferación y diferenciación de los LT.

A pesar de que las señales del TCR son suficientes para que se lleven a cabo los eventos moleculares antes descritos, éstos, en conjunto, no son suficientes para que la célula se comprometa con un programa de activación y diferenciación, para esto se requiere de las señales proveídas por moléculas coestimuladoras (revisado en Smith-Garvin *et al.*, 2009).

### 1.5 Señales coestimuladoras

Para que los LT se activen y se genere una respuesta inmune efectiva, además de las señales del TCR, se requieren señales generadas por la interacción de moléculas co-



receptoras (CD4, CD8, CD2, CD28 y CD43, entre otras) presentes en la superficie del LT con sus respectivos ligandos en la superficie de la APC. Las señales generadas por estas moléculas sinergizan con las del TCR, lo que resulta en una activación sostenida y prolongada de dichas vías ya que se generan ciclos de retroalimentación positiva y se retarda la inactivación de la señales (revisado en Smith-Garvin *et al.*, 2009). Las señales generadas por el TCR y moléculas co-estimuladoras activan a las células T e inducen la producción de citocinas tales como IL-2 y sus receptores, así como de moléculas de adhesión (revisado en Abbas & Lichtman, 2003).

La molécula co-estimuladora que ha sido más estudiada es CD28. Se expresa en los LT y tiene afinidad por las moléculas B7-1 y B7-2, presentes en las células presentadoras de antígeno (revisado en Chambers, 2001). Las señales de CD28 se han asociado con i) el incremento de la adhesión celular; ii) estabilización de la sinapsis inmunológica; iii) la inducción del gen antiapoptótico bcl-x; iv) aumento en la duración y magnitud de las respuestas de los LT y v) el aumento y estabilización de RNA mensajeros de citocinas, en particular de IL-2 (revisado en Green 2000; Chambers, 2001). En el marco de este trabajo nos enfocamos en la caracterización de otra molécula coestimuladora: CD43 (Ver sección 1.9).

## **1.6 Citocinas**

La activación de los LT induce la producción de citocinas que regulan la actividad celular durante la respuesta inmune como la proliferación y la activación de mecanismos efectores y de memoria. Las citocinas son proteínas pleiotrópicas, de bajo peso molecular que tienen la habilidad de actuar en diferentes tipos celulares. La mayoría de ellas son parcialmente redundantes. Varias citocinas pueden actuar en una misma célula de modo que inducen las mismas señales; esto implica que las funciones de las citocinas pueden ser compensadas en ausencia de alguna de ellas. Al unirse a sus receptores en las células, las citocinas inducen cascadas de señalización que generalmente llevan a la producción de otras citocinas, a la activación y diferenciación celular, a la estimulación de la hematopoyesis y la quimiotaxis de las células (revisado en Abbas & Lichtman, 2003), por lo que actúan como mediadores y reguladores tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa.

Una vez que los LT cooperadores reconocen un antígeno presentado por la APC a través del TCR, producen IL-2, citocina crítica para que se pueda montar una respuesta inmune

efectiva. IL-2 funciona como un mediador autócrino que induce la proliferación y la producción de más IL-2, generándose un ciclo de retroalimentación positiva (revisado en Kim *et al.*, 2006). Dependiendo de las señales que reciban los LT además de las señales inducidas por la citocina IL-2, los LT se diferencian en distintos tipos celulares, los cuales expresan diferentes tipos de citocinas. Dado que dicha producción de citocinas es un evento regulado, existen “firmas” o patrones de producción de citocinas (revisado en Abbas & Lichtman, 2003). Algunos de los tipos de diferenciación que se han identificado son T1, T2, T3, Tr1 y T17.

Algunos patógenos inducen la producción de IL-12 dependiente de células dendríticas o macrófagos, por su reconocimiento a través de receptores tipo Toll (TLR; del inglés “Toll Like-Receptor”), esto a su vez, estimula a los LT cooperadores a producir IFN- $\gamma$ , citocina que es firma de la diferenciación hacia el tipo T1. Entre las funciones de IFN- $\gamma$  están la de inducir la activación de los macrófagos, aumentar la expresión del MHC I y II, activar neutrófilos y estimular la actividad citolítica de las células NKs (revisado en Abbas & Lichtman, 2003).

Los LT tipo T2 se caracterizan por producir IL-4, IL-5 e IL-13. Estas citocinas activan a los LB e inducen la síntesis y secreción de anticuerpos como un modo de defensa contra parásitos mediante su neutralización.

Menos estudiados son los otros tipos de diferenciación: los LT T3 se caracterizan por la producción de TGF- $\beta$ , mientras que los Tr1 son inducidos por y producen IL-10, ambos tipos celulares son inmunosupresores. Los LT tipo T17 son inducidos por IL-6 y producen IL-17 y montan respuestas de defensa contra patógenos extracelulares (revisado en Bettelli *et al.*, 2007).

Cabe resaltar que en ausencia de la citocina IL-2, ninguna de las poblaciones específicas arriba mencionadas se generan y por tanto, la respuesta inmune no ocurre de manera adecuada.

## **1.7 IL-2**

La citocina IL-2 se produce principalmente por linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados. Su función principal es regular la proliferación y diferenciación de los LT, ya sea cooperadores, citotóxicos o reguladores.

IL-2 es una proteína de 14 a 17 kD que se pliega de manera globular y está constituida por cuatro  $\alpha$ -hélices (revisado en Abbas & Lichtman, 2003). Induce la expresión de la

cadena de alta afinidad de su receptor, regula genes involucrados en la progresión del ciclo celular y genes de proteínas anti-apoptóticas entre ellos *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, *c-myb* y *bcl-2* *bcl-x<sub>i</sub>*, induce la expresión de proteínas de la familia de ciclinas A, B, C, D2, y E así como de proteínas de la familia de las cinasas dependientes de ciclina como cdc2 y cdk2 en LT activados y aumenta la capacidad citolítica de NKs y LT citotóxicos (revisado en Lin & Leonard, 1997). Por otra parte, la exposición prolongada a esta citocina induce apoptosis por activación (revisado en Abbas & Lichtman, 2003).

El receptor de IL-2, (IL-2R) consta de tres cadenas polipeptídicas,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . La cadena  $\gamma$  se expresa constitutivamente y es compartida por los receptores de otras citocinas como IL-4, IL-7, IL-9 e IL-21. La expresión de estas cadenas modifica la afinidad de IL-2R por IL-2. En linfocitos activados, se expresa la cadena  $\alpha$  y la formación del trímero genera un receptor de alta afinidad (revisado en Kim *et al.*, 2006). Las señales generadas por la unión de IL-2 con su receptor involucran la activación de proteínas como Lck, Syk, Jak/STATs y Shc-Ras-Raf (revisado en Kim *et al.*, 2006).

El gen de IL-2 está regulado por una región promotora de aproximadamente 300pb río arriba del inicio de la transcripción. Para que la transcripción del gen de IL-2 sea eficiente, deben estar ocupados todos los sitios de unión a elementos de regulación positiva en el promotor, entre los que destacan: NFAT, AP-1, NF $\kappa$ B, CREB y OCT, como se muestra en la figura 2 y 3 (Rothenberg & Ward, 1996).

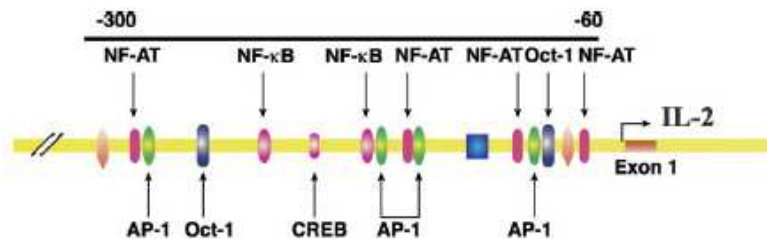
### ***1.7.1 Factores de transcripción involucrados en la regulación de IL-2***

**NFAT.**- La familia de factores de transcripción NFAT consta de cinco proteínas, NFAT1 (NFATc2, NFATp), NFAT2 (NFATc1, NFATc), NFAT3, NFAT4 y NFAT5. A excepción de NFAT5, estos factores están regulados por calcio.

Las regiones más conservadas de estos factores de transcripción consisten en dos dominios: un dominio regulador conocido como región de homología NFAT (NHR; del inglés "NFAT Homology Region"), el cual contiene un dominio transactivador con varias serinas fosforiladas en células en reposo y una región de homología Rel (RHR; del inglés "Rel Homology Region") el cual tiene homología estructural con las proteínas de la familia REL y le confiere su especificidad de unión al ADN (revisado en Macian, 2005). El aumento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico activa a calmodulina, ésta a su vez activa a la fosfatasa calcineurina que defosforila a NFAT, permitiendo que éste pueda entonces translocarse al núcleo (revisado en Abbas & Lichtman, 2003).

Los LT deficientes en NFAT1 y NFAT2 no producen IL-2, mientras que aquellos deficientes en NFAT2 y NFAT4 la producen en niveles muy bajos (revisado en Kim *et al.*, 2006). Además de funcionar como activadores, estos factores de transcripción pueden funcionar como represores, dependiendo de la unión de otros factores de transcripción al promotor de IL-2 (Kyttaris *et al.*, 2007).

**AP-1.-** En respuesta a las señales generadas por el TCR y moléculas co-estimuladoras se activan las GTPasas pequeñas Rho y Ras, las cuales activan a las MAP cinasas (del inglés “Mitogen-Activated Protein”) JNK (del inglés “Jun Kinase”) y ERK (del inglés “Extracellular signal-Regulated Kinase”), respectivamente. Esto tiene como consecuencia la fosforilación y activación de los factores Jun y c-Fos y su dimerización (revisado en Abbas & Lichtman, 2003). Varias evidencias sugieren que AP-1 es necesario pero no suficiente para la producción de IL-2 (revisado en Kim *et al.*, 2006).



*Figura 2. Factores de transcripción involucrados en la regulación del gen de IL-2.* Los factores de transcripción NFAT, AP-1, NFκB, Oct-1 y CREB regulan positivamente la transcripción de IL-2 (modificado de Kim *et al.*, 2006).

**NFκB.-** La familia de NFκB está formada por las proteínas NFκB1 (p50), NFκB2 (p52), RelA (p65), RelB y c-Rel. Estas proteínas tienen una región estructural conservada de 300 aminoácidos en la región amino-terminal que contiene los dominios de dimerización, localización nuclear y de unión a DNA. RelA, RelB y c-Rel contienen un dominio transactivador en su extremo carboxilo, el cual está ausente en p50 y dado que conserva el dominio de unión al DNA, p50 funciona como un represor transcripcional (revisado en Li & Verma, 2002). De acuerdo con esto, los homodímeros de p50 parecen reprimir la expresión de IL-2 ya que la producción de esta citocina es elevada en ratones NFκB1<sup>-/-</sup> (revisado en Kim *et al.*, 2006)

La activación de NFκB requiere la fosforilación de IκB, modificación que libera a NFκB al descubrir la secuencia de localización nuclear, lo cual permite su translocación al núcleo. El complejo represor IκB está constituido por varias proteínas, las principales son IKK1, IKK2 y la subunidad reguladora NEMO (del inglés “NFκB essential modulator”) (revisado en Li & Verma, 2002).

De los miembros de la familia de NFκB, RelA juega un papel importante en la expresión de IL-2 a tiempos tempranos en la activación de linfocitos T, en tanto que c-Rel regula la transcripción de IL-2 a tiempos tardíos (revisado en Kim *et al.*, 2006).

**OCT.-** Los miembros de la familia de factores de transcripción OCT, Oct-1 y Oct-2 son proteínas ubicuas que se expresan tanto en LT como en algunas líneas de células T. Se unen al promotor de IL-2 en dos sitios y su cooperación con el factor de transcripción AP-1 es crucial para la producción de IL-2 en respuesta al estímulo con PMA/Ionomicina (revisado en Kim *et al.*, 2006). La demetilación del sitio ARRE2 (del inglés “Antigen Receptor Responsive Element”) del promotor de IL-2 es crucial para el reclutamiento de Oct-1, éste a su vez recluta a NFAT en LT CD4<sup>+</sup> (Murayama *et al.*, 2006). Por otra parte, en células Jurkat (línea aislada a partir de una leucemia aguda de LT), este sitio se encuentra demetilado y por tanto, Oct-1 se encuentra unido de manera permanente (Murayama *et al.*, 2006).

**CREB.-** La familia de factores de transcripción de respuesta a AMPc incluye hasta el momento a CREB, CREM y ATF. CREB y ATF son ubicuos mientras que CREM se expresa sólo en ciertos tipos celulares.

La estructura general de los factores de transcripción de la familia de CREB está constituida por un dominio-básico-cierre de leucina (bZip; del inglés “basic-domain.leucine zipper”), un dominio de activación que comprende una caja de fosforilación RRPSY (caja P) y dos dominios Q1 y Q2 ricos en glutamina (revisado en De Cesare *et al.*, 1999).

Cada miembro de esta familia tiene varias isoformas que pueden funcionar como activadores o represores de la transcripción. Los represores se generan por varios mecanismos como “splicing” alternativo, sitios alternativos del inicio de traducción o promotores alternativos. Estos represores pueden carecer de secuencia de localización nuclear, del dominio de unión a ADN o de los dominios transactivadores (revisado en De Cesare *et al.*, 1999). En particular, se ha observado que las formas represoras de CREM

carecen del dominio Q2, dominio que se asocia con la RNA Polimerasa II *in vitro* (revisado en Mayr & Montminy, 2001).

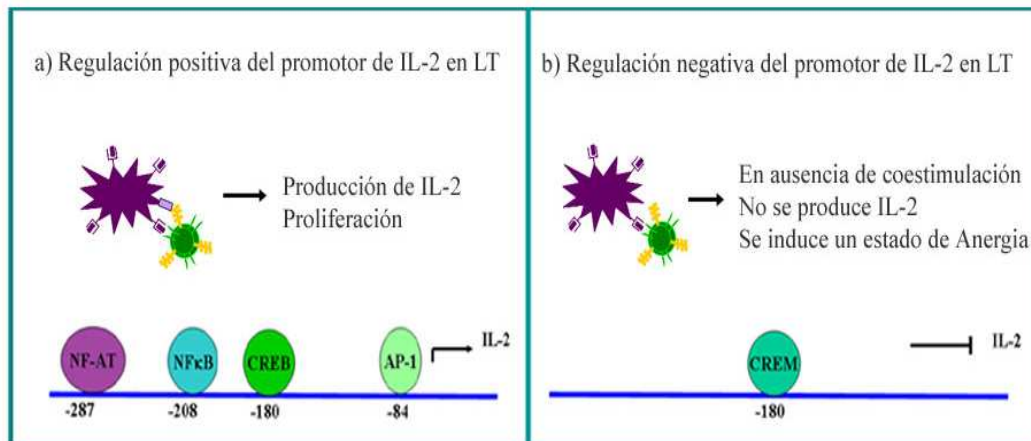
Estos factores de transcripción forman homodímeros y heterodímeros que se unen a secuencias de DNA llamadas elementos de respuesta a AMPc (“CRE” por sus siglas en inglés), cuya secuencia consenso es TGACGTCA. Los miembros de esta familia también se unen a la secuencia CGTCA, sin embargo la unión de CREB a ésta es menos activa que la unión a la secuencia consenso completa. Algunos estudios realizados sugieren un modelo en el que los monómeros de CREB se unen al ADN y se dimerizan en el sitio CRE (revisado en Mayr & Montminy, 2001).

La activación de CREB es dependiente de fosforilación. La vía canónica de activación de CREB depende del incremento en los niveles de AMPc, el cual se une a la subunidad reguladora de PKA. En consecuencia, la subunidad catalítica de PKA es translocada al núcleo y fosforila a CREB en la serina 133 (revisado en Mayr & Montminy, 2001). Sin embargo, existe evidencia de que CREB son sustratos de otras cinasas como CaMKIV (del inglés “Ca<sup>2+</sup>-calmodulin dependent Kinase IV”), p70S6K (del inglés “p70S6 Kinase”), RSK (del inglés “Ribosomal S6 Kinase 2”), MAPKAP-K2 (del inglés “MAP Kinase Activated Protein Kinase 2”) y MSK (del inglés “Mitogen and Stress activated Kinase”) (Revisado en DeCesare, 1999). La fosforilación de CREB promueve el reclutamiento de CBP (del inglés “CREB Binding Protein”) y de la acetil transferasa p300, proteínas que forman parte del aparato transcripcional (Butscher *et al.*, 2001).

