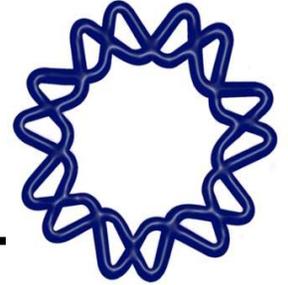




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR
Y BIOPROCESOS

PARTICIPACIÓN DE LA MOLÉCULA CD43 EN ANERGIA

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:
Ing. Gerardo Ruiz Amores

DIRECTOR DE TESIS:
Dra. Yvonne Rosenstein

CUERNAVACA, MORELOS 2012



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
Dra. Yvonne Jane Rosentein Azoulay

COMITÉ TUTORAL
Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay
Dra. Carmen Beltrán
Dra. Rosario Vera Estrella

JURADO DE EXAMEN

Dr. Baltazar Becerril
(Presidente)

Dra. Denhi Schnabel Peraza
(Secretario)

Dra. Angélica Santana Calderón.
(Vocal)

Dr. Ignacio López González
(Vocal)

Dr. Miguel Ángel Vargas Suárez
(Vocal)

<u>Índice</u>	<u>Pag.</u>
Glosario _____	3
Resumen _____	4
1. Introducción _____	5
1.1 <i>Respuesta Inmune Innata</i> _____	5
1.2 <i>Respuesta Inmune Adaptativa</i> _____	6
1.3 <i>Moléculas co-estimuladoras</i> _____	6
1.4 <i>Las señales del TCR y de las moléculas co-estimuladoras se complementan</i> _____	7
1.5 <i>Anergia</i> _____	9
1.5.1 <i>Anergia clonal</i> _____	10
1.5.2 <i>Tolerancia adaptativa.</i> _____	12
1.6 <i>La molécula co-receptora CD43</i> _____	12
1.7 <i>Funciones de CD43</i> _____	13
1.7.1 <i>Cascada de señalización de CD43</i> _____	14
1.8 <i>IL-2</i> _____	15
1.9 <i>Factores de transcripción involucrados en la regulación del gen de IL-2</i> _____	17
1.9.1 <i>NFAT</i> _____	17
1.9.2 <i>AP-1</i> _____	18
1.9.3 <i>NFκB</i> _____	19
1.9.4 <i>CREB</i> _____	20
1.10 <i>Las señales de CD43 regulan la respuesta funcional del linfocito T</i> _____	23
2. Hipótesis _____	25
3. Objetivo _____	25
3.1 <i>Objetivo general</i> _____	25
3.2 <i>Objetivos Particulares</i> _____	25
4. Metodología _____	26
4.1 <i>Anticuerpos</i> _____	26

4.2	<i>Aislamiento y purificación de linfocitos T de sangre periférica.</i>	26
4.3	<i>Líneas celulares</i>	27
4.4	<i>Inducción de anergia.</i>	27
4.5	<i>Estimulación celular</i>	28
4.6	<i>Obtención de extractos totales</i>	28
4.7	<i>Obtención de extractos nucleares.</i>	28
4.8	<i>Inmunoblot.</i>	29
4.9	<i>Análisis de proteínas fosforiladas en una sola célula por citómetro de flujo (Phosflow)</i>	30
5.	Resultados	31
5.1	<i>Determinar si las señales de CD43 inducen la fosforilación de CREB</i>	31
5.1.1	<i>Las señales de CD43 favorecen la fosforilación de CREB</i>	31
5.1.2	<i>CD43 incrementa la fosforilación de CREB en concentraciones sub-óptimas de OKT3</i>	33
5.1.3	<i>El solo estímulo de CD43 fosforila a CREB en la serina 133 y 129</i>	35
5.2	<i>Establecer un modelo de anergia en células Jurkat</i>	37
5.3	<i>Determinar si las señales de CD43 previenen o rescatan un estado de anergia</i>	39
6.	Discusión y Conclusión	42
6.1	<i>CD43 induce la fosforilación de CREB en S-133 y S-129</i>	42
6.2	<i>CD43 incrementa la fosforilación de CREB en concentraciones sub-óptimas de TCR</i>	44
6.3	<i>CD43 previene la entrada a un menor estado de respuesta funcional</i>	45
7.	Perspectivas	49
8.	Bibliografía	50

Glosario

LT	Linfocito T
LB	Linfocito B
TCR	Receptor de Células T
BCR	Receptor de Células B
Ag	Antígeno
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
APC	Célula Presentadora de Antígeno
IL-2	Interleucina 2
LAT	Enlazador de Células T Activadas
ZAP-70	Proteína Cinasa 70 Asociada a la Cadena Zeta
DGK	Diacilglicerol Cinasa
DAG	Diacilglicerol
Ras	Proteína Activadora de GTPasas
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos
ERK	Cinasa Regulada por Señales Extracelulares
AP-1	Proteína de Activación 1
NFkB	Proteína de unión al enhancer (mejorador de la transcripción) de inmunoglobulinas kappa
NFAT	Factor Nuclear de células T Activadas
PKC	Proteína Cinasa C
CREB	Proteína de Unión en Respuesta a AMP cíclico
Cbl-b	Línea de Linfoma Casitas B.
Itch	Proteína E3 Ubiquitin Ligasa homóloga a Itchy
GRAIL	Gene Relacionado a Anergia en Linfocitos
TRAF	Factor Asociado a TNFR
PLC	Fosfolipasa C
PKA	Proteína Cinasa A
Erg-2	Genes Relacionados a ether-á-go-go
CREM	Elemento Modulador en Respuesta a AMP cíclico
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato.
aa	Aminoácidos
ERM	Proteínas Relacionadas a Esrina, Radixina y Moesina
AMPc	Adenosin Monofosfato Cíclico
CAMK	Proteína Cinasa Dependiente de Calmodulina/Ca ⁺
PI3K	Cinasa de 3-Fosfatidil-inositol
HDAC	Desacetilasas de Histonas
PMA	Acetato de Forbol Miristato

Resumen

La activación de linfocitos T requiere del reconocimiento de antígenos presentados en la célula presentadora de antígenos por el MHC a través del receptor de células T y de señales conjuntas de moléculas co-estimuladoras. Este reconocimiento puede llevar a una activación de las funciones efectoras de las células T o entrar a un estado de menor respuesta funcional, dependiendo de la intensidad, cantidad y duración en que sea recibida la señal. La anergia es un mecanismo de tolerancia periférica que resulta en un estado de menor respuesta funcional de los linfocitos T auto-reactivos para limitar la auto-inmunidad. Por sus características estructurales, se piensa que a través de CD43, los linfocitos T establecen sus primeros contactos celulares con otras células, lo que a su vez condiciona sus respuestas efectoras. Se ha demostrado que las señales de CD43 sinergizan con las del TCR mejorando la proliferación y producción de IL-2, de esta manera, si las señales de CD43 anteceden a las señales anergizantes del TCR es posible prevenir un estado de anergia. Activación a través de CD43 induce un incremento en la fosforilación de ERK y en la activación de los factores de transcripción NFAT, AP-1 y NFkB. Por otro lado, en respuesta a TCR y CD28 se ha encontrado que CREB es un factor de transcripción indispensable para la transcripción del gen de IL-2. En base a esto proponemos que las señales de CD43 regulan la activación de CREB y ERK en células T para la prevención de anergia.

En este trabajo, encontramos que las señales de CD43 inducen la fosforilación de CREB en la serina 133 y 129 y que junto con las del TCR sinergizan la fosforilación de CREB en ambas serinas. Por otra parte encontramos que si las señales de CD43 se reciben durante la inducción de anergia en un modelo dependiente de ionomicina, la célula T es capaz de recuperar los niveles de fosforilación de ERK, los cuales se abaten en células anérgicas.

En conclusión, las señales de CD43 inducen la activación de CREB y pueden prevenir el estado de anergia al sostener la activación de la cinasa ERK. En conjunto, CD43 podría dirigir la expresión de un programa genético que incrementa la activación y proliferación del linfocito T.

1. Introducción

Nuestro medio ambiente tiene una amplia gama de microbios y sustancias que retan al hospedero a través de diversos mecanismos patogénicos. El sistema inmune se vale de complejos mecanismos para controlar y eliminar estos organismos y toxinas mediante el reconocimiento entre lo propio y lo no propio evitando de esta manera daños a sus propios tejidos. Estos mecanismos se dividen en dos grandes categorías, 1) respuestas que son codificadas por genes de la línea germinal del hospedero y que reconocen patrones moleculares compartidos por muchos microbios y toxinas que no están presentes en el hospedero y 2) respuestas que son codificadas por genes que se reorganizan somáticamente para ensamblar moléculas de unión al antígeno con alta especificidad. Estas dos grandes categorías se conocen como “respuesta inmune innata” y “respuesta inmune adaptativa” respectivamente (revisado en Chaplin, 2010).

1.1 Respuesta Inmune Innata

La respuesta inmune innata incluye todos aquellos mecanismos de defensa tales como barreras físicas (células epiteliales, mucosas, cilios epiteliales), proteínas solubles y pequeñas moléculas bioactivas que están presentes constitutivamente en los fluidos biológicos (proteínas del complemento, péptidos antimicrobianos), o aquellas liberadas por las células activadas (citocinas y quimiocinas que regulan la función de otras células atrayéndolas a los sitios de inflamación, mediadores lipídicos de la inflamación, radicales libres, aminas bioactivas y enzimas que también contribuyen a la inflamación del tejido), y por último receptores unidos a membrana y proteínas citoplasmáticas que se unen a patrones moleculares expresados sobre la superficie de microbios invasores.

Este sistema es muy eficiente, sin embargo, algunos patógenos logran evadirla, por lo que se dispone de otro tipo de respuesta, conocido como respuesta inmune adaptativa. A pesar de que la respuesta inmune innata y la adaptativa son fundamentalmente diferentes en cuanto a sus mecanismos de acción, existe un sinergismo entre ellas para una adecuada y completa respuesta inmune efectiva (revisado en Medzhitov, 2007; Chaplin, 2010).

1.2 Respuesta Inmune Adaptativa

La respuesta del sistema inmune adaptativa se basa principalmente en el reconocimiento específico de antígenos a través de receptores expresados sobre la superficie de los linfocitos T (LT) y B (LB) (receptores TCR y BCR respectivamente). Esto brinda dos grandes ventajas, primero la capacidad de reconocer casi cualquier antígeno (alrededor de 25×10^6 diferentes epítopes,) y segundo, una vez que ocurre el reconocimiento del antígeno de una célula a través de su receptor para el antígeno, la activación y expansión clonal así como la capacidad de recordar proporcionan protección para futuras infecciones con el mismo patógeno (Chaplin, 2010; Palm & Medzhitov 2009).

En función de las células efectoras, la respuesta inmune adaptativa se divide en respuesta inmune humoral, donde los LB participan en la eliminación de patógenos mediante la producción de anticuerpos; y respuesta inmune celular, donde los LT, al reconocer fragmentos de péptidos (antígenos, “Ag”) derivados del patógeno unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), reconocen células infectadas, y promueven su eliminación mediante la producción de citocinas (LT cooperadores, que expresan la molécula CD4) y a través de contactos célula-célula (LT citotóxicos, que expresan CD8) (revisado en Freitas & Rocha, 2000; Janeway & Travers 1994; Medzhitov, 2007).

1.3 Moléculas co-estimuladoras

La interacción entre el complejo TCR/CD3 con el péptido antigénico presentado en la molécula del MHC proporciona solamente una señalización parcial para la activación celular, y se requieren de las señales proporcionadas por moléculas co-estimuladoras o accesorias como CD2, CD4, CD8, CD5, CD45, CD28 y CD43 entre otras para que los linfocitos T se activen completamente. La interacción entre MHC-peptido y TCR/CD3, en ausencia de señales de moléculas co-estimuladoras, lleva al LT a un estado de menor respuesta funcional conocido como anergia (Smith-Garvin, et al., 2009; Fierro, et al., 2006; Chaplin 2010).

La co-estimulación de células T con CD28 o CD43 amplifica las señales del TCR y refuerza el reclutamiento de los factores de transcripción como NFAT, AP-1, NFκB y CREB al promotor de interleucina-2 (IL-2) (Smith-Garvin, et al., 2009; Pedraza-Alva & Rosenstein, 2007), una citocina indispensable para la proliferación y diferenciación de los

linfocitos T (Lin & Leonard, 1997; Wells, 2009).

1.4 Las señales del TCR y de las moléculas co-estimuladoras se complementan.

Durante la interacción linfocito T-célula presentadora de antígeno (APC), las señales del receptor para el antígeno combinadas con las de las moléculas accesorias se suman y provocan una serie de señales intracelulares que inducen una reorganización dinámica de las moléculas de la superficie celular y sus señalosomas, formando lo que se conoce como sinapsis inmunológica, así como induciendo una activa reorganización del cito-esqueleto y cambios morfológicos. En suma estas señales resultan en la activación de factores de transcripción y en la regulación de la expresión génica que controlan la proliferación y diferenciación del linfocito T (revisado en Parry & Ward, 2005; Smith-Garvin, et al., 2009; Chaplin, 2010).

Las cadenas α y β del TCR, que tienen la capacidad de reconocer específicamente al Ag, se asocian con cadenas accesorias invariantes (las proteínas transmembranales CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ y CD3 ζ , las cuales se organizan en dímeros $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$, y $\zeta\zeta$ que se asocian con la región hidrofóbica transmembranal de las cadenas del TCR) y que sirven para traducir las señales las cuales forman el complejo CD3. Cada TCR se asocia con un heterodímero CD3 $\gamma\epsilon$, un heterodímero CD3 $\delta\epsilon$ y un homodímero CD3 ζ , formando el complejo TCR/CD3 (Fig. 1). Las porciones citoplasmáticas de cada cadena del complejo CD3 tienen motivos denominados “motivos de activación basados en tirosinas” (ITAMS); cuando estas tirosinas son fosforiladas por las cinasas de tirosinas Lck y Fyn, sirven de punto de anclaje para el dominio SH2 de ZAP-70 lo que permite su activación. La cinasa de tirosinas ZAP-70 tiene varios sustratos dentro de la célula, siendo el más importante LAT, el cual al ser fosforilado en varias tirosinas recluta a su vez a PI3K, SLP-76 y fosfolipasa C γ (PLC γ) las cuales a su vez se asocian a Grb2/Sos/Ras y Vav. Esto produce un incremento en Ca²⁺, inositol-3-fosfato y diacilglicerol, permitiendo la activación de distintas serin-treonin cinasas (PKC y MAPK, CAMK respectivamente) entre otras (Fig. 1) (Revisado en Parry & Ward, 2005; Kresh, 2007; Chaplin 2010; Balagopalan, et al., 2010). Los co-receptores CD4 y CD8 reconocen las mismas moléculas del MHC que reconoce el TCR (MHC II y MHC I respectivamente), lo cual favorece una interacción LT-APC más estable, y promueve la activación de Lck y Fyn, y la fosforilación de los ITAMS de CD3 ζ (Fig. 1)

(Kersh, 2007).

Las moléculas co-estimuladoras contribuyen a la activación del LT, regulando positivamente la señal del TCR, e induciendo señales independientes del TCR que influyen en la respuesta celular. En conjunto, las señales del TCR y de las moléculas co-estimuladoras llevan al reclutamiento de distintos factores de transcripción como NFAT, AP-1, NFκB y CREB que regulan la expresión de genes importantes para la activación y diferenciación de los linfocitos T, en particular IL-2. La activación de NFAT en ausencia de la activación de otros factores de transcripción como AP-1 y NFκB, induce un patrón de expresión genética que resulta en anergia y por tanto una carencia característica de la producción de IL-2 (Smith-Garvin, et al., 2009).

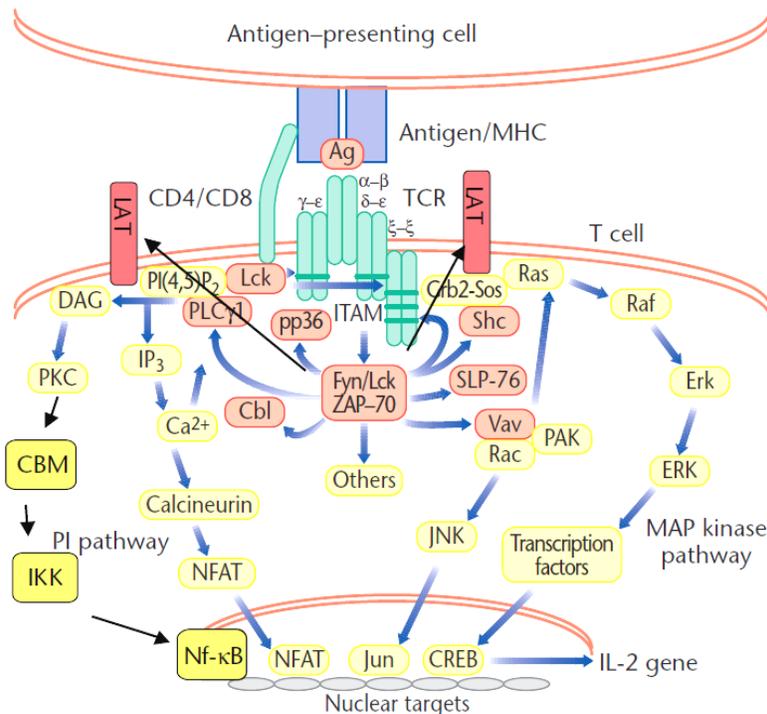


Figura 1. Cascada de señalización durante la activación de los LT inducida a través del TCR y/o moléculas co-estimuladoras. Las señales del TCR inducen la activación de diferentes cinasas y el aumento de segundos mensajeros como el calcio, DAG e IP₃ lo que con ayuda de señales de moléculas co-estimuladoras 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; aquí se muestra la activación de los factores de transcripción NFκB, NFAT, AP-1 y CREB responsables de activación del gen de IL-2; en rojo se muestran las moléculas que pueden ser fosforiladas en las tirosinas por acción de las señales conjuntas del TCR/CD3 con CD4 ó CD8. (CBM-complejo multimolecular activador de IKK formado por Carmal, Bcl-10 y Malt1) (Tomado de Kersh, 2007).

1.5 Anergia

La activación del LT tiene un papel importante en la patogénesis de enfermedades inflamatorias y autoinmunes. A pesar de que la gran mayoría de los LT potencialmente auto-reactivos, específicamente aquellos con elevada afinidad del TCR por el MHC, son eliminados en el timo a través de un proceso de selección negativa, resultando en el establecimiento de un estado de tolerancia a los antígenos propios, algunos LT con baja afinidad para antígenos propios pueden escapar a la periferia donde otros mecanismos como supresión/regulación, apoptosis, supresión clonal o anergia previenen autoinmunidad (revisado en Saibil, et al., 2007; Lineberry & Fathman, 2006).

Cuando la célula T es activada a través del TCR en ausencia de señales de las moléculas co-estimuladoras, la célula alcanza un estado de menor respuesta denominado anergia. La anergia se considera como un mecanismo de tolerancia en el cual un LT, intrínsecamente funcional alcanza un estado de inactivación, y aunque se mantiene vivo por un periodo de tiempo largo, tiene limitaciones funcionales como pobre división celular, diferenciación celular, y producción de citocinas. El mantenimiento de este estado puede o no requerir de la presencia del antígeno y puede o no ser reversible por la adición de IL-2 (Schwartz, 2003). La inducción de anergia en LT como modelo de inmunotolerancia puede ser de gran interés ya que permite entender los mecanismos que inducen ese estado anérgico y podría permitirnos manipular a las células T; por ejemplo, crear estrategias terapéuticas para prevenir la inducción de anergia en respuestas anti-tumorales ó llevar a un LT activado a un estado de anergia en enfermedades autoinmunes (revisado en Saibil, et al., 2007; Fehr, et al., 2010; LI, et al., 2010).

Existen dos tipos básicos de anergia: 1) anergia clonal o anergia *in vitro* que se caracteriza por presentar un estado de arresto del crecimiento y que se induce principalmente en clones de células T mediante estímulo para TCR en ausencia de señales de moléculas co-estimuladoras o por flujos de calcio y; 2) la tolerancia adaptativa o anergia *in vivo* que se induce mediante estimulaciones continuas con antígenos específicos para el TCR y se caracteriza por presentar una inhibición más generalizada en las funciones efectoras y proliferativas (revisado en Saibil, et al., 2007; LI, et al., 2010).

1.5.1 Anergia clonal

Se caracteriza principalmente por una pobre producción de IL-2 y baja proliferación. Este estado se induce en clonas T CD4⁺ al estimular a través del TCR en concentraciones óptimas (10ug/ml de OKT3 (Howe, et al.,2003; Powel, et al., 1999)) por 6-12 hrs y en ausencia de señales de moléculas co-estimuladoras, mediante la estimulación con ligandos de baja afinidad y en presencia de señales co-estimuladoras, particularmente de CD28, o mediante adición de ionomicina o bloqueando la co-estimulación con anticuerpos anti-CTLA4. Todas estas condiciones inducen una activación débil o incompleta de la célula, sin embargo son lo suficientemente fuertes para inducir nueva síntesis de proteínas. Este estado anérgico puede ser revertido adicionando IL-2 (Schwartz, 2003).

En el modelo de anergia clonal inducido a través del estímulo de TCR no hay cambios en los niveles proteicos del TCR, CD4 y Zap-70 comparado con células no anérgicas, sin embargo, los niveles de fosforilación de Zap-70 son menores en células anérgicas, mientras que los de cCbl son iguales, lo que favorece la degradación por proteosoma de Zap-70 y por tanto una disminución del 30 a 50% en la fosforilación de LAT y PLC γ , comparado con células no anérgicas (Choi & Schwartz, 2007). El señalosoma de LAT que se induce bajo estas condiciones es capaz de conllevar a un incremento en los niveles de calcio intracelular y por tanto a la activación de calcineurina, la cual defosforila a NFAT y permite su translocación al núcleo y la transcripción de genes como el de la Cinasa de Diacilglicerol (DGK) que elimina el Diacilglicerol (DAG), lo que previene la activación de la vía de Ras y por lo tanto de la vía de las MAPK, en particular pérdida en la fosforilación de ERK (Choi & Schwartz, 2007). La inhibición de la producción de IL-2 puede ser revertido adicionando inhibidor de DGK (Zha, et al., 2006). Además, el bloqueo en la vía de ERK inhibe al factor de transcripción Elk1, lo que disminuye los niveles de expresión del gen c-Fos afectando la formación del complejo AP-1 (Saibil, et al., 2007). De manera similar, la translocación de NFkB al núcleo se ve afectada, posiblemente a una pobre movilización de PKC a la membrana plasmática, afectando la transcripción del gen de IL-2 (Choi & Schwartz, 2007). Interesantemente, la inducción de este estado requiere de síntesis de nuevas proteínas encargadas de mantener este estado llamadas factores anérgicos tales son Cbl-b, Itch, GRAIL y TRAF que pertenecen a la familia de E3 ubiquitin ligasas, mandando a PKC θ y PLC γ a degradación mediada por proteosoma y otras como Icaros, Egr2 y CREM

que funcionan como factores remodeladores de la cromatina dejándola en un estado menos accesible para la transcripción (Fig. 2) (Wells, 2009).

En el modelo de anergia por ionomicina, se inducen fuertes flujos de calcio intracelular que activan a calcineurina con la subsecuente defosforilación de NFAT, lo que permite su translocación al núcleo. La ausencia de otros factores de transcripción como AP-1 que dependen de otras vías de señalización, favorece que la actividad de NFAT se concrete en la transcripción de genes como el de DGK, y de los mismos factores de transcripción que se inducen en el modelo de anergia clonal suprimiendo la transcripción del gen de IL-2 (Heissmeyer, et al., 2005).