Miembros de la familia de CREB regulan la expresión de proteínas involucradas en la respuesta inmune como IL-2, c-Fos, de las cadenas  $\alpha$  y  $\zeta$  del complejo TCR, IFN- $\gamma$ , FOXP3, entre otras (revisado en Mayr & Montminy, 2001; Kim & Leonard, 2007). Respecto a la represión de la transcripción de IL-2, se ha encontrado al heterodímero CREM/CREB unido a la región -180 del promotor de IL-2 en células anérgicas (células que no producen IL-2) y en células T de pacientes con Lupus Eritematoso (Powell *et al.*, 1999, Tenbrock *et al.*, 2002). Además, cuando se inhibe la expresión de CREM en LT y en consecuencia su unión al promotor de IL-2, CBP y p300 son capaces de unirse a este sitio y promover la acetilación de histonas (Tenbrock *et al.*, 2003).

Como ya se mencionó, la transcripción del gene de IL-2 durante la activación del LT es regulada positivamente por la fosforilación de CREB, lo cual ocurre desde los primeros 30 minutos después de la activación y se mantiene hasta por 6 horas (Hughes-Fulford *et al.*, 2005; Tenbrock *et al.*, 2003). Sin embargo, 24 horas después del estímulo a través de CD3 y CD28, CREB fosforilado es reemplazado por CREM en el promotor de IL-2

(Tenbrock *et al.*, 2003). Así, se ha propuesto que el reclutamiento de CREM en el promotor de IL-2 a tiempos largos post-estimulación, constituiría uno de los mecanismos involucrados en el control de la proliferación celular (Powell *et al.*, 1999). Estas evidencias indican que CREB y CREM están involucrados en la regulación de la expresión de IL-2 y por tanto, en el “encendido” y “apagado” de la respuesta inmune (Figura 3).



**Figura 3. Regulación de la transcripción del promotor de IL-2.** a) El reconocimiento de un antígeno presentado por el MHC II a través del TCR en presencia de señales coestimuladoras en el LT induce la activación de factores de transcripción como NFAT, NFκB, CREB y AP-1, los cuales regulan positivamente la transcripción del gen de IL-2. b) El reconocimiento de un antígeno presentado por el MHC II a través del TCR en ausencia de señales coestimuladoras en el LT no genera las señales necesarias para inducir la producción de IL-2, en este caso, CREM regula negativamente su transcripción.

### 1.8 Anergia

Para que se genere una respuesta inmune eficiente, además del reconocimiento del antígeno a través del TCR, se requiere de señales coestimuladoras que permitan rebasar los umbrales de activación de la célula T. Si las células no reciben estas señales, entonces entran en un estado de anergia. La anergia es una definición funcional que denota la hiporesponsividad de los LT. Esta definición se basa principalmente en el modelo de dos señales en el que la señal 1 es proporcionada por el reconocimiento del Ag a través del TCR y la señal 2 ocurre por el reconocimiento de proteínas co-estimuladoras en los LT con sus co-receptores en las células APC. En función de este modelo, el reconocimiento

de un antígeno a través del TCR, en ausencia de coestimulación, no conduce a una respuesta inmunológica efectiva (revisado en Saibil *et al.*, 2007).

Se cree que la anergia es uno de los mecanismos por los que se mantiene la tolerancia en los organismos, lo que evita la activación de LT que reconocen antígenos propios y que no fueron eliminados en el timo. En efecto, en un ambiente no inflamatorio, los LT reconocen antígenos a través del TCR sin que ocurra la activación de los mismos; en cambio, cuando señales inducidas por patógenos son percibidas (señales de peligro), las células APC maduran y presentan los antígenos con señales coestimuladoras suficientes para generar una respuesta eficiente por parte de los LT (revisado en Saibil *et al.*, 2007).

La anergia puede dividirse en dos categorías: la anergia clonal (modelos *in vitro*) y la tolerancia adaptativa (modelos *in vivo*).

### **1.8.1 Anergia clonal**

La anergia clonal se caracteriza principalmente por un arresto en el ciclo celular y la inhibición de la producción de citocinas específicas como IL-2 e IL-3. La anergia clonal se induce en modelos que involucran el estímulo del TCR en ausencia de coestimulación, el estímulo de LT a través de anti-CD3 pegado a placa, adición de Ionomicina y bloqueo de la co-estimulación mediante anticuerpos anti-CTLA-4, con anticuerpos solubles anti-CD3 y APCs de bazo. En el modelo de anergia clonal inducido mediante el estímulo a través del TCR, no hay un cambio en los niveles de expresión de las moléculas TCR, CD4 y ZAP70. La fosforilación de ZAP70 es ligeramente menor a la observada en células no anérgicas, lo que correlaciona con una disminución en la activación de la vía de las MAP cinasas y la movilización de NFκB al el núcleo (revisado en Choi & Schwartz, 2007). El bloqueo de Ras en el estado de anergia evita la activación de ERK, que a su vez inhibe al factor de transcripción Elk-1 y un circuito de retroalimentación positiva a nivel de la activación de Lck, lo que disminuye los niveles de expresión del gen c-Fos. De manera similar, también se ve afectada la expresión de Jun B y por tanto, la formación de AP-1 (Fos/c-Jun), requerido para la transcripción de IL-2 (revisado en Schwartz, 1997). Consistente con esto, la introducción de una versión de Ras constitutivamente activa en LT anérgicos es suficiente para restaurar la activación de ERK y la producción de IL-2 *in vitro* e *in vivo* (revisado en Saibil, 2007). Por el contrario, los niveles de activación de NFAT son normales en el estado de anergia (revisado en Choi & Schwartz, 2007).



Además de CTLA-4 (ver sección 1.8), una molécula involucrada en el establecimiento de la anergia es PD-1 (del inglés “Programmed Death 1”), miembro de la superfamilia de receptores de CD28 con actividad inhibitoria, expresado después del reconocimiento de un antígeno. Se ha observado que ratones deficientes de esta molécula sufren de enfermedades autoinmunes, mientras que anticuerpos bloqueadores de esta molécula revierten el estado de anergia y se promueve una respuesta autoinmune en dos modelos diferentes de diabetes (revisado en Saibil *et al.*, 2007). En LT deficientes de CD28 y CTLA-4, PD-1 induce la inhibición de la proliferación de estas células *in vitro* (revisado en Saibil *et al.*, 2007).

En los modelos de anergia clonal se han encontrado defectos en la palmitoilación de la proteína adaptadora LAT, lo cual inhibe su reclutamiento a la sinapsis inmunológica así como una disminución en su fosforilación. Cabe mencionar que la modificación en la palmitoilación no es un efecto general ya que la palmitoilación de la molécula Fyn se mantiene normal en un modelo de anergia clonal inducida por ionomicina (revisado en Saibil *et al.*, 2007). La inducción de incrementos en los flujos de calcio citosólico mediante el ionóforo Ionomicina, induce a su vez la activación del factor de transcripción NFAT. En base al modelo de inducción de anergia clonal dependiente de ionomicina, se sugiere que en ausencia de AP-1, NFAT es capaz de regular positivamente la transcripción de genes específicos involucrados en la regulación negativa de la respuesta inmune. Estos incluyen varias tirosina cinasas, la diacilglicerol cinasa alfa (DGK $\alpha$ ) y miembros de la familia de factores de transcripción EGR (del inglés “Early Growth Response”), Egr2 y Egr3 (revisado en Choi & Schwartz, 2007). Las DGKs disminuyen la concentración de DAG, el cual es convertido a ácido fosfatídico y correlaciona con la inducción del estado anérgico, contribuyendo a la disminución de la señalización a través de Ras y PKC $\theta$  (revisado en Saibil *et al.*, 2007). Interesantemente, la inhibición de la producción de IL-2 en la anergia clonal puede ser revertida con un inhibidor de la diacilglicerol cinasa (DGK $\alpha$ ) (revisado en Choi & Schwartz, 2007).

Proteínas de la familia de ubiquitin ligasas E3 como Cbl-b (del inglés “Casitas B-lineage lymphoma B”), GRAIL (del inglés “Gene Related to Anergy in Lymphocytes”) e ITCH (del inglés “Itchy homologue E3 ubiquitin ligase”), son reguladas positivamente por NFAT (Zheng *et al.*, 2007) y están involucradas en la inducción del estado de anergia mediante la inhibición en la activación de Vav, la estabilización en el factor de inhibición de Rho y la degradación de PLC- $\gamma$  y PKC $\theta$  (revisado en Garrison & Lineberry, 2007).

### ***1.8.2. Tolerancia adaptativa***

Los modelos de tolerancia adaptativa incluyen modelos antígeno específico con LT transgénicos para el TCR estimulados una o dos veces con péptidos solubles o estimulados en una ocasión después de la transferencia de estas células en un hospedero singénico, modelos de transferencia de LT en hospederos irradiados o linfopénicos (Rag<sup>-/-</sup> o CD3<sup>-/-</sup>) que expresan el antígeno constitutivamente, modelos de tolerancia oral en los que el hospedero es alimentado con el antígeno en altas dosis, modelos de tolerancia inducida por transfusión previo a un trasplante cardíaco alogénico o la inyección de superantígenos (revisado en Choi & Schwartz, 2007). La tolerancia adaptativa se caracteriza por la regulación negativa en la expresión de todas las citocinas, a excepción de IL-10, así como un aumento en la expresión de CD4. A diferencia de la anergia clonal, se requiere de la presencia del antígeno para mantener el estado anérgico y la adición de IL-2 exógena no lo revierte (revisado en Choi & Schwartz, 2007). Al igual que lo que ocurre en la anergia clonal, los niveles de expresión del TCR y Lck son similares en células anérgicas y en células control, sin embargo los niveles de fosforilación de ZAP70 y LAT están reducidos a pesar de que la actividad de las cinasas de la familia Src es adecuada para activar la cadena  $\zeta$  del complejo TCR; como consecuencia la fosforilación de PLC- $\gamma$ 1 también se ve afectada así como la generación de IP3 (revisado en Choi & Schwartz, 2007). Contrario a lo que sucede con la anergia clonal, la adición de un inhibidor de DGK no revierte el estado anérgico y la distribución de LAT es normal, su fosforilación se ve afectada en todos los sitios pero el efecto en la inhibición en la fosforilación de ERK es ligero (revisado en Choi & Schwartz, 2007).

En los modelos dependientes de la dosis de antígeno, se ha observado que cuando las “dosis” de antígeno son bajas, se puede generar un fenotipo similar al de anergia (revisado en Zheng et al., 2007) y que los superantígenos también inducen un estado de anergia regulado por el reclutamiento de la Histona Deacetilasa 1 al promotor de IL-2, de modo que la cromatina sufre remodelaciones que regulan la conformación de la misma y su estado de accesibilidad (Kametani *et al.*, 2008). La anergia inducida por el superantígeno bacteriano (SEB) resulta en un reclutamiento deficiente del complejo TCR ya que la cadena  $\zeta$  no es fosforilada adecuadamente (revisado en Choi & Schwartz, 2007). Mediante ensayos de retardamiento de movilidad electroforética se ha mostrado que la formación de complejos Fos/Jun/NFAT se reduce en LT CD4<sup>+</sup> anérgicos de ratón inducidos por la inyección múltiple del superantígeno SEA, comparado con la formación

de estos complejos en LT CD4<sup>+</sup> activados. También se observó la presencia del complejo p50/p50, homodímero transcripcionalmente inactivo, en promotor de IL-2 de LT CD4<sup>+</sup> anérgicos, en tanto que en LT CD4<sup>+</sup> activados se observó la unión del heterodímero p50/p65 (Sundstedt *et al.*, 1996).

### **1.8.3 CTLA-4**

La molécula CTLA-4 (CD152) es un homólogo de CD28 que se une a las proteínas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) (revisado en Chambers, 2001). Sin embargo, a diferencia de CD28, CTLA-4 inhibe los eventos tempranos de activación de las células T, como son la inducción de la expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 y la de CD69, el incremento del volumen celular y la producción de IL-2 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y de IFN- $\gamma$  en linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Krummel & Allison, 1996; Walunas *et al.*, 1996; Blair *et al.*, 1998; Pandiyan *et al.*, 2007). Así mismo, CTLA-4 inhibe la fosforilación de PLC- $\gamma$ , la activación de NF $\kappa$ B y la expresión de componentes de la maquinaria del ciclo celular como ciclina D3 y las cinasas dependientes de ciclina 4 y 6 (Gatta *et al.*, 2002; Vendetti *et al.*, 2002; Brunner *et al.*, 1999). La deficiencia de CTLA-4 en ratones genera un fenotipo letal, los cuales mueren entre la tercera y quinta semana de edad y, a tiempos tempranos en el desarrollo. Asimismo se observa linfoproliferación y una alta producción de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-4 y GM-CSF (del inglés “Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor”) (Tivol *et al.*, 1995).

También se ha reportado que el factor de transcripción NFAT1 se une al promotor de CTLA-4 e induce la expresión de esta proteína, posterior a la estimulación de linfocitos T (Nakano *et al.*, 2007) En base a las evidencias experimentales, la expresión de CTLA-4 es importante en la regulación de la respuesta inmune y en la proliferación celular.

### **1.9 CD43**

Se expresa en todas las células hematopoyéticas, excepto en eritrocitos y es la proteína transmembranal más abundante en los linfocitos T ( $1.5 \times 10^5$  moléculas/célula) (revisado en Aguilar-Delfin *et al.*, 2006). Es una molécula altamente glicosilada, con cargas netas negativas conferidas por el ácido siálico, que se proyecta unos 45nm más allá de la superficie de la célula. Su dominio extracelular tiene 235 aminoácidos y el dominio

intracelular consta de 123 aminoácidos (revisado en Ostberg *et al.*, 1998; Aguilar-Delfin *et al.*, 2006). Existen dos isoformas mayoritarias de CD43, una de 95-115 KDa y otra de 130-135 KDa, cuya expresión parece estar regulada por el estado de activación celular, esto es, la isoforma de mayor peso se expresa preferentemente en linfocitos activados (Jones *et al.*, 1994). Además de ser expresado en la membrana celular, CD43 se encuentra en forma soluble en el plasma sanguíneo (Schmid *et al.*, 1992).

### **1.9.1. Funciones de CD43**

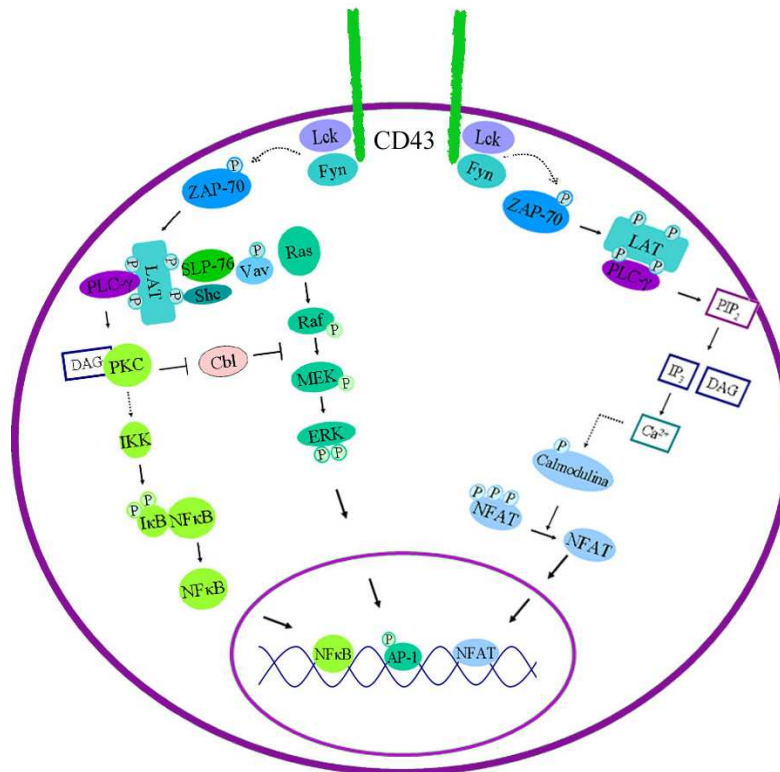
La abundancia de CD43, la diversidad de las moléculas con las que interacciona y las distintas funciones con las que se ha asociado sugieren que esta proteína es importante en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune. A esta molécula se le han atribuido múltiples funciones, como son: activación celular y proliferación, adhesión y homing (revisado en Aguilar-Delfin *et al.*, 2006; Ostberg *et al.*, 1998).

La activación de LT a través de CD43 y el TCR induce intensas señales intracelulares que promueven la proliferación y diferenciación celular, así como la síntesis de numerosas citocinas y otras moléculas que participan de manera importante en la regulación de la respuesta inmune (Park *et al.*, 1991; Mattioli *et al.*, 2004; Fierro *et al.*, 2006). La activación *in vitro* de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria a través de CD3 y CD43 induce su proliferación al igual que si se estimula a través de CD43 y CD28, lo que indica que las señales de estas moléculas son sinérgicas (Kyoizumi *et al.*, 2004).

Por otra parte, LT de ratones deficientes en la expresión de CD28, proliferan cuando son estimulados a través de CD43 (Sperling *et al.*, 1995). Así mismo, las señales de CD43 en combinación con las de CD3 inducen la proliferación celular de linfocitos intraepiteliales de intestino murino, caracterizadas por no expresar CD28 (Bagriacik *et al.*, 2001). En conjunto, estos datos indican que CD43 funciona como un coestimulador independiente de CD28. De hecho, CD43 es una molécula coestimuladora cuyas señales inducen la producción de IL-2 (Fierro *et al.*, 2006), de manera dependiente de su dominio intracitoplásmico, puesto que la carencia de éste inhibe la producción de esta citocina (Park *et al.*, 1991).

### 1.9.2 Cascada de señalización de CD43

Las señales derivadas del entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular involucran la asociación del dominio intracelular de esta molécula con la tirosin cinasa Fyn y Lck (Pedraza-Alva *et al.*, 1996, Alvarado *et al.*, 1995). La activación de estas cinasas favorece la fosforilación en tirosinas de la cadena  $\zeta$  y de las proteínas adaptadoras Shc y SLP-76, así como la fosforilación del factor intercambiador de nucleótidos de guanina, Vav, la formación de macrocomplejos Shc-Vav-Grb2 y la activación de las cinasas MAP, p38 y ERK (Cruz-Muñoz *et al.*, 2003, Pedraza-Alva *et al.*, 1998; Barat & Tremblay, 2002; Layseca-Espinosa *et al.*, 2003). Además, las señales de CD43 inducen la interacción de Cbl con PI3K y Vav, Cbl es fosforilada en residuos de serinas por PKC $\theta$  y se asocia a la proteína  $\tau$  de la familia de proteína 14-3-3, esta interacción inhibe el efecto negativo de Cbl sobre la vía de las MAP cinasas (Fig. 4) (Pedraza-Alva *et al.*, 2001 y datos no publicados).



**Figura 4. Cascadas de señalización inducidas por la molécula coestimuladora CD43.** La activación de los LT a través de CD43 induce la activación de la vía de PKC, Ras y calmodulina, las cuales culminan en la activación de factores de transcripción como NFkB, AP-1 y NFAT.

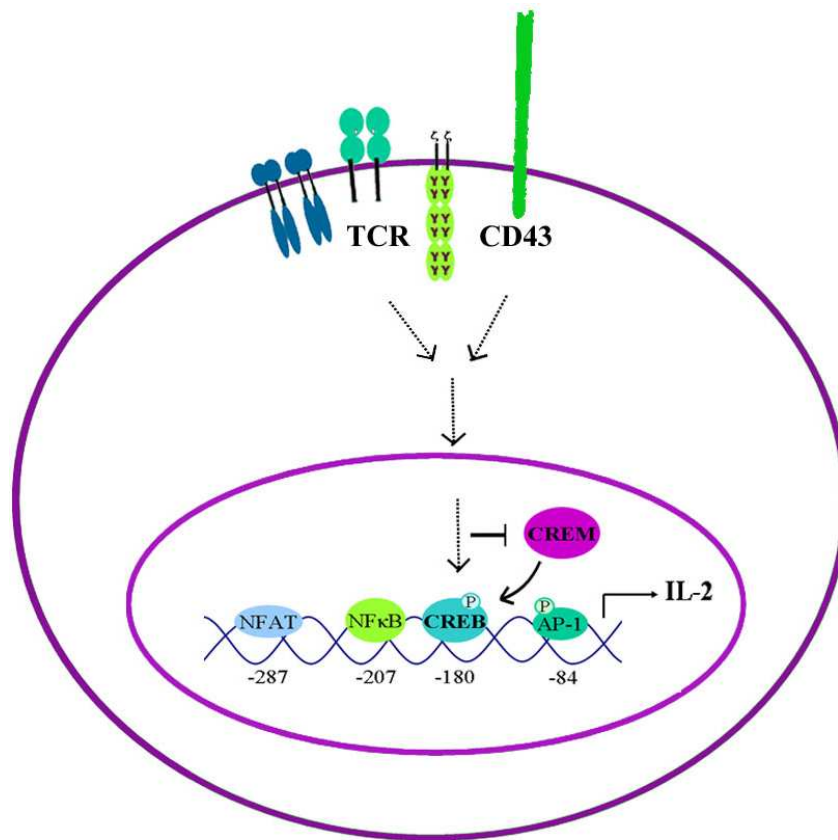
Las señales de CD43 inducen la secreción antígeno-independiente de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, a través de factores de transcripción como AP1, NFκ-B y NFAT, los cuales inducen la producción de IL-2 (Fig. 4) (Santana *et al.*, 2000; Mattioli *et al.*, 2004; Fierro *et al.*, 2006).

El hecho que CD43 sea una molécula tan abundante y rígida nos lleva a pensar que sería una de las primeras moléculas en interactuar con alguno de sus ligandos en la célula presentadora de antígeno durante la activación del LT y, por lo tanto, que las primeras señales que recibe el LT serían las de CD43, favoreciendo así la activación del LT. De acuerdo con esta idea, resultados obtenidos en el laboratorio han mostrado que la estimulación de los linfocitos a través del TCR y CD43 en diferente orden, genera diferentes respuestas biológicas. Cuando se estimula a los LT a través del TCR únicamente, las células entran en un estado anérgico, es decir, no producen IL-2, expresan CTLA-4 y no proliferan (Fierro *et al.*, 2006). En cambio, si los LT reciben las señales de CD43 30 ó 10 minutos después de las señales del TCR, los LT son capaces de producir IL-2 en cantidades suficientes para proliferar, es decir, se previene el estado de anergia (Fierro *et al.*, 2006), a través de un mecanismo molecular desconocido.

Considerando que la disponibilidad de IL-2 es el factor determinante para la diferenciación antígeno-específica de los linfocitos T, proponemos que las señales de CD43 previenen el estado anérgico, al inhibir la unión al promotor de IL-2 de factores de transcripción tales como CREM que reprimen su expresión y/o inducen la unión de factores de transcripción como CREB que favorecen la expresión de IL-2

## 2. Hipótesis.

- Las señales inducidas por CD43 contrarrestan las señales anérgicas generadas por el TCR al promover la expresión IL-2.



### **3. Objetivos.**

- Determinar si la estimulación a través de CD43 favorece la activación de CREB y su unión al promotor de IL-2.
- Determinar si la estimulación a través de CD43 previene la unión de factores de transcripción que regulan negativamente el promotor de IL-2.



## **4. Metodología**

### **4.1 Anticuerpos**

Para la activación de LT se utilizó el anticuerpo monoclonal L10 (IgG<sub>1</sub>) que reconoce el epitope ácido siálico-independiente del extremo amino-terminal de CD43 (Remold-O'Donnell *et al.*, 1986) y el anticuerpo OKT3 (IgG<sub>2</sub>) que reconoce a la molécula CD3 (Hoffman *et al.*, 1980). Como anticuerpo entrecruzador se utilizaron IgGs de conejo anti-IgG de ratón (RaMIg). Se utilizaron los anticuerpos anti-fosfo-CREB (Ser 133), anti-CREB, anti-CREM y anti-Sp1 de Santa Cruz Biotechnology y anti-sustratos fosforilados de PKA (RRXT o RRXS) de Cell Signaling.

### **4.2 Aislamiento y purificación de linfocitos T de sangre periférica.**

Los linfocitos T humanos fueron purificados a partir de concentrados leucocitarios provenientes de donadores sanos (proporcionados por el banco de sangre del Hospital Regional del IMSS Cuernavaca) por centrifugación diferencial con Ficoll-Hypaque (Julius *et al.*, 1973). Se adicionaron 3ml de Ficoll-Hypaque por cada 10ml de sangre previamente diluida 1:1 con PBS (del inglés “Phosphate-Buffered Saline”, NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.3mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.4mM, pH 7.3) y se centrifugaron por 30 minutos a 900 x g. Las células mononucleares recuperadas del gradiente de Ficoll se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en RPMI 1640 (Gibco) suplementado con SFB (suero fetal bovino) 10% (v/v), 2mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomina, 50µM de β-mercaptoetanol). Las células adherentes fueron removidas después de plaquear la suspensión celular en cajas de Petri de plástico toda la noche a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células no adherentes (principalmente linfocitos T y B), se pasaron por una columna de nylon pre-equilibrada con RPMI 1640 suplementado (10% (v/v) SFB, 2mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomina, 50 µM de β-mercaptoetanol), se incubaron por una hora a 37°C en una atmósfera 5% de CO<sub>2</sub> y se eluyeron con 25ml de medio RPMI 1640 suplementado con 2% (v/v) SFB, 2mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100µg/ml

estreptomycin, 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol. La pureza de las células obtenidas fue evaluada por citometría de flujo (OKT3<sup>+</sup> : > 90%, datos no mostrados).

#### **4.3 Mantenimiento y estimulación de líneas celulares**

Las células Jurkat fueron mantenidas en medio RPMI 1640 suplementado con 5% SFB, 2mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 $\mu$ g/ml estreptomycin. Antes de utilizar, las células Jurkat se incubaron toda la noche en medio RPMI 1640 sin SFB con 2mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 $\mu$ g/ml estreptomycin y 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol a 37°C en una atmósfera 5% de CO<sub>2</sub> para disminuir los niveles de activación.

#### **4.4 Estimulación celular.**

Los linfocitos T humanos ( $10 \times 10^6$ ) o las células Jurkat ( $5 \times 10^6$ ) fueron resuspendidos en 5ml de RPMI 1640 suplementado e incubados con los anticuerpos L10 (4 $\mu$ g/ml) y/o OKT3 (4 $\mu$ g/ml) por cinco minutos a temperatura ambiente, posteriormente se adicionó el anticuerpo entrecruzador RaMIg (4 $\mu$ g/ml) y se incubaron las células a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> por los tiempos indicados en el texto. Como control positivo se incluyeron células estimuladas con PMA (20 $\mu$ g/ml) / Ionomycin (500nM) o  $\alpha$ -CD3 (4 $\mu$ g/ml) y  $\alpha$ -CD28 (1 $\mu$ g/ml). En los casos indicados en el texto, se incubó con los inhibidores de MEK PD98059 (8.3 $\mu$ M), de p38 SB203580 (0.83  $\mu$ M), de PKA H89 (8.3 $\mu$ M), de PKC $\mu$  Gö6976 (3.3 nM), de PDE (IBMX, 500  $\mu$ M) o de AC (SQ22536, 100  $\mu$ M) durante 30 minutos previo al estímulo con los anticuerpos.

#### **4.5 Obtención de extractos nucleares**

Las células estimuladas se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 200 $\mu$ l de una solución amortiguadora hipotónica (Buffer A: Hepes 10mM pH 7.6, KCl 10mM, EDTA 0.1mM, EGTA 0.1mM, Espermidina 0.75mM, Espermina 0.15mM) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (PMSF 0.5mM, Aprotinina 2 $\mu$ g/ml, Leupeptina 2 $\mu$ g/ml, Pepstatina 2 $\mu$ g/ml, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 10mM, DTT 1mM). Se adicionaron 200 $\mu$ l más de Buffer A y se incubaron 15 minutos a 4°C. Terminado el tiempo de incubación, se adicionaron 25 $\mu$ l de NP40 al 10% en Buffer A a cada muestra y

se agitaron vigorosamente con el vórtex durante 10 segundos a temperatura ambiente. En seguida se centrifugaron a 13,000 x g durante 40s, se desechó el sobrenadante y se adicionaron 50 µl de una solución amortiguadora de extracción nuclear (Buffer de Lisis Nuclear; Hepes 20mM pH 7.6, PMSF 0.5mM, NaCl 0.4M, EDTA 1mM, EGTA 1mM) suplementado con Aprotinina 4µg/ml, Leupeptina 4µg/ml, Pepstatina A 4µg/ml, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 10mM, DTT 1mM. Las muestras se agitaron vigorosamente con el vórtex durante 15 minutos a 4°C, se centrifugaron a 13,000 x g durante 5 minutos a 4°C y se colectaron los sobrenadantes, los cuales se almacenaron a -70°C hasta su uso.

#### **4.6 Obtención de extractos totales**

Al término de la activación, se adicionó 1ml de PBS frío a las células, se centrifugó en tubos eppendorf por 15 segundos a 13,000 x g y se desechó el sobrenadante. Se adicionaron 100µl de solución amortiguadora de lisis (Tris 20mM pH 7.4, NaCl 250mM, β-glicerolfosfato 25mM, PPINa 2mM, EDTA 2mM pH 7.4, Tritón X-100 1%, Glicerol 10%) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (Antipain 5 µg/ml, PMSF 1mM, Aprotinina 5µg/ml, Leupeptina 5µg/ml, Pepstatina 5µg/ml, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 200mM, DTT 0.5mM) al botón celular y se incubó a 4°C por 10 minutos. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 13 000 x g a 4°C y se recuperaron los sobrenadantes, almacenándose a -70°C hasta su uso.

#### **4.7 Ensayos de retardamiento de movilidad electroforética (EMSA)**

Para marcar radiactivamente el oligonucleótido SLD-2 el cual contiene la región -180 del promotor de IL-2: 5'- GCATCCATTCAGTCAGTCTTTGGGGGT-3', se incubó 1µl del oligonucleótido (100ng/µl) con 6µl de la solución amortiguadora M-MLV Reverse Transcriptase Buffer (250mM Tris-HCl (pH 8.3), 375mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1.5µl de DTT 0.1M, 3µl de dCTP (10µCi/µl), 1µl de Transcriptasa Reversa M-MLV (Gibco-BRL) en un volumen final de 30 µl durante una hora a 37°C y se detuvo la reacción con 70µl de TE (Tris-HCl 10mM pH 7.4, EDTA 1mM pH 8). La fracción de oligonucleótido marcado radiactivamente fue purificada por columna de Sefadex G50 equilibrada en solución amortiguadora TE y la eficiencia del marcaje fue evaluada en un contador de centelleo líquido.

La reacción de unión se preparó con 2.5µg de las proteínas nucleares obtenidas de las

células estimuladas bajo las distintas condiciones experimentales especificadas para cada experimento, 100 000 cpm del oligonucleótido SLD-2 de doble cadena marcado con [<sup>32</sup>P] dCTP, HEPES 20mM pH7.6, NaCl 0.4M, EDTA 1mM, EGTA 1mM, 1µg/µl poly (dI-dC) (Roche), 1µl BSA 1mg/ml, 1µl MgCl<sub>2</sub> 12mM en un volumen final de 20µl. Las muestras se incubaron 20 minutos en hielo, posteriormente se adicionó 1µl de azul de bromofenol y se separaron las muestras por electroforesis en condiciones no desnaturizantes en un gel de acrilamida al 4% a 16 mA en solución amortiguadora TBE (45mM Tris-borato, 1mM EDTA) durante 1.5 horas (Buratowski & Chodosh, 1996). El gel se secó y se expuso a un film para autorradiografía.

Para los ensayos de competencia se adicionaron a las muestras el oligo SLD-2 sin marcar o el oligo que contiene un fragmento del promotor de TNF- $\alpha$  como competidor irrelevante, ambos en un exceso molar 10X. Para los ensayos de retardamiento con anticuerpos se utilizaron de 0.5µg de anticuerpos anti-CREB o anti-CREM.