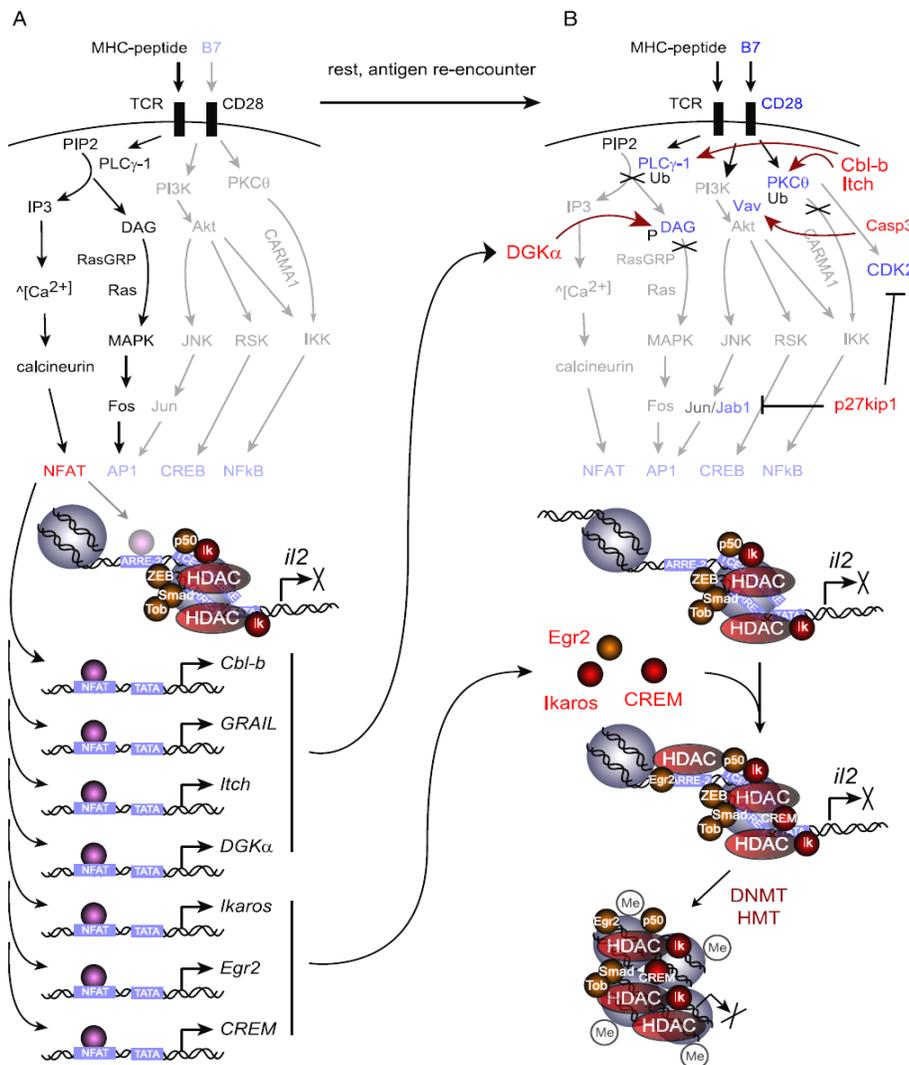


Figura 2. Modelo de regulación de señales del LT bajo el solo estímulo de TCR y la

función de factores anérgicos en un segundo encuentro con el antígeno. A) La sola estimulación del TCR no permite la transcripción del gen de IL-2, pero sí permite la transcripción de genes de respuesta a NFAT. B) Los factores anérgicos inducidos previamente, miembros de E3 ubiquitin ligasas (Cbl-b, GRAIL e Itch) así como caspasa 3 actúan sobre enzimas acopladas a la proximidad de las señales del TCR y CD28 mandándolas a degradación, mientras que DGK α interrumpe la señalización dependiente de DAG. Aunado a esto, represores transcripcionales como Ikaros, CREM, Egr 2 y 3 son reclutados al gen de IL-2, permitiendo su silenciamiento a través de mecanismos que pueden incluir metilación del DNA y de histonas (tomado de Wells, 2009).

1.5.2 Tolerancia adaptativa

Este mecanismo se caracteriza por inhibir la proliferación y la producción de todas las citocinas excepto IL-10, y requiere la presencia continua del antígeno para mantener el estado anérgico y no se puede revertir el bloqueo de la proliferación adicionando IL-2 (Choi & Schwartz, 2007).

Este estado se induce mediante repetidas estimulaciones con antígenos específicos para el TCR, lo que conlleva a niveles proteicos elevados de CD4 y Zap-70, sin embargo, la fosforilación de Zap-70 disminuye y aumentan los niveles de cCbl fosforilado lo que lleva a Zap-70 a proteosoma y disminuye la fosforilación de sus sustratos LAT y PLC γ hasta en un 95% comparado con células no tolerogénicas. Debido a esto, se afecta la producción de IP3 y por lo tanto no se libera el calcio intracelular lo que impide que se active la vía de NFAT (Choi & Schwartz, 2007). Contrario al modelo de anergia en el cual la fosforilación de ERK se abate, en el modelo de tolerancia adaptativa la vía de señalización de Ras/MAPK se afecta parcialmente, esto posiblemente se deba a que la vía de Ras pudiera ser activada independientemente de la vía de LAT y que participe alternativamente la proteína adaptadora Slp-76 (Schwartz, 2003). Esto, debido a que los niveles de fosforilación de ERK y de Slp-76 se observaron normales en un modelo de tolerancia adaptativa.

1.6 La molécula co-receptora CD43

Una de las moléculas co-receptoras que activa células T es CD43, conocida también como la sialoforina, gpL115, leukosialina. Se expresa en la superficie de todas las células hematopoyéticas, excepto en eritrocitos, también algunas células epiteliales y cancerosas la expresan (revisado en Aguila-Delfin, et al., 2006). Se han identificado dos isoformas, la isoforma de 130 kDa, que contiene el hexasacárido ramificado NeuAc(α 2-3)-Gal(β 1-3)[NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)GalNAc y se expresa en células T CD8+ y CD4+

activadas, monocitos, neutrófilos, plaquetas, linfocitos B y macrófagos; y la isoforma de 115 kDa que tiene el tetrasacárido NeuAc(α 2-3)-Gal(β 1-3)[NeuAc(β 2-6)]GalNac y se expresa en en linfocitos T CD4+ no activadas y células precursoras eritroides (Carlsson & Fokuda, 1986; Remold-O'Donnell, et al., 1986). CD43 es una proteína transmembranal tipo I. La porción extracelular tiene 235 aa., y comprende cinco repeticiones en tándem de 18 aminoácidos cada una (116Ile-205Ser) ricas en serinas y treoninas que están altamente O-glicosiladas. La composición de aminoácidos y la decoración de carbohidratos le proporcionan a la molécula una estructura alargada, que dadas sus dimensiones (45nm de longitud), la hace candidato a establecer las primeras interacciones de un linfocito con la APC. Así mismo, en base a su composición de carbohidratos, CD43 se considera como miembro de la familia de las mucinas. La región intracelular (IC) cuenta con 123 aa y contiene varias secuencias que favorecen la participación de esta molécula en la señalización intracelular ya que cuenta con dos sitios de unión para proteínas de a familia ERM (ezrina, radinina y moesina), dos sitios de localización nuclear (NLS) en los residuos 5-19 y 61-75 que se sobreponen con los sitios de unión de ERM y entre los sitios ERM y NLS hay serinas y treoninas potencialmente fosforilables posiblemente por AMPc, GMPc, PKC y CKII. En el extremo C-terminal cuenta con tres secuencias de sumoilación y una región rica en prolinas en donde proteínas con dominio SH3 se pueden unir a ésta, lo que permite a CD43 participar en diferentes vías de señalización proporcionándole un papel funcional, no tiene actividad catalítica intrínseca (revisado en Pallant, et al., 1990; Aguilar-Delfin, et al., 2006; Bravo-Adame, et al., 2012).

1.7 Funciones de CD43

La expresión altamente regulada de CD43 a través de diferentes mecanismos celulares, su abundancia, estructura altamente alargada, y la homología de su dominio intracitoplasmático entre especies sugiere que contribuye de manera importante en la homeostasis del sistema inmune y en modular las decisiones de la célula a través de múltiples funciones que son algunas veces opuestas como, adhesión y anti-adhesión, locomoción, activación celular, diferenciación, proliferación en LT y LB, apoptosis, maduración de células dendríticas, estallido respiratorio en monocitos, secreción de citocinas y quimiocinas en NK, mastocitos, dendríticas y LT (revisado en Aguilar-Delfin, et

al., 2006; Pedraza-Alva & Rosenstein., 2007).

En linfocitos T la activación a través de CD43 induce la agregación homotípica y la secreción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias de una manera independiente de antígeno, como resultado de la activación de los factores de transcripción AP-1, NFAT y NFκB. Se sugiere que CD43 tiene un papel positivo en regular la migración de linfocitos T a sitios de inflamación, ajusta el número celular y la homeostasis al regular la apoptosis (Seo & Ziltener, 2009; Bravo-Adame, et al., 2012). CD43 funciona como una molécula co-estimuladora del TCR ya que permite la secreción de IL-2, activación celular y proliferación, estas señales co-estimuladoras son independientes a las de CD28 (Sperling, et al., 1995). Entre las funciones opuestas asociadas a CD43 se ha encontrado que, activación cruzada con anticuerpos de CD43 en células Jurkat y en células de la médula ósea induce muerte celular programada, mientras que, por otro lado, la región IC al ser cortada por γ -secretasas permite su translocación al núcleo, lo que protege a las células tumorales que expresan CD43 de señales apoptóticas, promoviendo supervivencia celular (revisado en Aguilar-Delfin, et al., 2006; Bravo-Adame, et al., 2012).

1.7.1 Cascada de señalización de CD43

En linfocitos T, la señalización de CD43 permite el reclutamiento de las cinasas Fyn o Lck mediante la unión de su dominio SH3 a la región rica de prolina del dominio intracitoplasmático de CD43 y la fosforilación de las tirosinas de los ITAMs de la cadena de CD3 ζ y activación de la cinasa ZAP-70. Esto conlleva a la formación de complejos macromoleculares con las proteínas adaptadoras Shc, Vav y Grb2 activando diversas vías de señalización. También es activada la cinasa SYK que se asocia con PLC γ (probablemente a través de LAT), y se recluta PI3K. El resultado inmediato de estas señales es un aumento en la cantidad de IP₃ y DAG, lo que favorece flujos de calcio, y la activación de varios miembros de las familias de cinasas PKC, MAPK que a su vez culminan en la activación de los factores de transcripción NFAT, AP1, NFκB permitiendo la transcripción de diversos genes, en particular del gen de IL-2 (Fig. 3) (Santana, et al., 2000; Park, et al., 1991; Pedraza-Alva, et al., 1998; Del Rio, et al., 2004; Cruz-Muñoz, et al., 2003; Pedraza-Alva, et al., 1996).

Aunado a esto, se ha demostrado en el laboratorio que, cuando las señales de CD43

antecedentes o son recibidas al mismo tiempo que las del TCR ó incluso hasta 30 minutos después, CD43 induce un círculo de retro-alimentación positiva que prolonga la duración de la fosforilación de ERK al impedir la asociación de la fosfatasa SHP-1 con Lck lo que resulta en una fosforilación sostenida de la cadena ζ del TCR y de Zap-70 manteniendo por más tiempo activa la vía de ERK (Fierro, et al., 2006), este círculo de señales de larga duración de retro-alimentación positiva son necesarias para mejorar la transcripción de genes (Stefanova, et al., 2003). Sin embargo, cuando las señales de CD43 son recibidas después de 30 minutos de las del TCR, el linfocito T alcanza un estado de menor respuesta funcional, lo que le proporciona a CD43 un papel importante en la prevención de anergia (Fierro, et al., 2006).

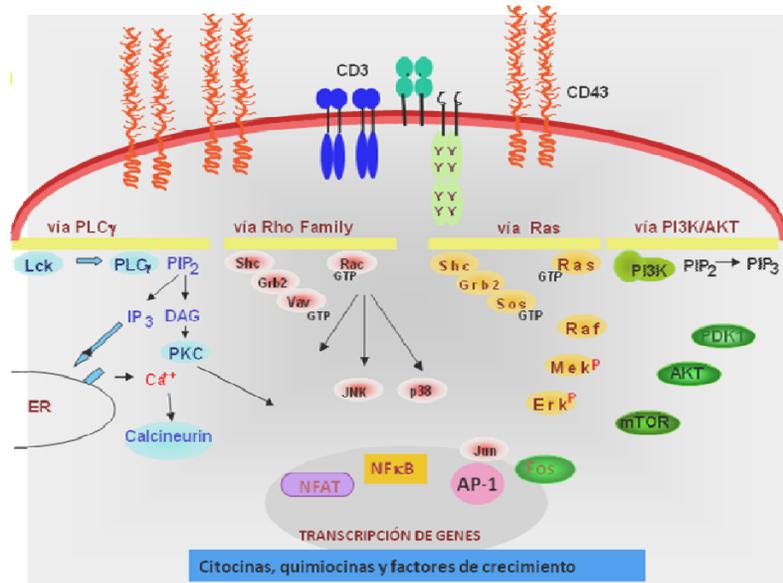


Figura 3. Vías de señalización inducidas por la molécula coestimuladora CD43 y TCR. La activación de los LT a través de CD43/TCR induce la activación de la vía de PLC γ , Rho, Ras y PI3K/AKT, las cuales reclutan y activan diversos factores de transcripción como NF κ B, AP-1 y NFAT lo que permite la transcripción de diversos genes como IL-2.