#### **4.8 Inmunoblot.**

La concentración de proteína en los extractos nucleares o totales fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976). 15µg de proteínas nucleares o 40 µg de proteínas totales se resolvieron por SDS-PAGE al 10%, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.22µm previamente humedecidas en solución amortiguadora de transferencia (Tris/HCl 0.025M, glicina 0.192M y 20% metanol), a 100 Volts por 1.5 horas. Las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente con una solución de leche descremada al 5% en TBS-T (Tris/HCl 10mM pH 7.5, NaCl 150mM y 0.05% Tween 20). Posteriormente las membranas se incubaron con los anticuerpos correspondientes: anti-fosfo-CREB (dilución 1:20000) en BSA al 3% en TBS-T; anti-CREB (dilución 1:2000) en leche descremada al 5% en TBS-T; anti-CREM (dilución 1:5000) en leche descremada al 5% en TBS-T; anti-Sp1 (dilución 1:10000) en leche descremada al 5% en TBS-T; anti-sustratos fosforilados de PKA (dilución 1:500) en BSA al 3% en TBS-T. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Después de lavar la membrana 3 veces con TBS-T, diez minutos cada vez, se agregó el anticuerpo secundario adecuado acoplado a HRP (dilución 1:4000) en leche descremada al 5% en TBS-T. Finalmente se lavó la membrana tres veces con TBS-T, 10 minutos cada vez y se reveló por el método de quimioluminiscencia, siguiendo las instrucciones del fabricante (Western Lightning-ECL de Perkin-Elmer).

## 5. Resultados

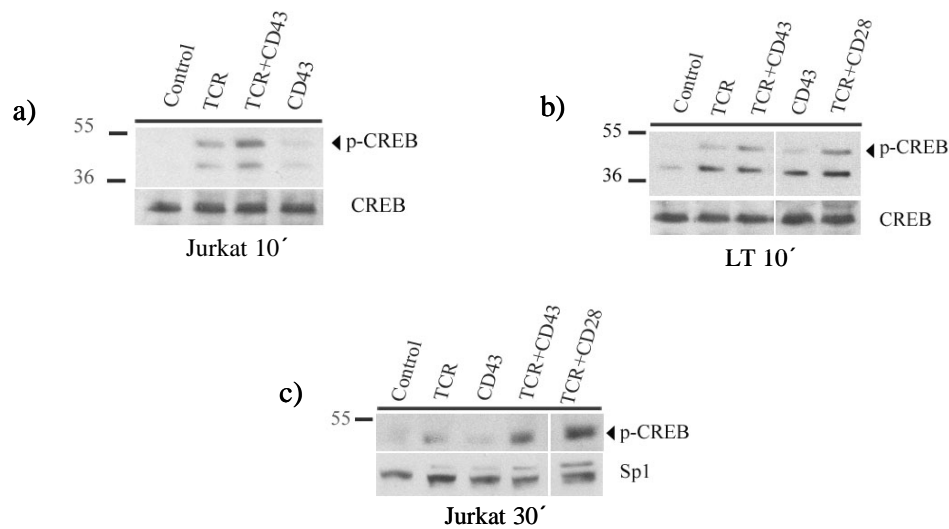
### 5.1 Las señales coestimuladoras de CD43 inducen la fosforilación de CREB.

Una vez que se ha reconocido al antígeno, el paso crítico para la activación del LT es la expresión del gene de IL-2 (Revisado en Lin & Leonard, 1997). Esto involucra la activación de factores de transcripción como NF $\kappa$ B, AP-1, NFAT y CREB (Rothenberg & Ward, 1996; Santana *et al.*, 2000; Tenbrock *et al.*, 2003). Las señales coestimuladoras de CD43 activan cascadas de señalización que inducen la producción de IL-2, más aún, estas señales son importantes porque previenen el estado de anergia inducido por las señales del TCR (Fierro *et al.*, 2006). Sin embargo, se desconoce si el factor de transcripción CREB también juega un papel importante en la regulación del gen de IL-2 en respuesta a las señales de CD43. En base a esto, evaluamos si las señales coestimuladoras de CD43 inducen la activación de este factor de transcripción.

Estudios previos mostraron que la activación de LT en respuesta al estímulo con PMA/Ionomicina, TCR o TCR/CD28 involucra la fosforilación de CREB (Hsueh *et al.*, 1997; Muthusamy & Leiden, 1998; Yu *et al.*, 2001). Por tanto, se estimularon células Jurkat y LT a través del TCR y CD43 durante 10 minutos, después de lo cual se obtuvieron los extractos totales y se evaluaron los niveles de fosforilación de CREB. Las señales coestimuladoras de CD43 inducen la fosforilación de CREB (43kDa) a tiempos cortos tanto en células Jurkat (Fig. 5a) como en LT (Fig. 5b). De acuerdo con datos previos que muestran que, en LT, CREB se mantiene fosforilado hasta 30 minutos después del estímulo con Concanavalina A (Hughes-Fulford *et al.*, 2005), encontramos que las señales coestimuladoras de CD43 inducen un aumento en los niveles de CREB fosforilado en el núcleo mayores a los observados por el estímulo del TCR únicamente (Fig. 5c). Estas diferencias son reales ya que se observan niveles protéicos similares del factor de transcripción Sp1 (el cual se encuentra constitutivamente en el núcleo), independientemente del estímulo (Fig. 5c, panel inferior). Como se esperaba, en LT estimulados a través del TCR y CD28, también se observa un aumento en los niveles de fosforilación de CREB en el núcleo respecto a las células sin estímulo o estimuladas únicamente a través del TCR (Fig. 5c).

En conjunto, estos resultados indican que las señales coestimuladoras de CD43 son

capaces de inducir la fosforilación de CREB de manera rápida (10 minutos) y hasta 30 minutos después del estímulo.



**Figura 5. Las señales coestimuladoras de CD43 favorecen la fosforilación de CREB.**

a) Células Jurkat arrestadas toda la noche en medio RPMI sin SFB fueron estimuladas a través de TCR (OKT3) y/o CD43 (L10) durante 10 minutos. Se obtuvieron los extractos totales y se evaluó la fosforilación de CREB en la serina 133 mediante ensayos de inmunoblot. b) LT fueron estimulados a través del TCR y/o CD43 por 10 minutos y se obtuvieron los extractos totales para realizar el inmunoblot para evaluar los niveles de fosforilación de CREB en la serina 133. c) Células Jurkat fueron arrestadas en medio RPMI sin SFB toda la noche y estimuladas durante 30 minutos a través del TCR y/o CD43, se obtuvieron los extractos nucleares y se evaluaron los niveles de fosforilación de CREB mediante inmunoblot. En todos los casos se utilizaron células sin estimular como Control. Los niveles totales de CREB y/o Sp1 fueron determinados como control de carga. Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

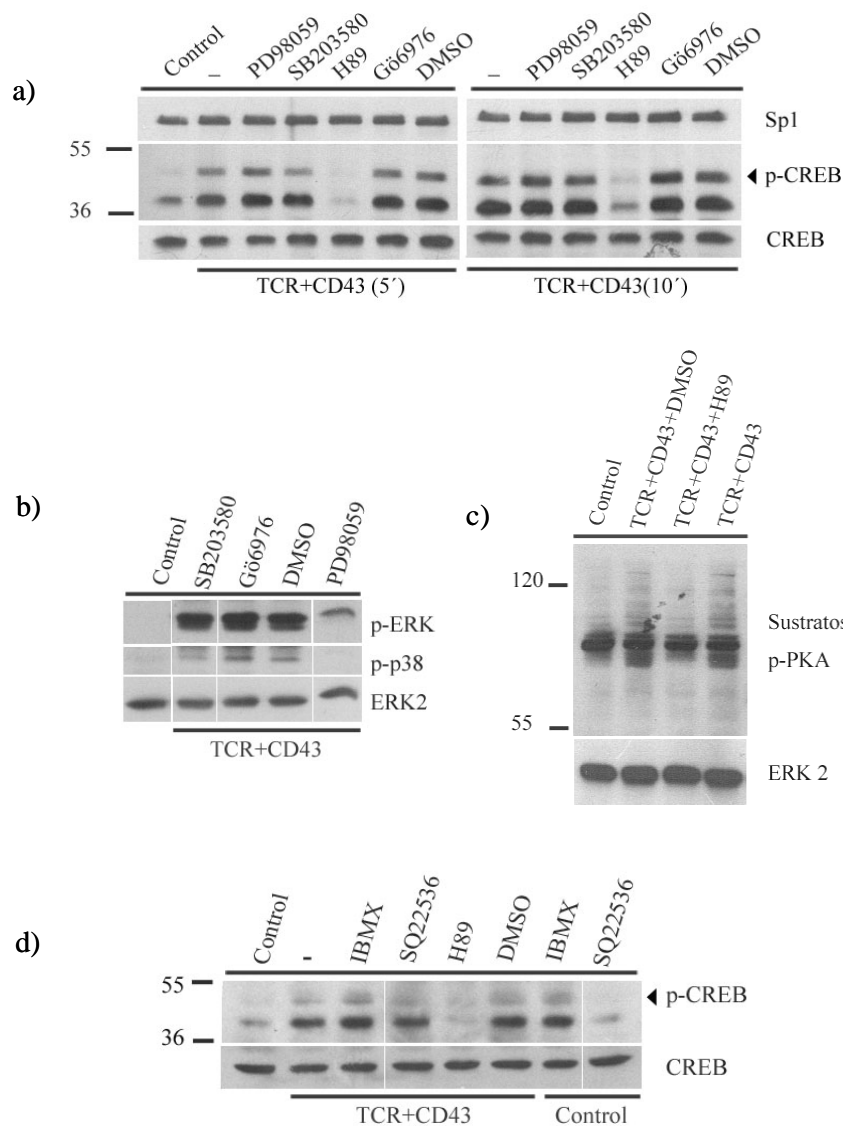
## 5.2 La fosforilación de CREB inducida por las señales coestimuladoras de CD43 es dependiente de PKA.

Se considera que la vía canónica de activación de CREB es la vía de PKA, sin embargo se han descubierto vías alternas por las que CREB es fosforilado en LT, entre estas se encuentran las cinasas: MEK/ERK, p38, y PKC (Abrahamsen *et al.*, 2004; Hsueh *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2001; Muthusamy & Leiden, 1998). Para identificar la(s) vía(s) responsable(s) de la fosforilación de CREB en respuesta a las señales coestimuladoras de CD43, células Jurkat fueron incubadas durante 30 minutos con inhibidores de MEK (PD98059), p38 (SB203580), PKA (H89) o PKC (Gö6976), y estimuladas a través del

TCR y/o CD43 durante 5 ó 10 minutos y los niveles de fosforilación de CREB en extractos totales se evaluaron por inmunoblot.

El inhibidor de PKA (H89) redujo casi totalmente los niveles de fosforilación de CREB, independientemente del tiempo de estímulo comparado con lo observado en células tratadas con el vehículo solamente (DMSO) (una reducción del 74% 5 minutos post-estímulo y 70% 10 minutos post-estímulo, medido por densitometría) (Fig. 6a). El inhibidor de p38 (SB203580) redujo ligeramente los niveles de fosforilación de CREB (una reducción del 24% 5 minutos post-estímulo y 5% 10 minutos post-estímulo, medido por densitometría). En contraste, los inhibidores de MEK (PD98059) y de PKC (Gö6976) no tuvieron efecto en los niveles de fosforilación de CREB. Los cambios detectados en los niveles de fosforilación de CREB no se deben a diferencias en los niveles de proteína cargada ni a diferencias en la integridad de los extractos ya que se observan niveles similares tanto de CREB (Fig. 6a, panel inferior) como de Sp1 (Fig. 6a, panel superior), independientemente del tratamiento. Para corroborar que la vía de MEK/ERK no está involucrada en la fosforilación de CREB en respuesta a las señales coestimuladoras de CD43, verificamos el efecto del inhibidor de MEK (PD98059) sobre los niveles de fosforilación de ERK, blanco directo de MEK. El inhibidor PD98059 redujo los niveles de fosforilación de ERK, del mismo modo que el inhibidor de p38 (SB203580) previno la autofosforilación de p38 (Fig. 6b). Por tanto, podemos concluir que la vía de PKA es la vía prevalente para la fosforilación de CREB en respuesta a las señales de CD43 y que la vía de ERK no está involucrada en la fosforilación de CREB inducida por CD43, mientras que la vía de p38 contribuye parcialmente en la activación de este factor de transcripción en respuesta a las señales de CD43.

Para confirmar que las señales coestimuladoras de CD43 inducen la activación de PKA, células Jurkat fueron incubadas durante 30 minutos con el inhibidor H89 antes de ser estimuladas a través del TCR y CD43 durante 10 minutos y se evaluó el nivel de fosforilación de diferentes sustratos de PKA en extractos totales por inmunoblot, utilizando un anticuerpo que reconoce sustratos fosforilados por PKA. Las señales coestimuladoras de CD43 inducen un aumento en la fosforilación de proteínas blanco de PKA comparado con lo observado en extractos de células sin estimular (Fig. 6c). El aumento en la fosforilación de estas proteínas depende de PKA ya que el inhibidor H89 previno la fosforilación de sus sustratos (Fig. 6c). Esto nos indica que las señales coestimuladoras de CD43 inducen la activación de PKA.



**Figura 6. La fosforilación CREB es inducida por PKA en respuesta a las señales de CD43.** Células Jurkat fueron arrestadas toda la noche en medio RPMI sin SFB e incubadas en ausencia (-) o presencia de los inhibidores de MEK (PD98059, 8.3 $\mu$ M), p38 (SB203580, 0.83  $\mu$ M), PKA (H89, 8.3  $\mu$ M) y PKC (Gö6976, 3.3 nM), de PDE (IBMX, 500  $\mu$ M), de AC (SQ22536, 100  $\mu$ M) durante 30 minutos antes del estímulo a través de TCR (OKT3) y/o CD43 (L10) por los tiempos indicados. Los niveles de CREB fosforilado en la serina 133 de CREB y Sp1 (a); de ERK fosforilado, p38 fosforilada y ERK total (b); de sustratos de PKA fosforilados (RRXT o RRXS) de ERK2 (c) y los niveles de fosforilación de CREB en la serina 133 y CREM (d) se evaluaron por medio de inmunoblot en extractos totales utilizando los anticuerpos indicados. Como control se incluyeron células incubadas con los inhibidores sin estimular. Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes.



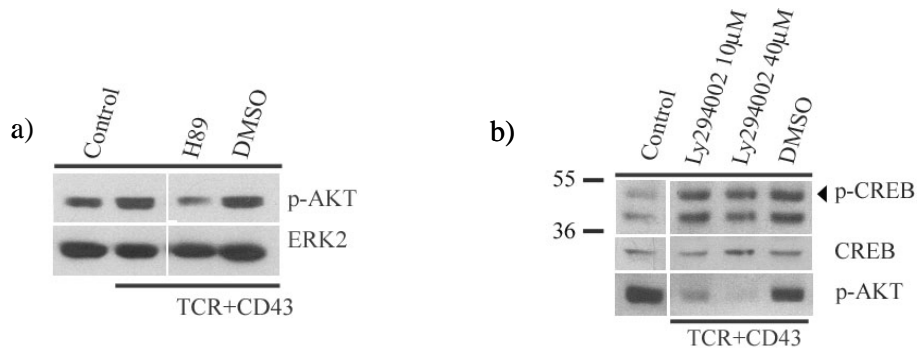
PKA es regulada por los niveles de AMPc, los cuales a su vez, son regulados negativamente por las fosfodiesterasas (PDE, por sus siglas en inglés) y positivamente por adenilato ciclasas (AC). Para confirmar la participación del AMPc en la fosforilación de CREB, células Jurkat fueron incubadas con los inhibidores IBMX y SQ22536 (los cuales inhiben la actividad de la PDE y de la AC, respectivamente) 30 minutos antes de ser estimuladas a través del TCR y CD43 por 10 minutos. Se obtuvieron los extractos totales y se determinaron los niveles de fosforilación de CREB mediante inmunoblot. Como se esperaba, los niveles de CREB fosforilado aumentaron en células sin estimular incubadas con el inhibidor IBMX comparados con los niveles observados en células no tratadas (Fig. 6d). En cambio, la inhibición de la AC por el inhibidor SQ22536 en células sin estimular disminuye la fosforilación de CREB (Fig. 6d).

Cuando las células Jurkat fueron estimuladas a través del TCR y CD43 después de ser incubadas con el inhibidor IBMX se observó un aumento en los niveles de fosforilación de CREB con respecto a las células estimuladas a través del TCR y CD43 sin inhibidor, posiblemente por la inhibición en la hidrólisis de AMPc (Fig. 6d). En cambio, cuando las células fueron estimuladas a través del TCR y CD43 después de la incubación con el inhibidor SQ22536, la fosforilación de CREB disminuyó debido a la inhibición de la producción de AMPc con respecto a las células estimuladas en ausencia de inhibidor o con DMSO solamente (una reducción del 23%, medido por densitometría). Sin embargo, el inhibidor de SQ22536 no reduce la fosforilación de CREB a los niveles observados con el inhibidor H89.