1.8 IL-2

Las citocinas son proteínas solubles que actúan usualmente de manera autócrina o también de manera parácrina. Cuando se producen en grandes cantidades éstas pueden entrar a la circulación y actuar a distancia desde el sitio de producción (endocrina). La producción de estas proteínas es usualmente transitoria y altamente regulada. Al unirse a sus receptores, las citocinas inician una cascada de señalización que regula un gran número de genes y por

ende, el comportamiento celular (Wilson & Barker, 2009). De este modo, las citocinas regulan la comunicación entre las células envueltas en la inmunidad, inflamación, hematopoyesis y embriogénesis (Malek, 2008). Las citocinas producidas por linfocitos reciben el nombre de interleucinas (IL) seguidas por un número (revisado en Malek, 2008; Janeway & Travers, 1994).

IL-2 es una citocina α -hélice de 15,000 Da producida predominantemente por LT CD4+ y en menor medida por LT CD8+; también es producida por células dendríticas, natural killer y células T killer. En LT su unión a receptores específicos activa vías de señalización intracelular que participan en la activación del LT, resultando en una activación genética específica, y entrada al ciclo celular. Promueve la actividad citolítica de monocitos y en sinergismo con IL-4, favorece la proliferación de LB activados así como el switch de isotipos y la secreción de inmunoglobulinas. En pacientes con lupus sistémico eritematoso (SLE) se considera una característica del síndrome una menor producción de IL-2.

El gen de IL-2 se localiza en el brazo largo del cromosoma 4 en humanos. El estudio de la regulación transcripcional de este gen se ha enfocado en un promotor mínimo que se extiende 300pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (SST), aunque también se han identificado secuencias regulatorias de islas CpG que se extienden hasta 1.3kb corriente arriba del SST del gen de IL-2 a las que se unen otros factores de transcripción (Fig. 4) (revisado en Sugamura, et al., 1996; Janeway & Travers, 1994; Malek, 2008; Meager & Wadhwa, 2007).

La inducción de la transcripción del gen de IL-2 en LT bajo el estímulo de TCR y CD28 ha sido descrita. Se promueve la translocación de p300/CBP al promotor de *fos* lo que promueve la acetilación de la histona 4 y la unión de la RNA polimerasa II induciendo la transcripción de Fos lo que permite se una a Jun formando AP-1. Por otro lado, las señales de CD28 también permiten la acetilación de histonas y el remodelamiento de la cromatina del gen de IL-2, favoreciendo la unión de los diferentes factores de transcripción. Así, AP-1 y NFAT se unen al promotor de IL-2; también se incrementa la unión de CREB con CBP y en conjunto se induce la producción de IL-2, así como la expresión del receptor de IL-2 lo que forma un círculo de retroalimentación positiva permitiendo la expresión del gen de IL-2 (revisado en Crispín & Tsokos, 2009; Acuto & Michel 2003).

de la activación de fosfolipasa C γ (PLC γ) la cual hidroliza a fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP $_2$) produciendo inositol-1,4,5-trifosfato (IP $_3$) y diacilglicerol (DAG). IP $_3$ induce la liberación de calcio del retículo endoplasmático (RE) lo cual abre los canales de calcio de la membrana plasmática permitiendo el aumento de los niveles de Ca $^{2+}$ intracelular, así, Ca $^{2+}$ se une a calmodulina que activa a la fosfatasa, calcineurina. Esta última defosforila a NFAT, lo cual resulta en el descubrimiento de un sitio de localización nuclear que permite su translocación al núcleo, en donde ejerce su actividad de factor transcripcional regulando la transcripción de distintos genes. En el caso particular de LT y del promotor de IL-2, pueden funcionar como activadores o represores según la presencia/ausencia de otros factores de transcripción como AP-1 o CREM respectivamente (revisado en Macian, 2005; Serfling, et al., 2006; Macián, et al., 2001; Kyttaris, et al., 2007). Para LT se ha relacionado a NFAT1 con la activación de la respuesta inmune (preferencialmente Th1) cuando se asocia con AP-1, en ausencia de este se relaciona con la expresión de genes de inducción de anergia ya que bloquea la activación de células T y su proliferación, también NFAT1 en asociación con desacetilasas de histonas (HDAC) se ha relacionado con el silenciamiento de genes; además NFAT se ha relacionado con la expresión de genes de activación de la respuesta inmune (específicamente con Th2) (revisado en Srinivasan & Frauwirth, 2007; Leung-Theung-Long, et al., 2009; Soto-Nieves, et al., 2009; Müller & Rao, 2010).

1.9.2 AP-1

El factor de transcripción “proteína de activación 1” (AP-1) es ensamblado por proteínas Jun (c-Jun, JunB y JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2) o ATF (ATF-a, ATF-2 y ATF-3), formando homodímeros o heterodímeros (Turpaev, 2006). AP-1 pertenece a la familia de proteínas b-zip (zíper básico de leucinas), es implicada en una gran variedad de procesos celulares como diferenciación, crecimiento, apoptosis, migración celular, transformación, proliferación y supervivencia (Vesely, et al., 2009). AP-1 puede regular a sus genes blanco positiva o negativamente, según la abundancia de los diferentes patrones de dimerización, regulación pos-transcripcional e interacción con proteínas accesorias. En LT, la activación a través del TCR produce DAG el cual incide sobre la vía de señalización Ras-MAPK (JNK ó p38 ó ERK), la vía PKC θ -SPAK. Estas cinasas a su vez activan directamente (como es el caso de JNK) o indirectamente a Fos, Jun y ATF (revisado en Veselya, et al.,

2009; Hess, et al., 2004; Manicassamy, et al., 2006; Tibbles & Woodgett, 1999).

1.9.3 NFκB

La proteína de unión al enhancer (mejorador de la transcripción) de inmunoglobulinas kappa (NFκB) se encontró por primera vez en células B, describiéndose como un regulador importante de la transcripción de las cadenas κ de las inmunoglobulinas (Vainer, et al., 2008), sin embargo es expresado en casi todos los tipos celulares (Majdalawieh & Ro, 2010). Actualmente se sabe que es un regulador clave de la respuesta inmune innata y adaptativa y de manera general participa en la inflamación y el crecimiento celular. Los miembros de la familia de NFκB [NFκB1 (p50), NFκB2 (p52), RelA (p65), c-Rel y RelB] tienen un dominio N-terminal de homología a Rel (RHD), responsable de la homo y heterodimerización, así como una secuencia de unión al DNA. RelA, RelB y c-Rel tienen un dominio C-terminal de activación transcripcional (TAD), mientras que NFκB1 y NFκB2 no cuentan con este dominio y por tanto para ejercer una función positiva requieren de la interacción con otros factores. NFκB se expresa de manera constitutiva y está inactivo en el citoplasma mediante interacciones con proteínas de la familia IκB. En respuesta a múltiples estímulos como citocinas de inflamación, productos de bacterias o virus, diferentes tipos de estrés, IκB es fosforilado en dos serinas, lo que lleva a su poli-ubiquitinación y destrucción por proteosoma. Como consecuencia, el sitio de localización nuclear de NFκB queda libre y entonces se transloca al núcleo y activa la transcripción de una gran variedad de genes. La cinasa encargada de fosforilar IκB es IKK la cual es una proteína de 700-900 kDa, tiene dos subunidades catalíticas (IKKα y β) con un dominio amino terminal hélice-lazo-hélice (HLH) que modula la actividad de cinasa y un dominio cierre de leucina (LZ) que permite la homo y hetero-dimerización además de un componente adicional sin actividad catalítica pero indispensable para activar la vía de NFκB, llamado NEMO (revisado en Gerondakis & Siebenlist, 2010; Wertz & Dixit, 2010; Israël, 2010).

La regulación de la proliferación de LT dependiente de NFκB en vivo es compleja. Bajo el estímulo de TCR/CD28, c-Rel parece modificar la cromatina cerca de la región promotora de IL-2, conduciendo a su transcripción; así mismo, en cultivo, c-Rel es esencial para la traducción de IL-2 y por tanto, para la proliferación de LT CD4+. Además, ratones deficientes en c-Rel muestran un menor número de LT CD4+ pero esto es por mecanismos

independientes de IL-2, por lo que se piensa que el mecanismo de expresión de IL-2 es independiente de c-Rel. Éstos datos en conjunto sugieren que, en vivo, la vía de NFκB contribuye a la proliferación del LT y que está en función del tipo de célula T, su estado de diferenciación y la naturaleza y fuerza de las señales co-estimuladoras (revisado en Gerondakis & Siebenlist, 2010).

1.9.4 CREB

La proteína “elemento de respuesta y unión por AMP cíclico” (CREB) se expresa de manera constitutiva y tiene un papel importante en múltiples órganos, regulando funciones como memoria, potenciación a largo plazo, arritmias cardíacas, función de la pituitaria, espermatogénesis y respuesta inmune. En el caso particular del gen de IL-2, CREB promueve la transcripción del gen mediante su unión al sitio -180 del promotor proximal, lo cual favorece el reclutamiento de la maquinaria de transcripción (Mayr & Montminy, 2001).

CREB, CREM y ATF pertenecen a la familia de factores de transcripción de respuesta a AMPc, comparten una estructura conservada de proteínas con un dominio C-terminal b-zip, lo que les permite formar homo y hetero-dímeros que se unen a una secuencia específica de DNA llamado elemento de respuesta a AMPc (CRE), que se caracteriza por ser una secuencia palindrómica consenso TGACGTCA. Los miembros de esta familia tienen un dominio N-terminal conocido como dominio modulador de la activación (AD) dividido en dos regiones, la primera conocida como caja de fosforilación (P-box también conocido como dominio inducible a cinasas “IKD”) la cual contiene sitios de fosforilación por varias cinasas regulando su potencial de activación de estas proteínas, la segunda región tiene dos dominios ricos en glutamina (Q1 y Q2) que flanquean a IKD (ATF-1 solo tiene un dominio rico en glutamina) y proporciona sitios de interacción con componentes de la maquinaria basal de transcripción. CREB y CREM tienen diferentes isoformas generadas por “splicing” alternativo que funcionan como activadores o represores de la transcripción principalmente por la carencia de su dominio Q2 que interacciona con RNA pol II (Fig. 5).

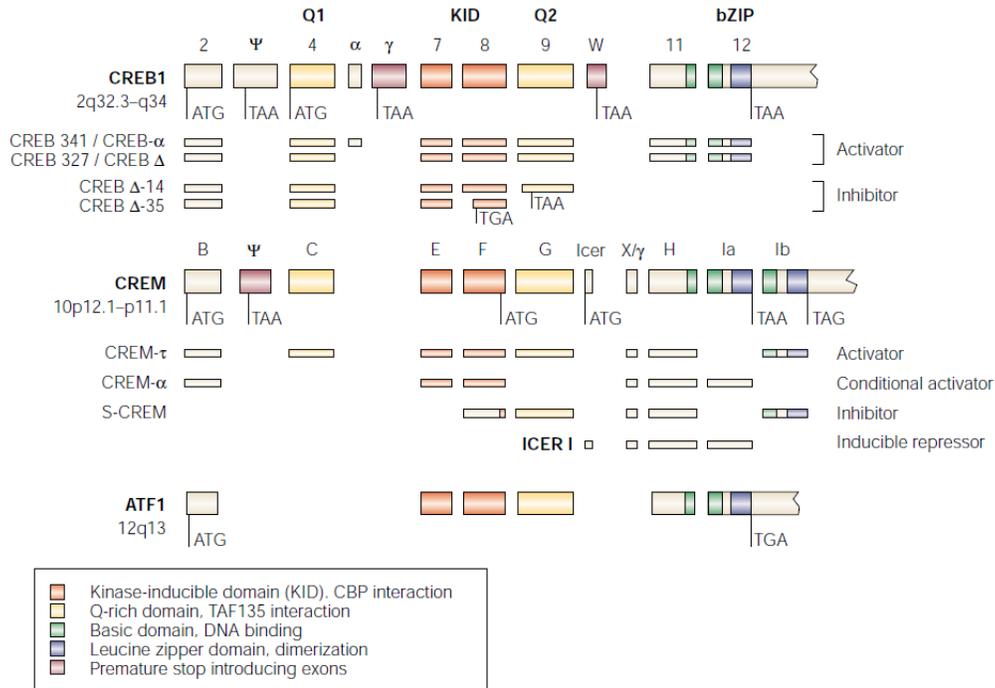


Figura 5. Organización genómica de los factores de transcripción de la familia de CREB de humano- Alineamiento genómico de las secuencias de CREB, CREM y ATF-1, los dominios homólogos están representados por diferentes colores como se muestra en la “lista clave”. Se muestran las isoformas activadoras, represoras y los codones de paro lo que permite generar proteínas truncadas en el C-terminal y N-terminal (tomado de Mayr & Montminy, 2001).

CREB tiene un sitio de localización nuclear y se encuentra constitutivamente unido al DNA como homodímero, pero es transcripcionalmente inactivo (Elliot, et al., 2003). Su activación requiere de la fosforilación de la serina 133 (Gonzalez & Montminy, 1989). La vía canónica de fosforilación de CREB S-133 inicia con el incremento en los niveles de AMPc, este se une a las dos subunidades catalíticas de PKA, lo que induce un cambio conformacional en PKA que libera y activa las sub-unidades catalíticas, estas subunidades catalíticas se translocan entonces al núcleo y fosforila a CREB que está constitutivamente unido al núcleo (Montminy & Bilezikjian, 1987; Yamamoto, et al., 1988; Gonzalez & Montminy, 1989; Montminy, 1997; Daniel, et al., 1998; Elliot, et al., 2003). Existen otras vías que participan en la fosforilación de CREB en la serina 133 como CaMKIV (Sun, et al., 1994), ERK/RSK, p38/MAPKAP cinasa 2 (Xing, et al., 1998; Tan, et al., 1996). La fosforilación en la serina 133 causa un cambio conformacional en CREB permitiendo una segunda fosforilación en la S129 lo cual produce una activación completa de CREB, esta

segunda fosforilación se da únicamente por la glucógeno sintetasa (GSK-3) (Fiol, et al., 1994; Tyson, et al., 2002). Por otro lado, la fosforilación en la S142 desestabiliza la unión de CREB con la proteína de unión a CREB (CBP) impidiendo la transcripción del gen, esta fosforilación se lleva a cabo por la cinasa CaMKII (Sun, et al., 1994; Mayr & Montminy, 2001). Es importante mencionar que CREM actúa como represor para lo cual requiere también ser activado por su fosforilación en la S117, compartiendo las mismas vías de activación (De Cesare, et al., 1999; Carlezon, et al., 2005; Tenbrock, et al., 2003; Tenbrock, et al., 2006).

De este modo, se ha establecido un modelo de la regulación de la transcripción del gen de IL-2 en LT a través de las señales de TCR/CD28 (revisado en De Cesare, et al., 1999). De manera constitutiva el homodímero CREB-CREB se une a su sitio -180 del promotor del gen de IL-2, el LT al recibir la señal a través de TCR/CD3 y moléculas co-estimuladoras (CD28) dispara las vías de señalización mencionadas para fosforilar la S133 de CREB, lo que permite que CREB reclute a través de su dominio KID a p300 y CBP que, al tener actividad intrínseca de acetil-transferasas de histonas, mejora la transcripción por inducir remodelamiento de la cromatina a un estado de eucromatina, dejándola así más accesible para reclutar a la maquinaria de transcripción, lo cual lo hace a través de su dominio Q2 de CREB el cual se une a la proteína de unión a la caja TATA asociada al factor hTAF130 que es una subunidad del factor de transcripción II (TFIID) de la RNA polimerasa II. Aunado a esto, el conjunto de factores de transcripción previamente descritos permite se forme un enhanceosoma (complejo mejorador de la transcripción) que se asocia con el complejo de la RNA pol II, activando la transcripción del RNAm de IL-2 y posteriormente su traducción. Una manera de mantener la homeostasis celular es “apagar las señales”, proceso que ocurre en LT en función del tiempo, en donde, 2-4 hrs después de la estimulación a través de TCR/CD3-CD28 se inducen los RNAm de IL-2 y de CREM; 6 hrs después del estímulo, inicia la defosforilación de pCREB por las fosfatasa PP1 y PP2A (fosfatasa de serinas y treoninas); 48-72 hrs después, aumentan los niveles de RNAm de CREM por tanto su traducción aumenta, aunque desde las 2 hrs posteriores al estímulo CREM comienza a unirse a promotor de IL-2, remplazando a CREB. A pesar de que CREM también puede reclutar a p300 y CBP por su dominio IKD, no activa su actividad acetilasa de histona y no es capaz de reclutar a TFIID pues carece del dominio Q2. No obstante, se

ha demostrado que CREM recluta a HDAC1, una desacetilasa de histonas cuya actividad favorece que condense de nuevo la cromatina y quede el gen de IL-2 en un estado no permisible para la transcripción. El resultado de todos estos eventos es que de 24-100 hrs después del estímulo, disminuyen los niveles del RNAm de IL-2 y por tanto disminuye su traducción (Fig. 6) (revisado en De Cesare, et al., 1999; Tenbrock, et al., 2003; Tenbrock, et al., 2006). Además de este modelo establecido de “encendido y apagado” de la señal, se ha encontrado que en células anérgicas la cantidad de complejo CREB/CREM al sitio -180 del promotor de IL-2 es mayor que en células no energizadas (Powel, et al., 1999).

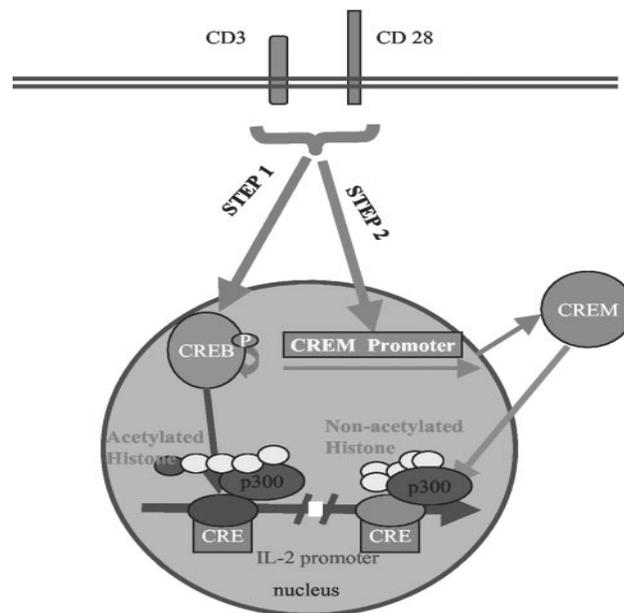


Figura 6. Modelo de la regulación positiva y negativa de la transcripción del gen de IL-2 mediada por CREB-CREM. Las células T son activadas por TCR/CD3 y CD28 esto genera activación de diversas cinasas permitiendo activación de CREB de este modo pCREB recluta a CBP y p300 aunado a otros factores de transcripción forman un enhansosoma que induce la transcripción y traducción de IL-2 (Paso 1). Mientras esto ocurre se produce CREM el cual al paso del tiempo y de una manera gradual reemplaza a pCREB regulando negativamente la transcripción de IL-2 (Paso 2) (tomado de Tenbrock, et al., 2003).

1.10 Las señales de CD43 regulan la respuesta funcional del linfocito T.

Previamente en el laboratorio se demostró que las señales de la molécula coestimuladora CD43 activan factores de transcripción como NFκB, AP-1 y NFAT (Santana, et al., 2000). Cuando a las señales del TCR les anteceden las de CD43 por no más de 30 minutos, los LT

presentan un incremento en la fosforilación de ERK1/2, son capaces de producir IL-2 y por lo tanto de proliferar, lo que indica que hay una ventana de tiempo en la que las señales de CD43 pueden prevenir el estado de anergia (Fierro, et al., 2006). Si bien estos antecedentes sugieren que las señales de CD43 pueden prevenir o rescatar al LT de un estado de menor respuesta funcional, se desconoce si a través del reclutamiento de otros factores de transcripción CD43 participa en la prevención de este estado de no-respuesta o anergia. Los experimentos que se realizaron para este trabajo estuvieron enfocados a estudiar 1) si las señales de CD43 reclutan al factor de transcripción CREB, evaluando la fosforilación del factor de transcripción CREB en linfocitos T humanos activados a través del TCR y/o CD43, y 2) en un modelo de anergia inducido por ionomicina.

2. Hipótesis

Las señales co-estimuladoras de CD43 modulan la activación de células T para prevenir anergia.

3. Objetivo

3.1 Objetivo General:

Determinar si las señales de CD43 previenen un estado de anergia a través de activar a CREB y ERK.

3.2 Objetivos Particulares

- Demostrar si las señales de CD43 inducen la fosforilación de CREB como mecanismo que inhibe la inducción de anergia.
- Establecer un modelo de anergia en células Jurkat.
- Determinar si las señales de CD43 previenen o rescatan un estado de anergia, a nivel de ERK.

4. METODOLOGÍA

4.1 Anticuerpos

La activación de linfocitos T y de células Jurkat fue a través de L10, un anticuerpo monoclonal (IgG₁) murino que reconoce a CD43, en particular un epítopo ácido siálico-independiente del extremo amino-terminal de esta proteína (Remold-O'Donnell *et al.*, 1986) y el anticuerpo OKT3 (IgG₂) que reconoce a la molécula CD3 del TCR (Hoffman *et al.*, 1980). Se usaron anticuerpos anti-IgG1 o anti-IgG2 de ratón (RaMIg) como anticuerpos entrecruzadores. Se utilizaron los anticuerpos anti-fosfo-CREB (Ser133 y Ser129), anti-CREB, anti-fosfo-ERK, anti-ERK2, anti-SP1, de Santa Cruz Biotechnology.

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 mediante gradiente de Ficoll-Hypaque (Julius *et al.*, 1973). Se adicionaron 3ml de Ficoll-Hypaque por cada 10ml de sangre previamente diluida 1:1 con PBS 1X (del inglés “Phosphate-Buffered Saline”, NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 4.3mM, KH₂PO₄ 1.4mM, pH 7.3) y se centrifugaron por 30 minutos a 600g. Las células mononucleares recuperadas del gradiente se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en RPMI 1640 suplementado con SFB (suero fetal bovino) 10% (v/v), 2mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomina, 50µM de β-mercaptoetanol) y se plaquearon en cajas de Petri (grado cultivo) a una concentración de 1x10⁷/ml, incubándose toda la noche a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Las células no adherentes (principalmente linfocitos T y B), fueron sometidas a selección negativa en donde se eliminan las células que no sean LT, con el Kit Pan T CellIsolationKit II (human) de MiltenyBiotec. Para ello, se recuperaron y adicionaron anticuerpos monoclonales conjugados con biotina anti-CD14, -CD16, -CD19, -CD36, -D56 y -CD123, los cuales son marcadores de linfocitos B, NK, células dendríticas, monocitos, granulocitos y eritrocitos respectivamente y se dejaron en agitación suave por 30 minutos a 4°C, se centrifugaron por 10 minutos a 550g, se re-suspendió con medio RPMI suplementado y la solución se agrega a perlas magnéticas que están recubiertas con

estreptavidina. Por último, esta solución es sometida a un campo magnético en donde se retienen aquellas células acopladas con los anticuerpos primarios y secundarios y se eluyen aquellas que no fueron reconocidas por los anticuerpos. La pureza de las células obtenidas fue evaluada por citometría de flujo (OKT3⁺ y CD43⁺: > 90%) (Fig. 7).

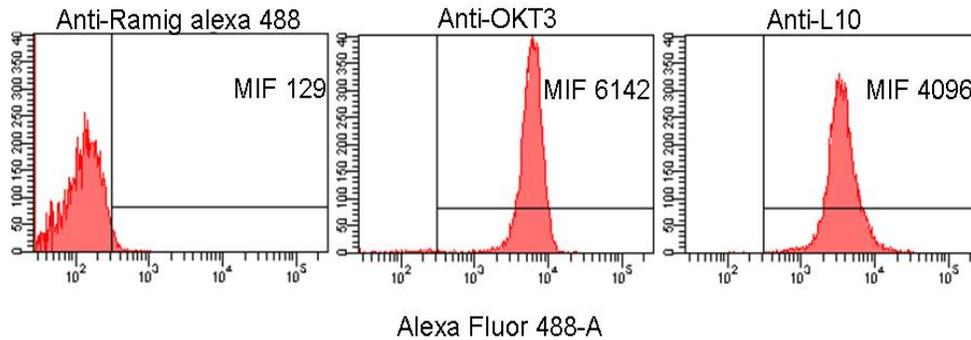


Figura 7. Purificación de Linfocitos T. Linfocitos T humanos purificados a partir de concentrados leucocitarios provenientes de donadores sanos (proporcionados por el banco de sangre del Hospital Regional del IMSS, Cuernavaca) por centrifugación diferencial mediante gradiente de Ficoll-Hypaque y purificadas por la técnica MiltenyBiotec. Se determinó la pureza de las células por tinción con anticuerpos anti-OKT3, anti-L10 y anticuerpo secundario anti-Ramig Alexa 488.

4.3 Líneas celulares

Las células Jurkat fueron mantenidas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, 2mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100µg/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, 100µg/ml estreptomycin y 50 µM de β-mercaptoetanol a 37°C en una atmósfera, 5% de CO₂ para disminuir los niveles de activación.