En conjunto, estos resultados indican que, como parte de las señales de activación de LT, CD43 induce cambios en la concentración de AMPc los cuales, a su vez, regulan la actividad de PKA. De hecho, nuestro grupo cuenta con resultados que sugieren que las señales de CD43 inducen incrementos en la concentración de este segundo mensajero (resultados no publicados).

Ya que se ha reportado que H89, además de inhibir a PKA, inhibe la actividad de Akt, una cinasa que fosforila a CREB de manera dependiente de PI3K (Davies *et al.*, 2000; Kuijl *et al.*, 2007; Caravatta *et al.*, 2008) y que CD43 activa a PI3K (Layseca-Espinosa *et al.*, 2003), determinamos si Akt está involucrada en la fosforilación de CREB en respuesta a las señales coestimuladoras de CD43. Para esto utilizamos extractos totales de células Jurkat incubadas durante 30 minutos con el inhibidor H89 previo al estímulo a

través del TCR y CD43 durante 10 minutos para realizar un ensayo de inmunoblot. Las señales coestimuladoras de CD43 inducen mayores niveles de fosforilación de Akt comparado con los niveles de Akt fosforilada en células no tratadas (Fig. 7a), mientras que el tratamiento con el inhibidor H89 redujo la fosforilación de Akt, como se ha reportado (Davies *et al.*, 2000) (Fig. 7a).



**Figura 7. La vía canónica de Akt no está involucrada en la fosforilación de CREB inducida por CD43.** a) Células Jurkat fueron incubadas en ausencia (-) o presencia del inhibidor H89 (8.3  $\mu$ M) durante 30 minutos antes del estímulo a través del TCR (OKT3) y CD43 (L10) durante 10 minutos y los niveles de fosforilación de Akt en la treonina 308 se evaluaron en extractos totales por inmunoblot con el anticuerpo indicado. Como control de carga se determinaron los niveles proteicos de ERK2. b) Células Jurkat fueron estimuladas con anticuerpos anti-TCR (OKT3) y anti-CD43 (L10) durante 10 minutos después de ser incubadas con un inhibidor de PI3K (Ly294002) por 30 minutos, se obtuvieron los extractos totales y se evaluaron los niveles de fosforilación de CREB en la serina 133, de fosforilación de AKT en la treonina 308 y de CREB total se determinaron por medio de inmunoblot utilizando los anticuerpos indicados. Se incluyeron células sin inhibidor y sin estímulo (Control). Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

Para evaluar la participación de Akt en la fosforilación de CREB inducida por las señales coestimuladoras de CD43, células Jurkat fueron incubadas con el inhibidor de PI3K (Ly) durante 30 minutos y, posteriormente, se estimularon a través del TCR y CD43 durante 10 minutos. El inhibidor Ly294002 redujo casi totalmente los niveles de fosforilación de Akt (Fig. 7b, panel inferior), sin embargo, este inhibidor no tuvo efecto alguno en los niveles de fosforilación de CREB (Fig. 7b, panel superior). Estos resultados indican que a pesar de que las señales de CD43 inducen la activación de Akt, la vía canónica de activación de Akt no es responsable de la fosforilación de CREB observada en respuesta a las señales coestimuladoras de CD43.

### **5.3 Regulación de la unión de CREB y CREM al promotor de IL-2 en respuesta a las señales coestimuladoras de CD43.**

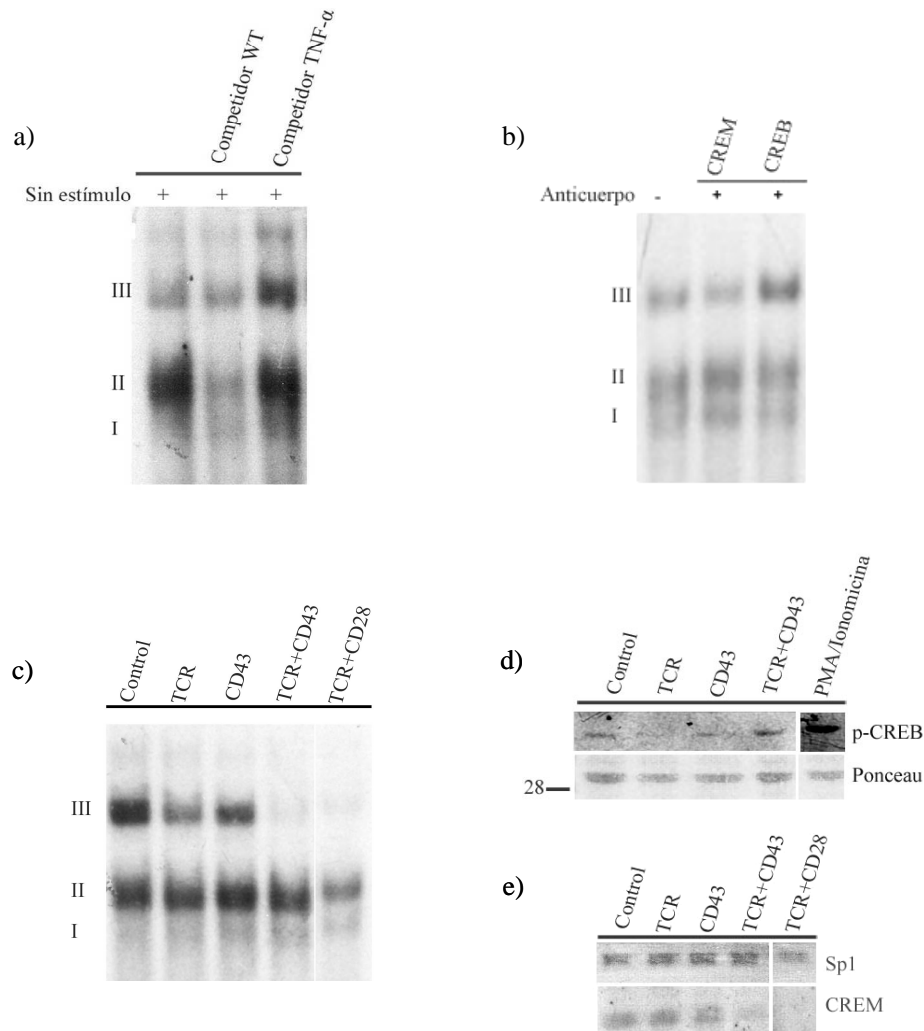
La expresión de IL-2 es regulada positivamente por CREB en LT estimulados a través del TCR y CD28, en tanto que CREM, también miembro de la familia de CREB, regula negativamente su transcripción (Tenbrock *et al.*, 2003). De acuerdo con esto, CREM se encuentra unido constitutivamente a la región -180 del promotor de IL-2 tanto en células anérgicas como en LT de pacientes con Lupus Eritematoso (Powell *et al.*, 1999; Tenbrock *et al.*, 2002). Interesantemente CREB también se une a esta región del promotor de IL-2 (Powell *et al.*, 1999).

Considerando que las señales dependientes de CD43 previenen el estado anérgico resultante del entrecruzamiento del TCR (Fierro *et al.*, 2006) y que los resultados descritos arriba indican que CD43 modula la fosforilación de CREB, evaluamos si CD43 regula la unión de estos factores al sitio -180 del promotor de IL-2 humano por medio de ensayos de retardamiento de movilidad electroforética (EMSA).

Como primera aproximación determinamos qué complejos DNA-proteína se forman entre el oligonucleótido que contiene la secuencia de unión a factores de transcripción de la familia de CREB en la región -180 del promotor de IL-2 (SLD-2) y extractos nucleares de LT no estimulados. De acuerdo con lo reportado por Powell *et al.*, 1999, observamos principalmente la formación de tres complejos DNA-proteína que denominamos I, II, III (Fig. 8a). La formación de estos complejos es específica ya que un exceso molar de 10X de la sonda no marcada inhibe su formación, mientras que el exceso molar 10X de una sonda irrelevante (TNF- $\alpha$ ) no marcada no tiene efecto sobre la unión de estos factores de transcripción a la sonda (Fig. 8a).

Para identificar la presencia de CREB o CREM en alguno de estos complejos se adicionaron anticuerpos específicos contra estos factores y se evaluó su efecto sobre la formación de los complejos DNA-proteína descritos en la figura 8. El anticuerpo anti-CREB retardó el complejo II ya que la intensidad de este complejo disminuyó, observándose además un aumento en la intensidad de la señal a la altura del complejo III (Fig. 8b). Sin embargo, el complejo II no se retarda por completo, lo que sugiere la presencia de otras proteínas en el complejo. Por su lado, el anticuerpo anti-CREM redujo la formación del complejo III. En conjunto, estos resultados confirman que tanto CREB

como CREM se unen a la región -180 del promotor de IL-2 humano en LT no estimulados.

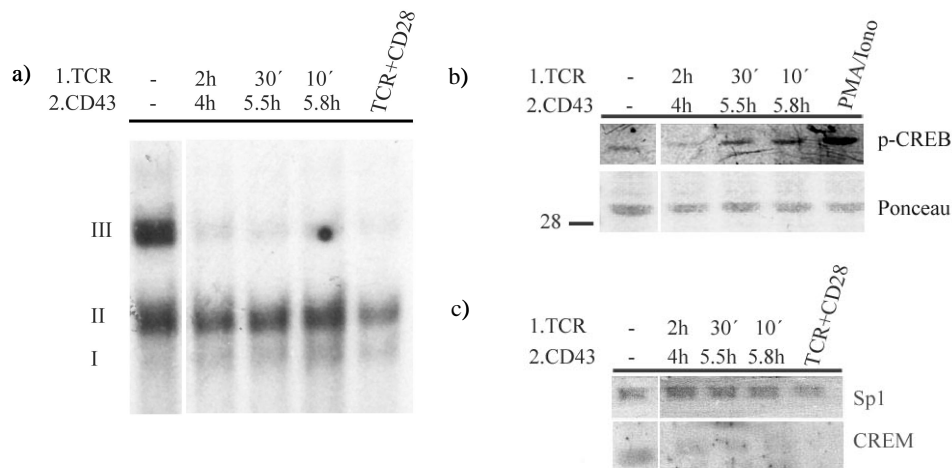


**Figura 8. CREB y CREM se asocian a la sonda SLD-2 en respuesta a las señales de CD43.** a) La unión de factores de transcripción al promotor de IL-2 fue evaluada por medio de EMSA utilizando la sonda marcada SLD-2, la cual comprende la secuencia de unión a factores de transcripción de la familia de CREB en la región -180 del promotor de IL-2 humano, en ausencia ó en presencia de un exceso 10M de SLD-2 no marcado como competidor específico (Wt) o de un exceso 10M de la sonda de unión a TNF- $\alpha$  como competidor no específico (TNF- $\alpha$ ). b) La presencia de CREB y CREM en los complejos DNA-proteínas formados por extractos nucleares de LT sin estimular y la sonda SLD-2 se determinó utilizando anticuerpos anti-CREB o anti-CREB. c) LT fueron estimulados a través del TCR (OKT3) y CD43 (L10) durante seis horas, se obtuvieron los extractos nucleares y se evaluó la unión de CREB y de CREM a la sonda SLD-2 mediante EMSA. Se evaluaron los niveles de fosforilación de CREB (d) o de CREM (e) mediante inmunoblot y se determinaron los niveles totales de Sp1 como control de carga. Se incluyeron células sin estímulo (Control). Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

En base a esto y a que, durante la activación normal de los LT, CREB fosforilado se encuentra unido al promotor de IL-2 seis horas después del estímulo (TCR+CD28) y que éste es reemplazado por CREM 24 horas después del mismo (Tenbrock *et al.*, 2003), se evaluó si las señales de CD43 afectan la unión de estos factores de transcripción a la región -180 del promotor de IL-2 a estos tiempos. Para ello, LT humanos fueron estimulados a través del TCR y/o CD43. Seis horas después de los estímulos se obtuvieron los extractos nucleares y se evaluó la unión de CREB y CREM al oligonucleótido SLD-2 por medio de EMSA. Bajo estas condiciones experimentales, la formación del complejo II, complejo en el cual se encuentra el factor de transcripción CREB, permanece prácticamente constante independientemente del tratamiento (Fig. 8c). Sin embargo, de acuerdo con los resultados presentados previamente, los niveles de fosforilación de CREB en respuesta a las señales coestimuladoras de CD43 aumentan comparados con los niveles inducidos por las señales del TCR en ausencia de coestimulación (Fig. 8d). Esto nos sugiere que, si bien CD43 parece no regular la unión de CREB al promotor de IL-2, regula su estado de activación al inducir su fosforilación. A diferencia de lo que ocurre con el complejo II, la formación del complejo III, complejo en el que se encuentra CREM, es inhibida por las señales co-estimuladoras de CD43 (Fig. 8c). Esto concuerda con que los LT que reciben señales co-estimuladoras (TCR+CD43) tienen niveles proteicos de CREM menores en el núcleo, comparado con los niveles de CREM en células sin estimular o que recibieron las señales del TCR o de CD43 de manera independiente (Fig. 8e). Estos resultados sugieren que las señales coestimuladoras de CD43 por un lado inhiben la unión de CREM al promotor de IL-2 reduciendo sus niveles en el núcleo y por el otro, promueven la activación de CREB seis horas después del estímulo.

Antecedentes de nuestro laboratorio sugieren la existencia de una ventana de tiempo en la que las señales de CD43 contrarrestan las señales anérgicas del TCR. Sin embargo, cuando los LT reciben las señales de CD43 dos horas después de las señales del TCR, los LT ya no son capaces de producir IL-2 y, por tanto, no proliferan. En cambio, cuando las señales de CD43 son recibidas 30 minutos o menos después de las señales del TCR, éstos recuperan su capacidad para producir IL-2 y de proliferar (Fierro *et al.*, 2006). En base a esto, investigamos si las señales de CD43 regulan a CREB y/o CREM en esta ventana de tiempo. De acuerdo con los resultados mostrados previamente (Fig. 8c), las señales de CD43 parecen no regular la unión de CREB al promotor de IL-2 (complejo II) cuando

éstas son recibidas 2 horas, 30 minutos o 10 minutos después del TCR (Fig. 9a). De igual modo, las señales de CD43 tampoco inducen la fosforilación de CREB cuando éstas ocurren dos horas después de las señales del TCR (Fig. 9b). Sin embargo, los niveles de fosforilación de CREB aumentan conforme las señales de CD43 ocurren a tiempos más cercanos a la activación por el TCR (30 ó 10 minutos) (Fig.9b). Por otra parte, la unión de CREM al promotor de IL-2 es inhibida por las señales de CD43 aún cuando estas señales sean recibidas 2 horas después de las del TCR (Fig. 9a), lo cual parece correlacionar con los niveles proteicos de este factor transcripcional observados en el núcleo (Fig. 9c).



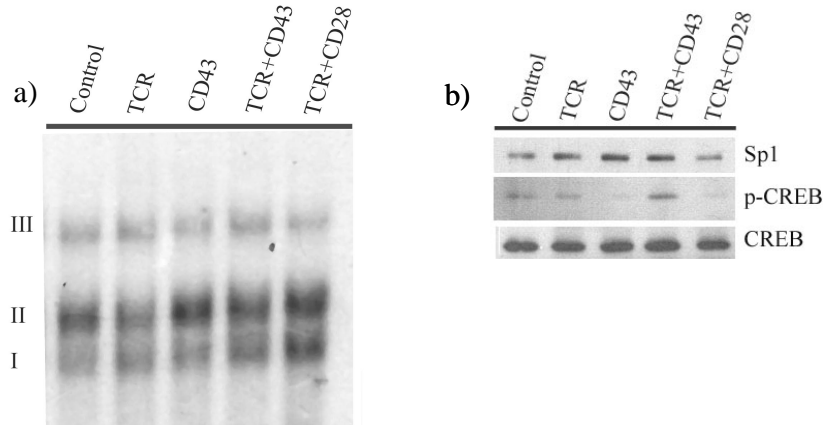
**Figura 9. Las señales de CD43 inducen la fosforilación de CREB 6 horas después del estímulo.** LT fueron estimulados a través del TCR (OKT3) y CD43 (L10) a los tiempos indicados durante 6 horas, se obtuvieron los extractos nucleares y se evaluó la unión de CREB y de CREM a la sonda SLD-2 mediante EMSA. b) LT fueron estimulados a través del TCR (OKT3) durante 2 horas, 30 minutos o 10 minutos y después con CD43 dejando seguir por 6 horas, se obtuvieron los extractos nucleares y se evaluaron los niveles de fosforilación de CREB en la serina 133 (b) o CREM y Sp1 (c) por medio de inmunoblot. Se incluyeron células sin estímulo (Control). Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes. Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

En conjunto, estos resultados indican que las señales coestimuladoras de CD43 no regulan la unión de CREB al promotor de IL-2 pero sí regulan la activación de CREB en el núcleo 6 horas después del estímulo e inducen mayores niveles de fosforilación de CREB siempre y cuando sean recibidas 30 minutos o menos después de las señales del TCR. Importantemente, las señales de CD43 inhiben la unión de CREM al promotor de

IL-2 6 horas después del estímulo aún cuando éstas ocurran dos horas después del estímulo a través del TCR.