4.4 Inducción de anergia.

Los linfocitos T humanos y las células Jurkat fueron resuspendidas en RPMI 1640 suplementado al 10% con SFB a una concentración de 1x10⁶/ml células y se les agregó el ionoforo ionomicina a una concentración final de 0.5µM, posteriormente se incubó por 18 hrs a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Después del tiempo de incubación las células se lavaron tres veces con PBS (Howe, et al., 2003).

4.5 Estimulación celular.

Los linfocitos T humanos o las células Jurkat (10×10^6 , 5×10^6 células respectivamente) fueron resuspendidos en tubos eppendorf con 250 μ l de RPMI 1640 (2%SFB, 0%SFB respectivamente) e incubados con los anticuerpos L10 (4 μ g/ml) y/o OKT3 (4 μ g/ml) por 15 minutos a 4°C, posteriormente se adicionó el anticuerpo entrecruzador RaMIg (4 μ g/ml) y se incubaron las células a 37°C en baño maría por los tiempos indicados en resultados. Como control positivo se incluyeron células estimuladas con PMA (20ng/ml)/Ionomicina (1 μ g/ml) o estimuladas con OKT3 (1 μ g/ml) y CD28 (1 μ g/ml).

4.6 Obtención de extractos totales

Al término de la activación, para detener la reacción se adicionaron a las células 500 μ l de PBS frío, se centrifugó en tubos eppendorf por 15 segundos a 10, 000 g y se desechó el sobrenadante. Al pellet se le adicionaron 50 μ l de solución de lisis (Hepes 25mM pH 7.5, MgCl₂ 1.5mM, NaCl 250mM, EDTA 0.2mM, Tritón X-100 0.5%) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (antipainá 50 μ g/ml, PMSF 1mM, aprotinina 10 μ g/ml, leupeptina 1 μ g/ml, pepstatina A 10 μ g/ml, β GP 10mM, NAF 10mM, Na₃VO₄ 200mM, DTT 0.5mM). Las muestras se agitaron vigorosamente por 5 segundos y se incubaron durante 15 minutos a 4°C, se centrifugaron a 10410g durante 10 minutos a 4°C y se colectaron los sobrenadantes para su uso.

4.7 Obtención de extractos nucleares.

Al término de la activación, para detener la reacción se adicionaron a las células 500 μ l de solución hipotónica fría sin inhibidores (20mM HEPES pH7.9, 1mM EDTA, 1mM EGTA), se centrifugó en tubos eppendorf por 15 segundos a 10000g y se desechó el sobrenadante. Al pellet se le adicionaron 200 μ l de solución hipotónica (HEPES 20mM pH7.9, EDTA 1mM, EGTA 1mM) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (PMSF 0.5mM, aprotinina 10 μ g/ml, leupeptina 10 μ g/ml, pepstatina A 10 μ g/ml, β GP 40mM, NAF 20mM, Na₃VO₄ 1mM, Na₂MoO₄ 0.25mM, Na₄P₂O₇ 1mM, DTT 1mM). Las muestras se incubaron durante 15 minutos a 4°C; a los 7.5 minutos se adicionó NP-40 0.5% y se dejó terminar los 15 minutos, se centrifugaron a 400g por 7 minutos, se recuperaron los

sobrenadantes con los lisados de citoplasma y al pellet se le adicionó 50µl de solución hipertónica (HEPES 20mM pH7.9, EDTA 1mM, EGTA 1mM, glicerol 20%, NaCl 0.4M) con inhibidores de proteasas y fosfatasas (PMSF 0.5mM, aprotinina 10µg/ml, leupeptina 10µg/ml, pepstatina A 10µg/ml, βGP 40mM, NAF 20mM, Na₃VO₄ 1mM, Na₂MoO₄ 0.25mM, Na₄P₂O₇ 1mM, DTT 1mM). Las muestras se agitaron vigorosamente por 1 hora a 4°C y se centrifugaron a 10000g durante 20 minutos a 4°C y se colectaron los sobrenadantes para su uso (Sadowski, H. B.).

4.8 Inmunoblot.

La concentración de proteína de 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 8%. En algunos casos se corrieron equivalentes celulares. La proteínas se transfirieron a membranas de immobilon-P previamente humedecidas en metanol y enjuagadas con agua, o alternativamente membranas de nitrocelulosa de 0.22µm previamente humedecidas en solución amortiguadora de transferencia (Tris/HCl 0.025 M, glicina 0.192 M 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 10 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y 0.05% Tween 20) ó con albumina de suero bovino (del inglés BSA) al 5% en TBS-T. Posteriormente las membranas se incubaron con los anticuerpos correspondientes: anti-fosfo-CREB (dilución 1:2000) en BSA al 3% en TBS-T; anti-CREB (dilución 1:2000) en leche descremada al 5% en TBS-T. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario por 90 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar la membrana 4 veces con TBS-T, cinco minutos cada vez, se agregó el anticuerpo secundario adecuado acoplado a HRP (dilución 1:4000) en leche descremada al 5% en TBS-T ó en BSA al 3% en TBS-T. Finalmente se lavó la membrana cuatro veces con TBS-T, 5 minutos cada vez y se reveló por el método de quimioluminiscencia, siguiendo las instrucciones del fabricante (Western Lightning-ECL de Perkin-Elmer).

4.9 Análisis de proteínas fosforiladas en una sola célula por citómetro de flujo (Phosflow):

Después de estimular las células, se lavaron y se resuspendieron en solución de FACS (PBS 1X, NaN₃ 0.026% y SFB 2%, pH 7.4) buffer y se les adicionó paraformaldehído (PFA) a una concentración final de 1.5%, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, se lavaron y resuspendieron en un mililitro de metanol a 4°C y se incubaron por 20 minutos, se lavaron 3 veces con 3 ml de solución de FACS y se incubaron con 1ug/ml del anticuerpo anti-p-CREB S133 por 30 minutos a 4°C, después se lavaron 3 veces con 3 ml de solución de FACS y posteriormente se incubaron por 30 minutos a 4°C en oscuridad con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado al fluoroforo Alexa 488 diluido en FACS buffer en relación 1:1600, se lavaron 3 veces con 3 ml de solución de FACS y finalmente se resuspendieron en 500ul de solución de solución de FACS para su análisis por citometría de flujo.

5. Resultados

5.1 *Determinar si las señales de CD43 inducen la fosforilación de CREB.*

5.1.1 *Las señales de CD43 favorecen la fosforilación de CREB.*

Las moléculas accesorias juegan un papel fundamental en la activación del linfocito T ya que regulan positivamente las señales del TCR, controlando los niveles de activación de los linfocitos T. En ausencia de las señales proporcionadas por las distintas moléculas co-estimuladoras, los linfocitos T alcanzan un estado de menor respuesta funcional, también llamado estado de “anergia” (revisado en O’Shea & Nutman, 2001; Borde, et al., 2006; Kersh, 2007). Se sabe que la co-estimulación con CD28 incrementa la producción de IL-2 al mejorar la transcripción del gen de IL-2, esto a través de activar y reclutar al promotor diferentes factores de transcripción como NFAT, AP-1, NFκB y CREB (revisado en Crispín & Tsokos, 2009; Solomou, et al., 2001). CD43 es una molécula co-receptora de linfocitos T, cuyas señales son independientes a las señales de CD28 (Sperling, et al., 1995). Evidencias bioquímicas han demostrado que la proteína transmembranal CD43, como CD28, amplifica las señales del TCR y refuerza el reclutamiento de los factores de transcripción NFAT, AP-1 y NFκB al promotor de interleucina 2 (Santana, et al., 2000; Del Rio, et al., 2004). Sin embargo, se desconoce si las señales de CD43 pueden también inducir la fosforilación de CREB.

En un primer tiempo, para evaluar si las señales de CD43 inducen la fosforilación de CREB, se estimularon células Jurkat a través del TCR, CD43, TCR/CD43, TCR/CD28 o CD28 por 15 minutos a 37 °C, después de lo cual se midió por inmunoblot la fosforilación de CREB en la serina 133 a partir de lisados totales de las células. Esta serina promueve la asociación de CREB con CBP/p300 que posteriormente recluta RNAPolIII e inicia la transcripción del gen de IL-2 (revisado en Tenbrock, et al., 2003; Tenbrock, et al., 2006).

Las células se estimularon por 15 minutos, en base a resultados previos del laboratorio en los que las señales conjuntas del TCR y CD43 a nivel de ERK1/2 son más evidentes a ese tiempo (Fierro 2006, Pedraza-Alva, et al., 2011). Como se puede observar, las señales del TCR o de CD43 solas son suficientes para inducir la fosforilación de CREB, siendo esta mayor en respuesta a las señales del TCR que a las de CD43. Sin embargo, cuando las

señales del TCR se combinan con las de CD43, hay un sinergismo entre las señales de las dos moléculas y los niveles de fosforilación de CREB son mayores que para cada uno de los estímulos aislados. No obstante, el mayor nivel de fosforilación de CREB se obtiene cuando las células son estimuladas a través de CD28 y el TCR, aunque es notorio el hecho que, a diferencia de las señales de CD43, las señales de CD28 solas no inducen la fosforilación de CREB (Fig. 8A, panel superior).

Como control de activación de las células, evaluamos la fosforilación de las MAPKs ERK 1/2. Conforme a los datos previamente publicados (Pedraza-Alva, et al., 1998, Fierro, et al., 2006), encontramos que si bien a los 15 minutos de activación las señales de CD43 inducen solo un ligero incremento en la fosforilación de ERK en células Jurkat, cuando las señales de CD43 se combinan con las del TCR, se observa una fosforilación de ERK tan intensa como cuando las células son estimuladas a través del TCR/CD28 (Fig.8A panel inferior).

Por otro lado, en linfocitos T aislados de sangre periférica de donadores de banco de sangre, se observó que las señales conjuntas de CD43 y TCR inducen también la fosforilación de CREB en la S133, aunque no en un mayor nivel que el solo estímulo de TCR, comparado con linfocitos T sin estimular (Fig. 8B). En un ensayo paralelo con linfocitos T normales, en los que se evaluó la fosforilación de CREB en la serina 133 por citometría de flujo (Fig. 8C), se encontró que la fosofrilacion de CREB en la serina 133 aumenta tambien en respuesta a las señales del TCR, CD43, y que es mayor cuando las señales del TCR se combinan con las de CD43 o CD28.

En conjunto, estos resultados muestran que las señales de CD43 son capaces de inducir la fosforilacion de CREB, y que cuando se combinan con las señales del TCR hay un efecto sinérgico.