**5.4 Las señales coestimuladoras de CD43 no regulan la unión de CREM 24 horas después del estímulo pero mantienen los niveles de fosforilación de CREB.**

CREM no sólo regula negativamente la transcripción de IL-2 en células anérgicas, sino que también lo hace durante la activación de los LT. De hecho, CREM se encuentra unido al promotor de IL-2 24 horas después del estímulo de LT a través del TCR y CD28 (Tenbrock *et al.*, 2003). En base a esto, evaluamos la unión de este factor 24 hrs después de los estímulos con TCR y/o CD43. A este tiempo, observamos que los complejos II y III se forman independientemente del estímulo (Fig. 10a). A diferencia de lo que ocurre a las 6 horas de estímulo (Fig. 8c), las señales de CD43 no afectan la formación del complejo III (Fig. 10a), es decir, que las señales de CD43 no afectan la unión de CREM al promotor de IL-2 *in vitro* 24 horas después del estímulo.



**Figura 10. Las señales de CD43 no inhiben la unión de CREM al promotor de IL-2 24 horas después del estímulo a través del TCR y CD43.** LT fueron estimulados a través del TCR (OKT3) y/o CD43 (L10) durante 24 horas, se obtuvieron los extractos nucleares y se evaluó la unión de CREB y CREM a la sonda SLD-2 mediante EMSA. b) Células Jurkat fueron estimuladas a través del TCR (OKT3) y CD43 (L10) durante 24 horas, se obtuvieron los extractos totales y se evaluaron los niveles de fosforilación de CREB en la serina 133 por medio de inmunoblot. Como control de carga se determinaron los niveles proteicos de CREB. Se incluyeron células sin estímulo (Control). Los resultados mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

A pesar de esto, encontramos niveles mayores de CREB fosforilado a las 24 horas en respuesta a las señales coestimuladoras de CD43 (Fig. 10b), lo cual no ocurre cuando las células Jurkat reciben las señales coestimuladoras de CD28. En conjunto estos resultados nos sugieren que las señales de CD43, a diferencia de lo que ocurre 6 horas después del estímulo, no inhiben la unión de CREM al promotor de IL-2 después de 24 horas. En cambio, las señales coestimuladoras de CD43 mantienen la fosforilación de CREB 24 horas después del estímulo probablemente para regular otros genes importantes en la activación de los LT.



## 6. DISCUSIÓN

CREB es un factor de transcripción crítico para la producción de IL-2. Mediante su interacción con la proteína CBP, induce la unión de la acetil transferasa p300 y el reclutamiento de la maquinaria de transcripción en el promotor de IL-2, regulando positivamente la transcripción de este gen (Butscher *et al.*, 2001; Tenbrock *et al.*, 2003). De hecho, la expresión de una proteína dominante negativa de CREB reduce notablemente la expresión de IL-2 (Barton *et al.*, 1996). Por el contrario, otro miembro de la familia de CREB, CREM, regula negativamente la transcripción de IL-2 en células anérgicas así como durante la activación celular, por carecer del dominio rico en glutamina Q2 que interactúa con la RNA polimerasa II (Powell *et al.*, 1999; Tenbrock *et al.*, 2003; Asahara *et al.*, 2001). El hecho que CD43, una molécula coestimuladora, induzca la producción de IL-2 (Park *et al.*, 1991) mediante la activación de los factores de transcripción NF $\kappa$ B, NFAT y AP-1 (Santana *et al.*, 2000) y que sus señales puedan prevenir el estado de anergia en LT (Fierro *et al.*, 2006), nos condujeron a investigar si las señales de CD43 inducen la fosforilación de CREB como un posible mecanismo para prevenir las señales anérgicas del TCR.

### 6.1 CD43 induce la fosforilación de CREB

Se han descrito varias vías de señalización que conducen a la fosforilación de CREB en la serina 133, necesaria para que ocurra su activación. En LT las señales del TCR inducen la fosforilación de CREB por una vía de señalización en la que participan ERK/RSK2 y PKA a tiempos cortos ( $\leq 10$  minutos) (Muthusamy & Leiden, 1998; Abrahamsen *et al.*, 2004), mientras que la coestimulación a través de CD28 induce una activación alterna de CREB dependiente de las vías de CamKIV, p38 y ERK a tiempos más largos (20 minutos después del estímulo) (Yu *et al.*, 2001). En este trabajo demostramos que CREB es fosforilado en la serina 133 de manera rápida (10-30 min) en respuesta a las señales coestimuladoras de CD43 y en niveles mayores a lo observado por el estímulo a través del TCR tanto en células Jurkat como en LT por una vía dependiente de PKA. Así mismo, observamos que este factor de transcripción fosforilado permanece en el núcleo hasta por 30 minutos después del estímulo de CD43.

La activación de la cinasa PKA depende de altas concentraciones de AMPc. Éste se une a las 2 subunidades reguladoras de PKA, promoviendo un cambio conformacional que conlleva a la liberación y activación de las subunidades catalíticas y la subsiguiente fosforilación de múltiples sustratos (revisado en Kirschner *et al.*, 2009). A su vez, los niveles de AMPc están regulados por la AC, cuya actividad se induce al menos por dos mecanismos. Un mecanismo dependiente de la activación de un receptor acoplado a una proteína G heterotrimérica, la cual al ser activada, se disocia liberando a la subunidad  $\alpha$ , que interacciona con la AC (revisado en Hanoune & Defer, 2001). En el segundo mecanismo descrito en LT, las señales del TCR activan a PKC que, a su vez, activa a la AC, hidrolizando ATP y generando AMPc (Yoshimura & Cooper, 1993).

Se ha reportado que en LT activados por el TCR o por el receptor de IL-1 $\alpha$ , PKA I es activada por PKC (Laxminarayana & Kammer, 1996). Nuestros resultados con el inhibidor de PKC (Gö6976) muestran que los niveles de CREB fosforilado en respuesta a las señales de CD43 no se ven alterados. Bajo este esquema, no podemos descartar la activación de PKA dependiente de PKC en respuesta a CD43, puesto que el inhibidor Gö6976 inhibe eficientemente a las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\mu$  de PKC pero no a la isoforma  $\zeta$  (Martiny-Baron *et al.*, 1993), la cual puede activar a la AC (Kawabe *et al.*, 1994). Nuestros experimentos no nos permiten descartar la participación de proteínas G heterotriméricas en esta vía de señalización. Sin embargo, ya que las señales de CD43 inducen la activación de PKC  $\zeta$  (del Río *et al.*, 2004), que CD43 induce la fosforilación de CREB y que esta fosforilación es dependiente de PKA, proponemos que las señales de CD43 activan a PKC  $\zeta$ , la cual activa a la AC. La AC, a su vez, hidrolizaría ATP generando AMPc, el cual se une a las subunidades regulatorias de PKA induciendo la liberación de sus subunidades catalíticas resultando así en la fosforilación CREB en el núcleo.

La actividad de PKA depende de la disponibilidad de AMPc, la cual está regulada por la AC. El inhibidor de la AC (SQ22536) no redujo totalmente los niveles de fosforilación de CREB como lo hizo el inhibidor de PKA (H89) en células estimuladas 10 minutos con TCR y CD43, lo que sugiere que existe la participación de otra u otras vías involucradas en la fosforilación de CREB las cuales son inhibidas por H89. En este sentido, se ha reportado que H89 además de inhibir a la cinasa PKA, inhibe también a Akt (Kuijl *et al.*, 2007), una cinasa que fosforila a CREB en respuesta a TRAIL (del

inglés “Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand”) (Caravatta *et al.*, 2008). Nuestros resultados señalan que, aunque las señales de CD43 inducen la activación de Akt, esta vía no parece ser responsable de la fosforilación de CREB en respuesta a las señales de CD43, ya que el inhibidor Ly294002 no modifica su fosforilación.

## **6.2 Posibles vías alternas de fosforilación de CREB dependientes de CD43**

Si bien no hemos identificado la vía de señalización responsable de la fosforilación de CREB que actúa en conjunto con PKA en respuesta a las señales de CD43, existen varias posibilidades por explorar:

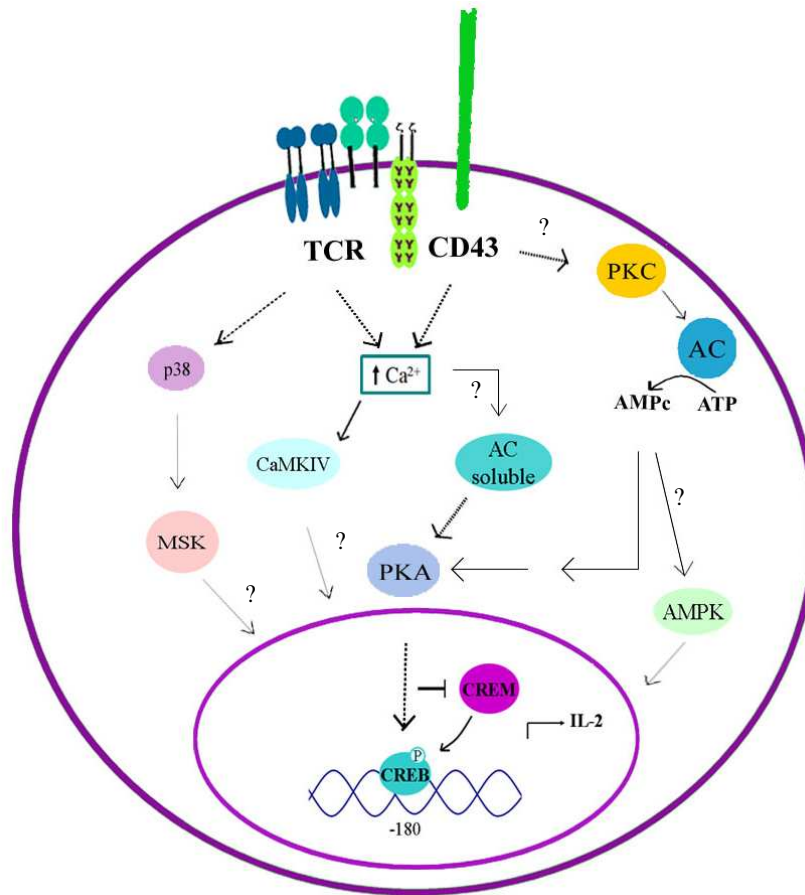
1. Nuestros resultados muestran que p38 está parcialmente involucrada en la fosforilación de CREB en respuesta a las señales de CD43. Se ha reportado que p38 puede activar a MSK (“Mitogen and stress activated kinases”) y que MSK fosforila a CREB en respuesta al estímulo del TCR (Kaiser *et al.*, 2007). El hecho que H89 inhiba la actividad de MSK (Davies *et al.*, 2000), plantea la posibilidad de que la cinasa MSK también contribuya a la fosforilación de CREB que detectamos en respuesta a las señales de CD43 (Fig. 11). En el mismo sentido, encontramos que las señales de CD43 podrían inducir la fosforilación de ATF1 (38KDa), otro miembro de la familia de CREB (datos preliminares). El hecho de que MSK fosforile a ATF1 (Deak *et al.*, 1998) nos sugiere que CD43 probablemente regula la fosforilación de otros miembros de la familia de CREB.

2. Dado que las señales de CD43 inducen incrementos en la concentración de calcio intracelular (Mentzer *et al.*, 1987; Barat & Tremblay, 2002) y a que se ha reportado que, CREB puede ser fosforilado por CaMKIV en LT (Yu *et al.*, 2001), es posible que las señales de CD43 activen a CaMKIV y que esta última fosforile a CREB.

Por otra parte, se ha descrito la existencia de AC solubles cuya activación depende del incremento en la concentración de calcio (Litvin *et al.*, 2003), las cuales podrían estar involucradas en la fosforilación de CREB en respuesta a los incrementos de calcio inducidos por CD43.

3. AMPK (“AMP activated Protein Kinase”) es otra cinasa activada por calcio/calmodulina (CaMK) (Tamas *et al.*, 2006) en respuesta a las señales del TCR. La

inhibición de esta cinasa inhibe parcialmente la producción de IL-2 en LT estimulados a través del TCR y CD28 (Jhun *et al.*, 2006). Por otro lado, AMPK fosforila a CREB en células musculares en respuesta a un inductor de esta cinasa (AICAR, “5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside”) (Thomson *et al.*, 2007). Considerando que CD43 induce aumentos en la concentración de AMPc en LT (resultados no publicados), es posible entonces que las señales coestimuladoras de CD43 actúen de manera sinérgica con las del TCR para aumentar los niveles de activación de AMPK y en consecuencia, la fosforilación de CREB.



**Figura 11. Posibles vías alternas de fosforilación de CREB dependientes de CD43.** Las señales de CD43 inducen la fosforilación de CREB de manera dependiente de PKA, sin embargo, nuestros resultados muestran que esta no es la única vía responsable. Los incrementos en la concentración de calcio pudieran activar tanto a la AC soluble como a la CaMKIV, las cuales pudieran fosforilar a CREB. Por otra parte, la activación de p38 pudiera resultar en la fosforilación de CREB de manera dependiente de MSK puesto que esta cinasa es inhibida por H89 al igual que la PKA.

CD43 activa la vía de ERK estableciendo un circuito de retroalimentación positiva que induce la fosforilación de Lck en la serina 59, lo cual baja los umbrales de activación induciendo la producción de IL-2 y la entrada al ciclo celular (Stefanová *et al.* 2003, Fierro *et al.*, 2006). Sin embargo, no encontramos que ERK estuviera involucrada en la fosforilación de CREB a tiempos cortos. Por otra parte, la fosforilación de CREB en respuesta a las señales de CD43 es también parcialmente dependiente de p38 y nuestros resultados no nos permiten descartar que esta cinasa participe en la activación de CREB a tiempos más largos. En efecto, se ha reportado que la fosforilación CREB puede ocurrir en dos etapas, una rápida (1 min) y una lenta (1 h) a través de la vía de CaMKIV y de la vía de las MAPKs, respectivamente, en neuronas de hipocampo (Wu *et al.*, 2000). Es posible entonces, que CD43 regule también la fosforilación de CREB a tiempos cortos y largos en dos o más etapas dependientes cada una de diferentes vías o que actúan de manera sinérgica. En base a lo reportado anteriormente (Wu *et al.*, 2000; Barat & Tremblay, 2002) es posible que CD43 regule la fosforilación de CREB por la vía de PKA y CaMKIV a tiempos cortos y a tiempos largos a través de de p38 y/o ERK.

### ***6.3 Regulación de la unión de CREB y CREM al promotor de IL-2 por las señales coestimuladoras de CD43***

Como se mencionó anteriormente, la expresión de IL-2 es regulada positivamente por CREB en LT estimulados a través del TCR y CD28 (Tenbrock *et al.*, 2003). Encontramos que tanto en LT sin estimular, como en células que sólo reciben las señales del TCR, tanto CREB como CREM se mantienen unidos al promotor de IL-2, lo cual concuerda con resultados publicados anteriormente (Tenbrock *et al.*, 2002). Nuestros resultados indican también que, si bien la unión de CREB al promotor de IL-2 no parece depender de las señales coestimuladoras de CD43, éstas regulan negativamente la unión de CREM al promotor de IL-2 6 horas después del estímulo, lo cual concuerda con una reducción en los niveles proteicos de CREM en el núcleo. Se desconoce el mecanismo por el cual se regula la presencia de CREM en el núcleo en LT, sin embargo, se sabe que la proteína ACT (del inglés “Activator CREM in testis”) es exportada del núcleo al citosol mediante su unión con la kinesina KIF17b la cual a su vez se une con el transportador Crm1 (Macho *et al.*, 2002). A la fecha, no se han reportado isoformas de CREM activadoras de la transcripción en LT, pero es posible

que la regulación de la presencia de CREM en el núcleo se deba a su interacción con otra proteína, la cual promueve su translocación fuera del núcleo al interactuar con una kinesina y ésta a su vez con un transportador como Crm1.