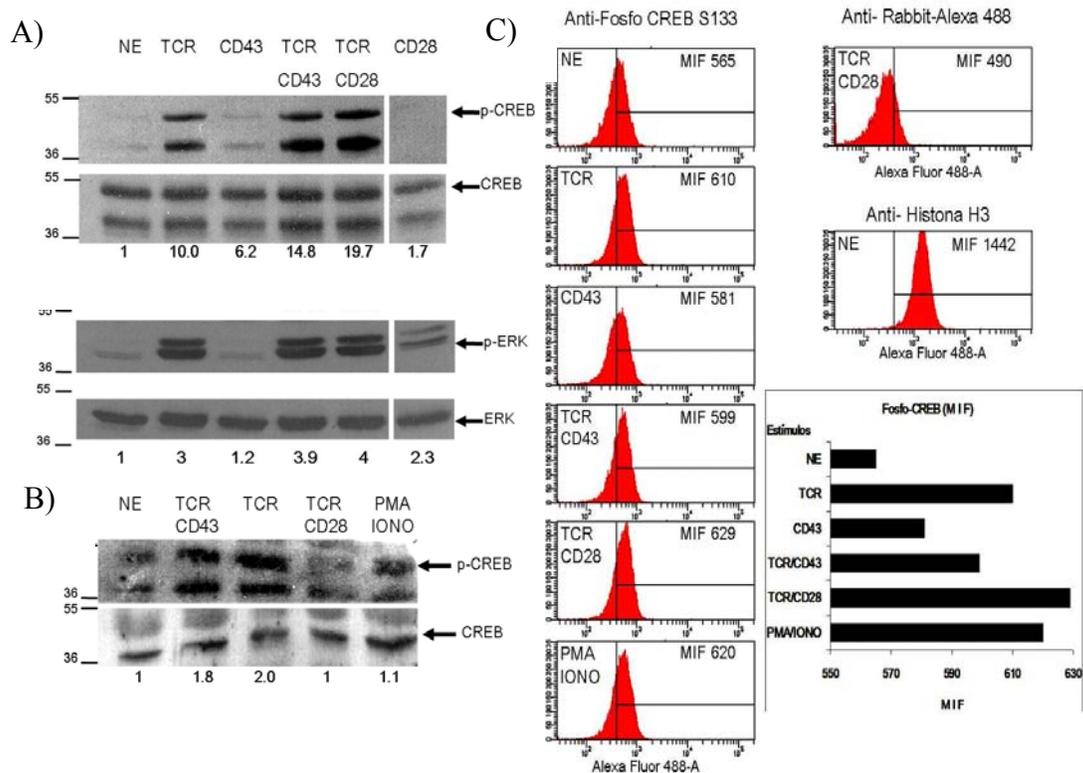


Figura 8. Las señales conjuntas de TCR y CD43 incrementan la fosforilación de CREB y ERK. **A)** Células Jurkat arrestadas toda la noche en medio RPMI sin SFB se estimularon a través de TCR (OKT3 4µg/ml) y/o CD43 (L10 4µg/ml) o CD28 (0.5µg/ml) durante 15 minutos. Se lisaron las células y se evaluó la fosforilación de CREB en la serina 133 y de ERK mediante inmunoblot. **B)** Linfocitos T incubados toda la noche en medio RPMI 2% SFB se estimularon a través de TCR (OKT3) y/o CD43 (L10) durante 15 minutos. Se evaluó la fosforilación de CREB en la serina 133 mediante inmunoblot, sobre lisados totales. Como control de carga se usó CREB. Los resultados mostrados son una muestra representativa de tres experimentos independientes. **C)** Linfocitos T incubados toda la noche en medio RPMI 2% SFB se estimularon a través de TCR (OKT3) y/o CD43 (L10) durante 15 minutos. Las células se fijaron y permeabilizaron y se evaluó la fosforilación de CREB en la serina 133 según el protocolo de Single-Cell Phospho-Protein Analysis by Flow Cytometry. Como controles de tinción se usaron células teñidas para la histona H3 y únicamente con anticuerpo secundario anti-Rabbit-alexa 488.

5.1.2 CD43 incrementa la fosforilación de CREB en concentraciones sub-óptimas de OKT3.

La calidad, cantidad y tiempo de la señal es importante para la respuesta funcional de un linfocito T ya que existe evidencia de que, cuando un linfocito T es estimulado en condiciones fisiológicas de TCR (bajas concentraciones) y a través de CD28 en concentraciones óptimas, el aumento en la respuesta del linfocito T se incrementa en dos

grados de magnitud o más (revisado en Crispin & Tsokos, 2009; Acuto & Michel, 2003; Borde, et al., 2006). De igual forma, en el laboratorio se ha demostrado que linfocitos T estimulados con concentraciones sub-óptimas de TCR y óptimas de CD43 presentan una mayor fosforilación de la cinasa ERK, así como mayor unión de los factores de transcripción AP-1 y NFAT al promotor de IL-2, en comparación con linfocitos T estimulados a través de TCR y CD43 en concentraciones óptimas (Santana, et al., 2000; Pedraza-Alva, et al., 2011).

En base a estos antecedentes, evaluamos la fosforilación de CREB en la serina 133 en linfocitos T expuestos durante 15 minutos a distintas concentraciones del anticuerpo OKT3 (anti-TCR) solo o en combinación con concentraciones saturantes del anticuerpo anti-CD43 (anti-L10). Los resultados obtenidos indican que, las señales del TCR inducen la fosforilación de CREB de una manera dosis-dependiente. Cuando las señales del TCR se combinan con las de CD43, hay un sinergismo a nivel de la fosforilación de CREB entre las señales de CD43 y las de TCR cuando las células son activadas con cantidades menores del anticuerpo OKT3. No obstante, este sinergismo parece perderse en cuanto aumentan la intensidad de las señales del TCR (Fig. 9), y es consistente con los datos mostrados en la figura anterior.

Estos resultados demuestran que, cuando se activa un pequeño número de moléculas del TCR (OKT3 0.1ug/ml), y lo cual se considera más cercano a las condiciones fisiológicas de activación de un linfocito T, las señales de CD43 son capaces de incrementar la fosforilación de CREB en la serina 133 comparado con el solo estímulo de OKT3, demostrando la función de CD43 como molécula accesoria para reforzar e incrementar las señales del TCR, mejorando la respuesta funcional del linfocito T. Sin embargo, cuando el número de moléculas del TCR comprometidas es elevado (concentraciones de OKT3 > 500 ng/ml), lo cual podría semejar una condición anergizante, las señales de CD43 no incrementan la fosforilación de CREB, sino más bien la disminuyen ligeramente. Estos resultados sugieren un papel dual de CD43, que favorece positivamente o negativamente la fosforilación de CREB dependiendo del número de TCRs involucrados.

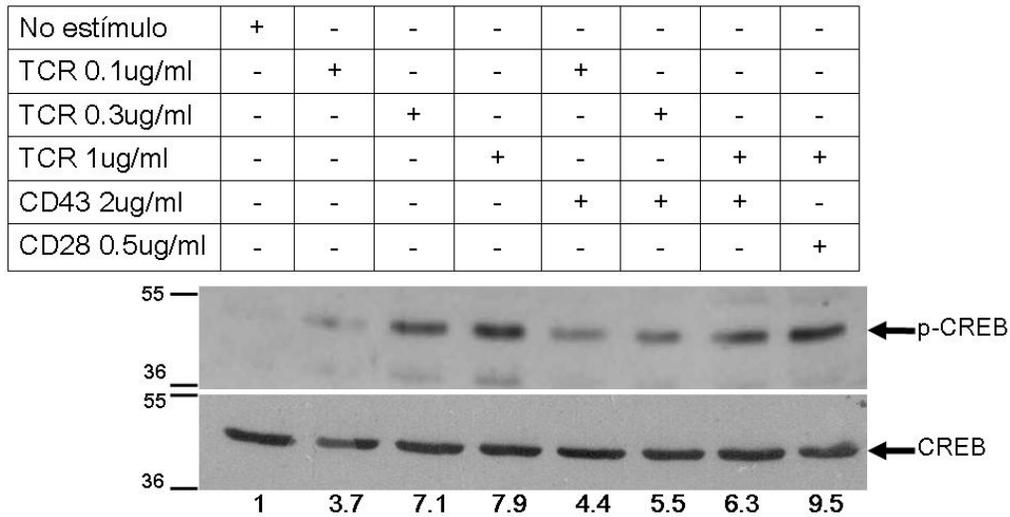


Figura 9. Las señales de CD43 favorecen el incremento en la fosforilación de CREB cuando las células son estimuladas con concentraciones sub-óptimas de OKT3. Linfocitos T arrestados toda la noche en medio RPMI 2% SFB se estimularon a través de TCR (OKT3) y/o CD43 (L10) a las concentraciones indicadas durante 15 minutos. Se obtuvieron los extractos totales y se evaluó la fosforilación de CREB en la serina 133 mediante inmunoblot. Como control de carga se usó CREB.

5.1.3 El solo estímulo de CD43 fosforila a CREB en la serina 133 y 129.

La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones post-traduccionales más frecuente en las células eucariotas y se ha postulado que ocurren en una forma jerárquica; en este proceso participan cinasas “primarias” que brindan las condiciones estéricas necesarias para el efecto de una cinasa “secundaria” (Fiol, et al., 1994; Roach, 1991; fiol, et al., 1990). En un principio, se pensaba que la fosforilación de CREB en la serina 133 por PKA era necesaria y suficiente para la actividad transcripcional inducida por AMPc. Después, se demostró que la fosforilación de CREB en la S-133 por PKA genera un sitio de fosforilación en la S-129 de CREB por GSK-3, lo que incrementa la estabilidad y la función de CREB en la transcripción de genes blanco de AMPc (Fiol, et al., 1994; Tyson, et al., 2002). Para investigar la posibilidad de que las señales de CD43 además de fosforilar a CREB en la S-133 (Fig. 8) pudieran hacerlo en la S-129, se estimularon linfocitos T a través de diferentes estímulos por 10 min, después de lo cual se obtuvieron los extractos nucleares y se evaluó la fosforilación de CREB en la serina 133 y 129 por inmunoblot, con

anticuerpos que reconocen específicamente a cada una de estas serinas fosforiladas.

Como control de purificación de la técnica de obtención de núcleos se evaluó la presencia de SP1, un factor de transcripción que se encuentra constitutivamente en el núcleo, en la fracción nuclear y de CD43, en la fracción citoplásmica (Tan & Khachigian, 2009; Parkman, et al., 1981). Los resultados obtenidos mostraron que, conforme a lo reportado, CREB se fosforila en la serina 133 en respuesta a las señales del TCR (Gupta & Terhorst, 1994; Muthusamy & Leiden, 1998; Solomou, et al., 2001; Grady, et al., 2004; Kaiser, et al., 2007), y conforme a los resultados que mostramos en las figuras anteriores, en respuesta a a las señales de CD43, TCR/CD43 y CD28/TCR (Fig. 10A).

De manera interesante, encontramos que CREB también se fosforila en la serina 129 (Fig. 10B) en respuesta a las señales de CD43, el TCR y TCR/CD43, pero no en respuesta a las señales de TCR/CD28 ni de PMA/IONO (Fig. 10B), lo que apunta a que la fosforilación de esta serina no depende de PKC o Ca^{2+} . Se observaron niveles protéicos similares de CD43 y SP1 respectivamente.

En conjunto, los resultados muestran que la señal de CD43 a los 10 minutos es suficiente para inducir la fosforilación de CREB en la S133 y en la serina 129. Así mismo, mostramos que las funciones co-estimuladoras de CD43 sobre las señales del TCR son más conspicuas cuando el número de moléculas del TCR involucrado en la respuesta celular es pequeño, y que conforme este aumenta, la sinergia entre las señales del TCR y de CD43 tiende a perderse.

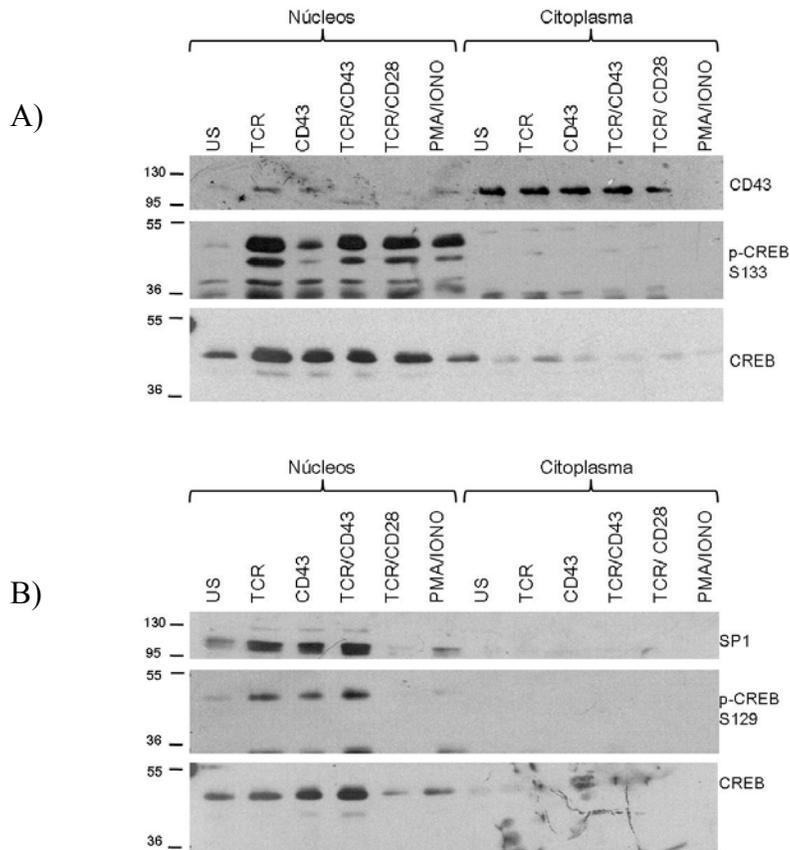


Figura 10. Las señales coestimuladoras de CD43 fosforilan CREB en la serina 133 y 129. Linfocitos T arrestados toda la noche en medio RPMI 2% SFB se estimularon a través de TCR (OKT3) y/o CD43 (L10), CD28 o bien con PMA (20ng/ml)/Iono (1ug/ml) durante 10 minutos. Se obtuvieron los extractos nucleares y citoplasmáticos y se evaluó la fosforilación de CREB en la serina 133 y 129 mediante inmunoblot con anticuerpos que reconocen específicamente estas serinas fosforiladas. Como controles de carga se usó CD43, SP1 y CREB.