Antecedentes de nuestro grupo sugieren que existe una ventana de tiempo en la que las señales de CD43 previenen el estado de anergia inducido cuando los LT perciben señales del TCR antes de las de CD43. Cuando los LT reciben las señales de CD43 hasta 30 minutos después de las del TCR, los LT recuperan su capacidad proliferativa. En cambio, cuando los LT reciben las señales coestimuladoras de CD43 2 horas después de las del TCR o únicamente las del TCR, no son capaces de producir IL-2 y por tanto, tampoco son capaces de proliferar (Fierro *et al.*, 2006). En función de esto, evaluamos el efecto de las señales de CD43 en la regulación de CREB y CREM durante esta ventana de tiempo. Nuestros resultados muestran que las señales de CD43 inhiben la unión de CREM al promotor de IL-2 aún cuando ocurren hasta 2 horas después de las señales del TCR. Esto concuerda con niveles proteicos menores de CREM en el núcleo comparado con los observados en células sin estimular. Más aún, las señales de CD43 inducen la fosforilación de CREB cuando son recibidas 30 minutos después de las señales del TCR, no así a tiempos más largos (2 horas). El hecho de que las señales de CD43 son incapaces de inducir la fosforilación de CREB cuando son percibidas por la célula 2 horas después del estímulo a través del TCR sugiere que las señales prolongadas del TCR, en ausencia de coestimulación, generan una inhibición irreversible en la activación de CREB que podría resultar de eventos tales como un aumento en la actividad o en la expresión de las fosfatasa que defosforilan a CREB como PP1 y PP2-A (Revisado en Mayr & Montminy, 2001) o bien la unión de la subunidad reguladora RII $\beta$  de PKA a CREB lo cual, inhibe su actividad transcripcional (Elliot *et al.*, 2003). Las señales de CD43 regularían de manera negativa estos mecanismos de inhibición siempre y cuando no se hayan establecido por completo las señales anérgicas del TCR.

Por otro lado, en LT estimulados a través del TCR y CD28, CREM se encuentra unido al promotor de IL-2 24 horas después de dicho estímulo, lo cual se ha interpretado como un mecanismo regulatorio de la amplitud de la respuesta celular (Tenbrock *et al.*, 2003). De manera semejante, nuestros resultados indican que las señales coestimuladoras de CD43 no afectan la unión de CREM al promotor de IL-2 24 horas del estímulo. Es

posible entonces, que CD43 regula positivamente la transcripción de IL-2 al inducir la fosforilación de CREB y que, al no tener efecto en la unión de CREM al promotor de IL-2 24 horas después del estímulo, se evita la producción exacerbada de esta citocina. Los mecanismos por los cuales se regula negativamente la producción de IL-2 involucran regulación epigenética. Se ha reportado que la demetilación del sitio ARRE2 (del inglés “Antigen Receptor Responsive Element”) del promotor de IL-2 es crucial para el reclutamiento de Oct-1 y NFAT en LT CD4<sup>+</sup> (Murayama *et al.*, 2006). CREM, por su parte, regula negativamente la transcripción de IL-2 debido al reclutamiento de la Histona Deacetilasa 1 (HDAC1; del inglés “Histone Deacetylase 1”) mediante la interacción con su dominio H (Tenbrock *et al.*, 2006). De modo que la metilación del promotor de IL-2 pudiera impedir la unión de CREB fosforilado una vez que se han establecido las señales anérgicas.

#### ***6.4 Las señales coestimuladoras de CD43 mantienen la fosforilación de CREB 24 horas después del estímulo: Posibles implicaciones***

Si bien CREM se encuentra unido al promotor de IL-2 24 horas después del estímulo, de manera interesante, encontramos que CREB se mantiene fosforilado en el núcleo hasta 24 horas en respuesta a las señales coestimuladoras de CD43. Aunque nosotros no encontramos que la fosforilación de CREB correlaciona con la unión de CREB fosforilado en el promotor de IL-2, lo anterior sugiere que las señales de CD43 podrían regular positivamente a otros genes cuya transcripción depende de CREB y que participan en la diferenciación de LT. Resultados *in silico* obtenidos en el laboratorio (Tesis de Doctorado de Monserrat Sandoval) muestran que las señales conjuntas del TCR y CD43 pueden inducir la unión a CREB en varios promotores de citocinas expresadas en LT como IL-2, IL-6, IL-12 y la quimiocina MCP-2 (Anexo 1). Ensayos de dot-blot muestran que las señales coestimuladoras de CD43 inducen la expresión de las citocinas IL-2, IL-3, IL-4, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , RANTES, MCP-1 y MIP las cuales no son producidas cuando los LT reciben únicamente las señales del TCR (Fierro *et al.*, 2006). Esto correlaciona con que CREB regula positivamente varias citocinas: IL-2 (Tenbrock *et al.*, 2003), IL-4 (Tokoyoda *et al.*, 2004), IL-6 (Etienne *et al.*, 1999) e IFN- $\gamma$  (Samten *et al.*, 2008) (Anexo I). Por otra parte, está reportado que CREB también regula positivamente la expresión del receptor de alta afinidad de IL-2 (CD25) (Hughes-Fulford *et al.*, 2005) y a la Ciclina D (White *et al.*, 2006), la cual regula la transición de

G1/S durante el ciclo celular, por lo que las señales coestimuladoras de CD43 pudieran participar en la expresión de estas proteínas.

En conjunto nuestros resultados muestran que las señales de CD43 inducen la fosforilación de CREB desde tiempos cortos (10 minutos) de manera dependiente de PKA, que inducen la fosforilación de CREB 6 horas después del estímulo e inhiben la unión de CREM al promotor de IL-2 y que, a las 24 horas, reestablecen la unión de CREM al promotor de IL-2 pero mantienen la fosforilación de CREB. Por lo tanto, CD43 es una molécula coestimuladora importante en la respuesta inmune que contribuye y modula diferentes etapas de la diferenciación celular y muy probablemente, etapas efectoras de los LT.



## 7. CONCLUSIONES

- Las señales coestimuladoras de CD43 inducen la fosforilación de CREB rápidamente de manera dependiente de AMPc y PKA.
- La vía canónica de Akt no está involucrada en la fosforilación de CREB en respuesta a las señales de CD43.
- Las señales de CD43 inhiben la unión de CREM al promotor de IL-2 e inducen la fosforilación de CREB en el núcleo 6 horas después del estímulo.
- Las señales de CD43 no inhiben la unión de CREM al promotor de IL-2 24 horas después del estímulo, sin embargo, mantienen los niveles de fosforilación de CREB.

## 8. PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos de inmunoblot con extractos de células incubadas con un inhibidor de PKC  $\zeta$  para determinar si esta cinasa está involucrada en la activación de la AC en respuesta a las señales coestimuladoras de CD43.
- Realizar ensayos de coimmunoprecipitación y ensayos de cinasa *in vitro* para determinar si la activación de CD43 induce la fosforilación de la AC de manera dependiente de PKC  $\zeta$ .
- Transfectar células Jurkat con RNAi específico para diferentes isoformas de AC y PKA para determinar cuales son las isoformas activadas por CD43.
- Realizar ensayos de inmunoblot con extractos de células incubadas con inhibidores de la vía de CamKIV y AMPK para determinar si estas vías están involucradas en la fosforilación de CREB en las etapas tempranas de la activación dependiente de las señales coestimuladoras de CD43.
- Realizar ensayos de inmunoblot con extractos de células incubadas con diferentes inhibidores para determinar las cascadas de señalización involucradas en la fosforilación de CREB dependiente de CD43 6 y 24 horas post-estímulo.
- Transfectar células Jurkat con una proteína dominante negativa del transportador Crm1 para determinar si está involucrado en la exportación de CREM hacia fuera del núcleo a las 6 horas de estímulo a través del TCR y CD43.
- Realizar ensayos de Inmuprecipitación de Cromatina (ChIP) para confirmar la regulación de CREM y la activación de CREB dependiente de las señales de CD43 en el promotor de IL-2 *in vivo*.

## 9. ANEXO I.

Citocinas inducidas por el coestímulo de CD43		
Citocina	Función	Es regulado por CREB? <sup>£</sup>
IL-2 <sup>*, §</sup>	Proliferación de LT	Tenbrock <i>et al.</i> , 2003
IL-3 <sup>*</sup>	Proliferación de monocitos y células dendríticas	--
IL-4 <sup>*</sup>	Diferenciación T2	Tokoyoda <i>et al.</i> , 2004 Stempel & Vercelli, 2007
IL-6 <sup>§</sup>	Proliferación de LB	Etienne <i>et al.</i> , 1999
IL-12 <sup>§</sup>	Diferenciación T1	--
IL-13 <sup>*</sup>	Diferenciación T2	Stempel & Vercelli, 2007
IFN- $\gamma$ <sup>*</sup>	Diferenciación T1	Samten <i>et al.</i> , 2008
TNF- $\beta$ <sup>*</sup>	Efecto citolítico	--
RANTES <sup>*</sup>	Quimiocina	Casola <i>et al.</i> , 2002
MCP-1 <sup>*</sup>	Quimiocina	--
MCP-2 <sup>§</sup>	Quimiocina	--
MIP <sup>*</sup>	Quimiocina	Barabitskaja <i>et al.</i> , 2006

**Anexo I. Las señales coestimuladoras de CD43 inducen la producción de varias citocinas.** Resultados *in vitro* (\*) (Fierro *et al.*, 2006) muestran que las señales coestimuladoras de CD43 inducen la producción de varias citocinas involucradas en la proliferación y diferenciación de las células del sistema inmune así como quimiocinas. Resultados publicados (£) e *in silico* (§) muestran que la transcripción de estas citocinas está regulada por CREB.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A. K., Litchman A. H., Cellular and Molecular Immunology, Saunders, Quinta edición, 2003.
- Abrahamsen H., Baillie G., Ngai J., Vang T., Nika K., Ruppelt A., Mustelin T., Zaccolo M., Houslay M. & Taskén K., TCR and CD28-mediated recruitment of phosphodiesterase 4 to lipid rafts potentiates TCR signaling, *The Journal of Immunology*, 2004, 173: 4847-4858.
- Aguilar-Delfin I., Fierro N. A., Rosenstein Y., CD43. UCSD-Nature Molecule Pages (2006). (doi:10.1038/mp.a000565.01 ).
- Arstila T. P., Casrouge A., Baron V., Even J., Kanellopoulos J. & Kourilsky P., A direct estimate of the human ab T Cell Receptor diversity, *Science*, 1999, 286: 958-961.
- Asahara, H., B. Santoso, E. Guzman, K. Du, P. A. Cole, I. Davidson & M. Montminy., Chromatin-dependent cooperativity between constitutive and inducible activation domains in CREB., 2001 *Mol. Cell Biol.* 21:7892.
- Bagriacik U. E., Tang M., Wang H.C. & Klein J. R., CD43 potentiates CD3-induced proliferation of murine intestinal intraepithelial lymphocytes, *Immunology and Cell Biology*, 2001, 79: 303-307.
- Barabitskaja O., Foulke J. S., Shibani P, Bodor J., & Reitz M. S., Suppression of MIP-1<sub>2</sub> transcription in human T cells is regulated by inducible cAMP early repressor (ICER), *J. Leukoc. Biol.* 2006, 79: 378-387.
- Barat C. & Tremblayo M. J., Engagement of CD43 enhances Human Immunodeficiency Virus Type 1 transcriptional activity and virus production that is induced upon TCR/CD3 stimulation, *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (32): 28714 -28724.
- Barton K., Muthusamy N., Chanyagam M., Fischer C., Clendenin C. & Leiden J. M. Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mouse expressing a dominant-negative form of CREB, *Nature*, 1996, 379: 81-95.
- Bettelli E, Oukka M & Kuchroo VK., TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity, *Nat Immunol.* 2007, 8(4):345-50.
- Blair P. J., Riley J. L., Levine B. L., Lee K. P., Craighead N., Francomano T., Perfetto S. J., Gray G. S., Carreno B. M. & June C. H., Cutting Edge: CTLA-4 Ligation Delivers a Unique Signal to Resting Human CD4 T Cells That Inhibits Interleukin-2 Secretion but Allows Bcl-XL Induction, *The Journal of Immunology*, 1998, 160: 12-15.
- Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248-54.
- Brunner M.C., Chambers C.A., Chan F.K., Hanke J., Winoto A. & Allison J.P., CTLA-4- Mediated Inhibition of Early Events of T Cell Proliferation, *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 5813-5820.
- Buratowski S. & Chodosh L. A., Mobility Shift DNA-Binding Assay using gel electrophoresis, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1996, 12.2.1-12.2.11
- Butscher W. G., Haggerty C. M., Chaudhry S. & Gardner K., Targeting of p300 to the Interleukin 2 promoter via CREB-Rel Cross-talk during mitogen and oncogenic molecular signalling in activated T-cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (29): 27647-27656.
- Caravatta L., Sancilio S., di Giacomo V., Rana R., Cataldi A. & Di Pietro R., PI3-K/Akt-dependent activation of cAMP-response element-binding (CREB) protein in Jurkat T leukemia cells treated with TRAIL, *J Cell Physiol.*, 2008, 214(1): 192-200.
- Casola A., Henderson A., Liu T., Garofalo R. P. & Brasier A. R., Regulation of RANTES promoter activation in alveolar epithelial cells after cytokine stimulation, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2002, 283: 1280-1290.

- Chambers C. A., The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited, *TRENDS in Immunology* 2001, 22 (4): 217-223.
- Chan A. C. & Shaw A. S., Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases, *Current Opinion in Immunology* 1995, 8: 394-401.
- Choi S. & Schwartz R. H., Molecular Mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models, *Semin. Immunol.*, 2007, 19 (3): 140-152.
- Cruz-Muñoz ME, Salas-Vidal E, Salaiza-Suazo N, Becker I, Pedraza-Alva G & Rosenstein Y., The CD43 coreceptor molecule recruits the zeta-chain as part of its signaling pathway, *J Immunol.* 2003, 171(4):1901-8.
- Davies S. P., Reddy H., Caivano M. & Cohen P., Specificity and mechanisms of action of some commonly used protein kinase inhibitors, *Biochem J.*, 2000, 351: 95-105.
- De Cesare D., Fimia G. M. & Sassone-Corsi P., Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation, *TIBS*, 1999, 24: 281-285.
- Deak M., Clifton A. D., Lucocq J. M. & Alessi D. R., Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB, *The EMBO Journal*, 1998, 17 (15): 4426-4441.
- del Río R., Rincón M., Layseca-Espinosa E., Fierro N. A., Rosenstein Y. & Pedraza-Alva G., PKC $\theta$  is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 325: 133-143.
- Du Pasquier L., The immune system of invertebrates and vertebrates, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2001, 129: 1-15.
- Elliot M. R., Shanks R. A., Khan I. U., Brooks J. W., Burkett P. J., Nelson B. J., Kytтары V., Juang Y.T., Tsokos G. C. & Kammer G. M., Down-regulation of IL-2 production in T lymphocytes by phosphorylated Protein Kinase A-RII $\beta$ , *The Journal of Immunology*, 2004, 172: 7804-7812.
- Elliot M.R., Tolnay M., Tsokos G. C. & Kammer G. M., Protein Kinase A regulatory subunit type II $\beta$  directly interacts with and suppresses CREB transcriptional activity in activated T cells, *The Journal of Immunology*, 2003, 171: 3636-3644.
- Etienne S., Bourdoulous S., Strosberg A. D & Couraud P.O. , MHC Class II engagement in brain endothelial cells induces Protein Kinase A-dependent IL-6 secretion and phosphorylation of cAMP Response Element-Binding Protein, *The Journal of Immunology*, 1999, 163: 3636-3641.
- Fierro N.A., Pedraza-Alva G. & Rosenstein Y., TCR-dependent cell response is modulated by the timing of CD43 Engagement, *The Journal of Immunology*, 2006, 176: 7346-7353.
- Fimia G.M., Sassone-Corsi P., Cyclic AMP signalling, *Journal of Cell Science*, 2001, 114 (11): 1971-1972.
- Freitas A. A. & Rocha B., Population Biology of Lymphocytes: The flight for survival, *Annu. Rev. Immunol.*, 2000, 18: 83-111.
- Garrison F. C. & Lineberry N.B., Molecular mechanisms of CD4<sup>+</sup>T-cell anergy, *Nature Reviews*, 2007, 7: 599-609.
- Gatta L., Calviello G., Di Nicuolo F., Pace L., Ubaldi V., Doria G. & Pioli C., Cytotoxic T Lymphocyte-associated antigen-4 inhibits integrin-mediated stimulation, *Immunology*, 2002, 107: 209-216.
- Gibson HM, Hedgcock CJ, Aufiero BM, Wilson AJ, Hafner MS, Tsokos GC & Wong HK, Induction of the CTLA-4 gene in human lymphocytes is dependent on NFAT binding the proximal promoter, *J Immunol.* 2007, 179(6): 3831-40.
- Green J. M., The B7/CD28/CTLA-4 T-Cell Activation Pathway, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2000, 22: 261-264.
- Hanoune J. & Defer N., Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001, 41: 145-174.
- Hasler P., Moore J. & Kammer G. M., Human T lymphocyte cAMP-dependent protein kinase: subcellular distribution and activity ranges of type I and type II isozymes, *FASEB J.*, 1992, 6: 2735-

2741.

Hoffman R. A., Kung P. C., Hansen W. P., & Goldstein G., Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1980, 77: 4914-4917.

Hsueh YP, Liang HE, Ng SY & Lai MZ., CD28-costimulation activates cyclic AMP-responsive element-binding protein in T lymphocytes, *J Immunol.* 1997, 158(1): 85-93.

Hughes-Fulford M., Sugano E., Schopper T., Li C. F., Boonyaratanakornkit J.B. & Cogoli A., Early immune response and regulation of IL-2 receptor subunits, *Cellular Signalling*, 2005, 17: 1111-1124.

Jhun B. S., Lee J. Y., Oh Y. T., Lee J. H., Choe W., Baik H. H., Kim S. S., Yoon K. S., Ha J. & Kang I., Inhibition of AMP-activated protein kinase suppresses IL-2 expression through down-regulation of NFAT and AP-1 activation in Jurkat T cells, *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2006, 351: 986-992.

Jones AT, Federspiel B, Ellies LG, Williams MJ, Burgener R, Duronio V, Smith CA, Takei F & Ziltener HJ., Characterization of the activation-associated isoform of CD43 on murine T lymphocytes, *J Immunol.*, 1994, 153(8): 3426-39.

Julius M., Simpson E. & Herzenberg L. A., A rapid method for the isolation of functional thymus-derived lymphocytes. 1973. *Eur. J. Immunol.* 3: 645.

Kaiser M., Wiggin G. R., Lightfoot K., Arthur J. S. & Macdonald A., MSK regulate TCR-induced CREB phosphorylation but not immediate early gene transcription, *Eur. J. Immunol.*, 2007, 37: 2583-2595.

Kametani Y., Wang L., Koduka K., Sato T., Katano I. & Habu S., Rapid histone deacetylation and transient HDAC association in the IL-2 promoter region of TSS1-1-stimulated T cells, *Immunology Letters*, 2008, 119: 97-102.

Kammer G. M., High prevalence of T cell type I protein kinase A deficiency in Systemic Lupus Erythematosus, *Arthritis & Rheumatism*, 1999, 42: 1458-1465.

Kawabe J, Iwami G, Ebina T, Ohno S, Katada T, Ueda Y, Homcy CJ & Ishikawa Y., Differential activation of adenylyl cyclase by protein kinase C isoenzymes, *J Biol Chem.* 1994, 269(24): 16554-8.

Kim H.P. & Leonard W. J., CREB-ATF- dependent T cell receptor induced FOXP3 gene expression: a role for DNA methylation, *The Journal of Experimental Medicine* 2007, 204(7): 1543-1551.

Kim H. P., Imber J. & Leonard W. J., Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system, *Cytokines & Growth Factor Reviews*, 2006, 17: 349-366.

Kirschner L. S., Yin Z., Jones G. N. & Mahoney E., Mouse models of altered protein kinase A, *Endocrine-Related Cancer*, 2009, 16: 773-793.

Krummel J. M. & Allison J. P., *J. Exp. Med.* CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells, 1996, 183: 2533-2540.

Kuijl C., Savage N. D., Marsman M., Tuin A. W., Janssen L., Egan D. A., Ketema M., van den Nieuwendijk R., van den Eeden S. J., Geluk A., Poot A., van der Marel G., Beijersbergen R. L., Overkleeft H., Ottenhoff T. H. & Neefjes J., Intracellular bacterial growth is controlled by a kinase network around PKB/AKT1, *Nature*, 2007, 450: 725-732.

Kyoizumi S, Ohara T, Kusunoki Y, Hayashi T, Koyama K & Tsuyama N, 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.* 2004, 172(12): 7246-53.

Kyttaris V. C., Wang Y., Juang Y. T., Weinstein A. & Tsokos G. C., Increased levels of NFATc2 differentially regulate CD154 and IL-2 genes in T cell from patients with Systemic Lupus Erythematosus, *The Journal of Immunology*, 2007, 178: 1960-1966.

Latour S. & Veillette A., Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling, *Current Opinion in Immunology*, 2001, 13: 299-306.

Laxminarayana D. & Kammer G. M., Activation of type I protein kinase A during receptor-mediated human T lymphocyte Activation, *The Journal of Immunology*, 1996, 156: 497-506.

Layseca-Espinosa E. Pedraza-Alva G., Montiel J. L., del Río R., Fierro N. A., González-Amaro R. &

Rosenstein Y., T cell aggregation induced through CD43: intracellular signals and inhibition by the immunomodulatory drug leflunomide, *Journal of Leukocyte Biology*, 2003, 74: 1-11.

Li Q. & Verma I. M., NF $\kappa$ B Regulation in the immune system, *Nature Reviews*, 2002, 2: 725-734.

Lin J. X. & Leonard W. J., Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 1997, 8 (4): 313-332.

Litvin, T.N., Kamenetsky, M., Zarifyan, A., Buck, J. & Levin, L.R., *J. Biol. Chem.*, Kinetic properties of soluble adenylyl cyclase. Sinergism between calcium and bicarbonate, 2003, 278:15922–15926.

Macho B., Brancorsini S., Fimia G. M., Setou M., Hirokawa N. & Sassone-Corsi P., CREM-dependent transcription in male germ cells controlled by a kinesin, *Science*, 2002, 298: 2388-2390.

Macian F., NFAT proteins: Key regulators of T Cell development and function, *Nature Reviews*, 2005, 5: 472-484.

Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marmé D & Schächtele C., Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976, *J Biol Chem.*, 268(13): 9194-7.

Mattioli I, Dittrich-Breiholz O, Livingstone M, Kracht M & Schmitz ML., Comparative analysis of T-cell costimulation and CD43 activation reveals novel signaling pathways and target genes, *Blood.*, 2004, 10: 3302-4.

Mayr B & Montminy M., Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2001, 8: 599-609.

Medzhitov R., Recognition of microorganisms and activation of the immune response, *Nature* 2007, 449: 819-826.

Mentzer SJ, Remold-O'Donnell E, Crimmins MA, Bierer BE, Rosen FS & Burakoff SJ, Sialoporphin, a surface sialoglycoprotein defective in the Wiskott-Aldrich syndrome, is involved in human T lymphocyte proliferation, *J Exp Med.*, 1987,165(5): 1383-92.

Mishra N., Khan I. U., Tsokos G. C. & Kammer G. M., Association of deficient type II protein kinase A activity with aberrant nuclear translocation of the RII $\beta$  subunit in systemic lupus erythematosus T lymphocytes, *The Journal of Immunology*, 2000, 165: 2830-2840.

Murayama A., Sakura K., Nakama M., Yasukawa-Tanaka K., Fujita E., Tateishi Y., Wang Y., Ushijima T., Baba T., Shibuya K., Shibuya A., Kawabe Y. & Yanagisawa J., A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory, *The EMBO Journal* 2006, 25 (5): 1081-1092.

Mustelin T., Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases, *Biochem. J.*, 2003, 317: 15-27.

Mustelin T & Taskén K., Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases, *Biochem J.* 2003, 371: 15-27.

Muthusamy N. & Leiden J. M., A Protein Kinase C-, Ras-, and RSK2- dependent signal transduction pathways activates the cAMP-responsive element binding protein transcription factor following T Cell Receptor engagement, *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273 (35): 22841-22847.

Ostberg J. R., The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43, *Immunology Today*, 1998, 19 (12): 546-550.

Pandiyan P, Hegel JK, Krueger M, Quandt D & Brunner-Weinzierl MC., High IFN-gamma production of individual CD8 T lymphocytes is controlled by CD152 (CTLA-4), *J Immunol.*, 2007, 178(4):2132-4.

Park J. K., Rosenstein Y., Remold-O'Donnell E., Bierer B. E., Rosen F. S. & Burakoff S. J., Enhancement of T cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott-Aldrich syndrome, *Nature*, 1991, 350: 706-709.

Pedraza-Alva G., Mérida L. B., Burakoff S. J & Rosenstein Y., CD43-specific Activation of T Cells Induces Association of CD43 to Fyn Kinase *The Journal of Biological Chemistry* 1996, 271 (44): 27564-27568.

- Pedraza-Alva G., Mérida L. B., Burakoff S. J. & Rosenstein Y., T Cell Activation through the CD43 Molecule Leads to Vav Tyrosine Phosphorylation and Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Activation, *The Journal of Biological Chemistry* 1998, 273(23): 14218-14224.
- Powell J.D., Lerner C.G., Ewolt G.R. & Schwartz R., The -180 Site of the IL-2 Promoter Is the Target of CREB/CREM Binding in T Cell Anergy, *The Journal of Immunology*, 1999, 163: 6631-6639.
- Remold-O'Donell E., Davis A.E., Kenney D., Bhaskar K.R. & Rosen F. S., Purification and chemical composition of gpL115, the human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome, *J. Biol. Chem.*, 1986, 261: 7526-7530.
- Rothenberg E. V. & Ward S. B., A dynamic assembly of diverse transcription factors integrates activation and cell-type information for interleukin 2 gene regulation, *Proc. Natl. Acad.*, 1996, 93: 9358-9365.
- Saibil S. D., Deenick E. K. & Ohashi P. S., The sound of silence: modulating anergy in T lymphocytes, *Current Opinion in Immunology*, 2007, 19: 658-664.
- Samten B., Townsend J. C., Weis S. E., Bhoumik A., Klucar P., Shams H. & Barnes P. F., CREB, ATF, and AP-1 Transcription Factors Regulate IFN- $\gamma$  Secretion by Human T Cells in Response to Mycobacterial Antigen, *The Journal of Immunology*, 2008, 181: 2056–2064.
- Santana M. A. & Esquivel-Guadarrama F., Cell biology of T cell activation and differentiation, *Int Rev Cytol.*, 2006, 250: 217-74.
- Santana M. A., Pedraza-Alva G., Olivares-Zabaleta N., Madrid-Marina V., Burakoff S. J. & Rosenstein Y., CD43-mediated Signals Induce DNA Binding Activity of AP-1, NF-AT and NF $\kappa$ B Transcription Factors in Human T Lymphocytes, *J. Biol.Chem*, 2000, 273: 14218.
- Santana M. A. & Rosenstein Y., What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved and the mechanisms, *Journal of Cellular Physiology*, 2003, 195:392–401.
- Schmid K, Hediger MA, Brossmer R, Collins JH, Haupt H, Marti T, Offner GD, Schaller J, Takagaki K & Walsh MT, Amino acid sequence of human plasma galactoglycoprotein: identity with the extracellular region of CD43 (sialophorin) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992, 89(2):663-7.
- Schwartz R., T Cell Clonal Anergy, *Current Opinion in Immunology*, 1997, 9: 351-357.
- Sefton B. M. & Taddie J. A., Role of tyrosine kinases in lymphocyte activation, *Current Opinion in Immunology*, 1994, 6: 372-379.
- Smith-Garvin J.E., Koretzky G. A. & Jordan M. S., T Cell Activation, *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, 27: 591–619.
- Solomou E. E., Juang Y. T., Gourley M. F., Kammer G. M. & Tsokos G. C., Molecular Basis of Deficient IL-2 Production in T Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus, *The Journal of Immunology*, 2001, 166:4216-4222.
- Sperling A. I., Green J. M., Mosley R. L., Smith P. L, DiPaolo R. J., Klein J. R., Bluestone J. A., & Thompson C. B., CD43 Is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28, *J. Exp. Med*, 1995, 182: 139-146.
- Stefanová I, Hemmer B, Vergelli M, Martin R, Biddison WE, Germain RN, TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways, *Nat Immunol.*, 2003, 4(3):248-54.
- Stempel J. M. & Vercelli D., Functional dissection identifies a Conserved Noncoding Sequence-1 core that mediates *IL13* and *IL4* transcriptional enhancement, *The Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (6): 3738–3746.
- Sundstedt A., Sigvardsson M., Leanderson T., Hedlund G., Kalland T. & Dohlsten M., *In vivo* anergized CD4<sup>+</sup> T cells express perturbed AP-1 and NF $\kappa$ B transcription factors, *Proc. Natl. Acad.*, 1996, 93: 979-984.
- Tamás P., Hawley S. A., Clarke R. G., Mustard K. J., Green K., Hardie G. & Cantrell D. A., Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase by antigen receptor and Ca<sup>2+</sup> in T lymphocytes, *The Journal of Experimental Medicine*, 2006, 203( 7): 1665-1670.



- Tenbrock K., Juang Y. T., Gourley M. F., Nambiar M. P. & Tsokos G. C., Antisense Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate Response Element Modulator up-regulates IL-2 in T cells from patients with systemic lupus erythematosus, *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 4147-4152.
- Tenbrock K., Juang Y. T., Leukert N., Roth J. & Tsokos G. C. The transcriptional Repressor cAMP Response Element Modulator alpha Interacts with Histone Deacetylase 1 to Repress Promoter Activity, *The Journal of Immunology*, 2006, 177: 6159-6164.
- Tenbrock K., Juang Y. T., Tolnay M. & Tsokos G. C., The Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate Response Element Modulator suppresses IL-2 production in stimulated T cells by a chromatin-dependent mechanism, *The Journal of Immunology*, 2003, 170: 2971-2976.
- Thomson D. M., Herway S. T., Fillmore N., Kim H., Brown J. D., Barrow J. R. & Winder W. W., AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family, *J. Appl. Physiol*, 2008, 104: 429-438.
- Tivol E. A., Borriello F., Schweitzer A. N., Lynch W. P., Bluestone J. A. & Sharpe A. H., Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal Multiorgan Tissue Destruction, Revealing a Critical Negative Regulatory Role of CTLA-4, *Immunity*, 1995, 3: 541-547.
- Tokoyoda K., Tsujikawa K., Matsushita H., Ono Y., Hayashi T., Harada Y., Abe R., Kubo M. & Yamamoto H., Up-regulation of IL-4 production by the activated cAMP/cAMP dependent protein kinase (protein kinase A) pathway in CD3/CD28 stimulated naive T cells, *International Immunology*, 2004, 16(5): 643-653.
- Veillette A. & Davidson D., Src-related protein tyrosine kinases and T-cell receptor signalling, *TIG*, 1992, 8(2): 61-66.
- Vendetti S., Riccomi A., Sacchi A., Gatta L., Pioli C. & De Magistris M.T., Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate and Calcium Induce CD152 (CTLA-4) Up-Regulation in Resting CD4+ T Lymphocytes, *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 6231-6235.
- Walunas T. L., Sperling A. I., Roli K., Thompson C. B. & Bluestone J. A., CD28 expression is not essential for positive and negative selection of thymocytes or peripheral T cell tolerance, *The Journal of Immunology*, 1996, 156: 1006-1013.
- White P.C., Shore A.M., Clement M., McLaren J., Soeiro I., Lam EW-F., & Brennan P., Regulation of cyclin D2 and the cyclin D2 promoter by protein kinase A and CREB in lymphocytes, *Oncogene*, 2006, 25: 2170-2180.
- Wu G. Y., Deisseroth K. & Tsien R. W., Activity-dependent CREB phosphorylation: Convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway, *PNAS*, 2001, 98 (5): 2808-2813.
- Yoshimura M & Cooper DM., Type-specific stimulation of adenylylcyclase by protein kinase C, *J Biol Chem*. 1993, 7: 4604-7.
- Yu C. T., Shih H. M. & Lai M. Z., Multiple signals required for cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) binding protein interaction induced by CD3/CD28 costimulation, *The Journal of Immunology*, 2001, 166: 284-292.
- Zheng Y., Zha Y. & Gajewsky T. F., Molecular Regulation of T cell anergy, *EMBO Reports*, 2008, 9 (1): 50-55.
- Zhou W., Vergara L., & König R., T cell receptor induced intracellular redistribution of type I protein kinase A, *Immunology*, 2004, 113: 453-459.