5.2 Establecer un modelo de anergia en células Jurkat.

Si bien los resultados mostrados en las figuras anteriores indican que las señales de CD43 inducen la fosforilación de CREB, quisimos montar un modelo experimental en el que pudiéramos valorar la capacidad de CD43 de complementar las señales del TCR. Para ello, nos orientamos hacia un modelo de anergia, con la idea de evaluar si las señales de CD43 serían suficientes para rescatar o prevenir el establecimiento de un estado de anergia.

Lo primero fue estandarizar el modelo de anergia con ionomicina en células Jurkat (Howe, et al., 2003). En este modelo, las altas concentraciones de ionomicina inducen flujos constantes de calcio que se traducen por una actividad incrementada de calcineurina, y

mayor translocación al núcleo de distintos miembros de la familia de NFAT, en particular NFAT1. En ausencia de AP1, NFAT induce un programa genético que conduce a los linfocitos al estado de anergia. En particular, las señales sostenidas de calcio dan lugar a fuertes incrementos en los niveles de RNA y de proteínas de ubiquitin ligasas tales como Itch, CblB y Grail que participan en la degradación de proteínas clave de la señalización que lleva a activación de linfocitos T: PKC ζ y PLC ζ 1, siendo el efecto principal la inestabilidad de la sinapsis inmunológica. (Heissmeyer, et al., 2005). En este modelo no se ha probado la participación de CREB.

Se ha reportado que una disminución en la fosforilación de ERK, en respuesta a las señales de TCR en ausencia de moléculas co-estimuladoras o en respuesta a flujos de calcio por la adición de ionomicina, correlaciona con la inducción de anergia, y que el estado de anergia es solo revertido por el estímulo con PMA, el cual induce una fuerte activación de ERK (Howe, et al., 2003). Para estandarizar la técnica, las células Jurkat se incubaron por 16, 18 ó 24 horas con ionomicina a diferentes concentraciones (0.5 μ M ó 1 μ M) y posteriormente se estimularon a través de PMA por 5, 10, 15 ó 30 minutos, después de lo cual se obtuvieron los extractos totales y se evaluaron los niveles de fosforilación de ERK por inmunoblot. En base a los resultados obtenidos, establecimos que la mejor condición para la inducción de anergia medida por la disminución de la fosforilación de ERK, es ionomicina 0.5 μ M durante 18 hrs y posteriormente activación por 15 minutos con PMA.

El siguiente paso fue evaluar la capacidad de CD43 de inferir sobre el establecimiento del estado de anergia en células Jurkat, para lo cual las células se estimularon en presencia o ausencia de ionomicina 0.5 μ M por 18 hrs (Fig. 11), después de lo cual fueron sometidas al estímulo de PMA, TCR, CD43 o TCR/CD43 por 15 minutos, y se evaluó la fosforilación de ERK por inmunoblot a partir de los lisados totales de las células. Los resultados indican que, en células Jurkat tratadas con ionomicina, no se detecta pERK, y que la fosforilación de ERK no se recupera en células estimuladas a través de TCR o CD43. No obstante el estímulo conjunto de CD43/TCR en células tratadas con ionomicina induce un ligero incremento en los niveles de fosforilación de ERK comparado con las células que solo fueron tratadas con ionomicina o bien ionomicina y activadas con el TCR o CD43 de manera individual. La fosforilación de ERK se recuperó al estimular con PMA en las células tratadas con ionomicina. Al comparar las células tratadas con ionomicina contra las

no tratadas observamos que, las células tratadas con ionomicina mostraron una fosforilación de ERK menor comparadas con las células sin ionomicina independiente de los estímulos recibidos.

En conjunto, estos resultados muestran que se lograron establecer las condiciones necesarias para inducir un estado de anergia en células Jurkat.

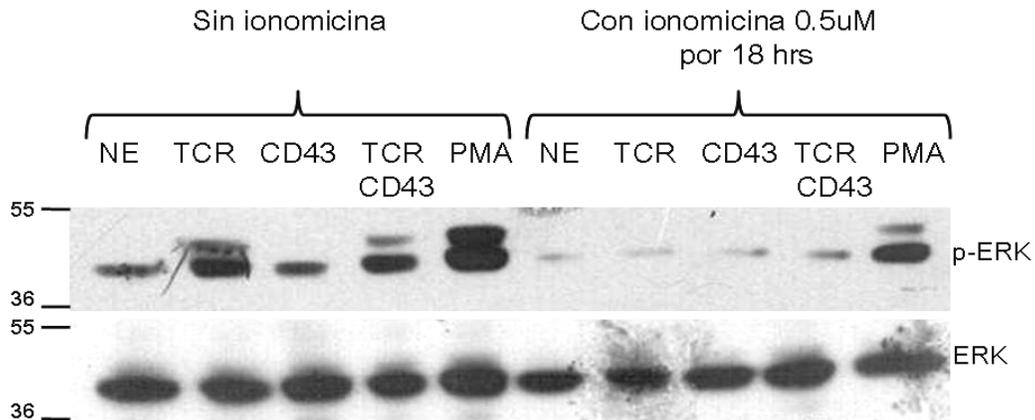


Figura 11. Las señales de TCR y/o CD43 no rescatan la pérdida de la fosforilación de ERK observada en células anérgicas por el modelo de ionomicina. Células Jurkat arrestadas toda la noche en medio RPMI sin SFB se indujeron a anergia adicionando 0.5 μ M de ionomicina por 18 Hrs a una atmosfera de 5% de CO₂ y 37°C en RPMI10%, después se estimularon a través de TCR (OKT3) y/o CD43 (L10) durante 15 minutos. Se obtuvieron los extractos totales y se evaluó la fosforilación de ERK mediante inmunoblot. Los resultados mostrados son una muestra representativa de tres experimentos independientes.

5.3 Determinar si las señales de CD43 previenen o rescatan un estado de anergia.

El hecho de que CD43 activa cascadas de señalización que inducen la producción de IL-2, sugiere que CD43 es una molécula que previene el estado de anergia (Fierro et al., 2006). Una vez montado el modelo de anergia en células Jurkat, nos preguntamos si las señales de CD43 pueden prevenir las señales anergizantes inducidas por ionomicina. Para esto, las células se incubaron en presencia de ionomicina y anticuerpos anti-CD43 [o con inmunoglobulinas de ratón de la misma subclase (IgG1) como control de isotipo] por 18 hrs. Posteriormente las células se lavaron para quitar el exceso de ionomicina y se estimularon a través del TCR durante 15 minutos; los niveles de fosforilación de ERK se evaluaron por inmunoblot a partir de los extractos totales.

De manera interesante encontramos que si las señales de CD43 se aplican al mismo tiempo

que las de ionomicina por 18 hrs, y las células son activadas posteriormente a través del TCR, los niveles de pERK son comparables a los de células solo activadas con CD43 y luego por el TCR, y sin ionomicina y mucho mas que cuando las células solo son estimuladas a través del TCR, con y sin ionomicina. El rescate en la fosforilación de ERK observado por el estímulo con CD43 por 18 hrs es efecto de las señales de CD43 ya que cuando se incubó con el control de isotipo los niveles de fosforilación de ERK son muy similares a las células incubadas con ionomicina y activadas a través de TCR (Fig. 12), sugiriendo que las señales mediadas por CD43 restauran las condiciones para una elevada fosforilación de ERK y que son bloqueadas por las señales de ionomicina.

Además, estos resultados arrojan otro dato importante, cuando las células Jurkat son incubadas con anticuerpo anti-CD43 por 18 hrs. en ausencia de ionomicina, y son posteriormente, activadas a través del TCR, presentan niveles de fosforilación de ERK considerablemente elevados, comparados con las células activadas a través de solo TCR, de esta manera, cuando las señales de CD43 anteceden a las del TCR, estas inducen una fosforilación incrementada de ERK, lo que proporciona evidencia de que las señales de CD43 participan de manera importante en incrementar las señales del TCR para aumentar la respuesta funcional del linfocito T (Fig. 12).

En conjunto, estos resultados sugieren que las señales de CD43 pueden prevenir la inducción de un estado de anergia al rescatar los niveles de fosforilación de ERK. Además, sugiere que las señales de CD43 pueden potenciar la respuesta de las células Jurkat si son recibidas antes de que se estimulen para el TCR.

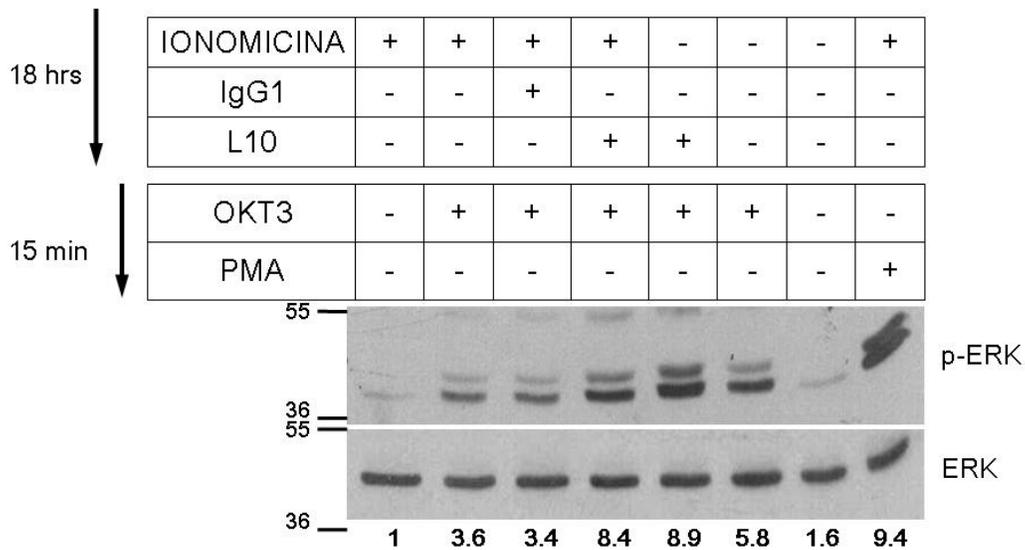


Figura 12. Las señales de CD43 durante la inducción de anergia por ionomicina en células Jurkat previene la pérdida de la fosforilación de ERK. Células Jurkat arrestadas toda la noche en medio RPMI sin SFB se indujeron a anergia adicionando 0.5 μ M de ionomicina por 18 hrs. a una atmosfera de 5% de CO_2 y 37°C en RPMI 10% SFB, simultáneamente se estimuló para CD43; después de las 18 hrs. las células se activaron a través de TCR (OKT3) durante 15 minutos. Se obtuvieron los extractos totales y se evaluó la fosforilación de ERK mediante inmunoblot. Los resultados mostrados son una muestra representativa de tres experimentos independientes.

6. Discusión y Conclusión

La activación de linfocitos T requiere de señales conjuntas del TCR y moléculas co-estimuladoras (revisado en Kersh, 2007). CD43 es una glicoproteína transmembranal con un dominio extracelular alargado, a través del cual se ha propuesto que la célula podría establecer las primeras interacciones con las APC y que por tanto modula la respuesta del linfocitos T (revisado en Bravo-Adame, et al., 2012). Se ha demostrado que, la activación a través de CD43 y TCR, a diferencia de la activación a través del TCR solo, promueve la proliferación celular al inducir un incremento en la transcripción del gen de IL-2 (Fierro, et al., 2006). La transcripción del gen de IL-2 requiere de la activación de diversos factores de transcripción como NFAT, AP-1, NFkB y CREB, los cuales se han demostrado se activan a través de CD28 y TCR (Crispín & Tsokos, 2009). Las señales de CD43 inducen la activación de los factores de transcripción NFAT, AP-1 y NFkB (Santana, et al., 2000); sin embargo, se desconoce si las señales de CD43 activan al factor de transcripción CREB.

6.1 CD43 induce la fosforilación de CREB en S-133 y S-129.

CREB es un factor de transcripción indispensable para la transcripción del gen de IL-2. El nivel de fosforilación de CREB para inducir su activación en la transcripción de genes aun es controversial, ya que primero se determinó que la fosforilación en la S133 de CREB por PKA es esencial y suficiente para inducir la transcripción de genes (Gonzalez & Montminy, 1989). Sin embargo, otros estudios demostraron que la fosforilación de CREB S133 por PKA no es suficiente para su activación, pues la delección de la serina 129, considerada como un sitio de fosforilación secundario de CREB, afectó la actividad transcripcional de CREB (Fiol, et al., 1994). De tal modo que se ha propuesto que la fosforilación de la S133 por PKA causa un cambio conformacional en CREB permitiendo que la cinasa GSK-3 fosforile a CREB en la serina 129, induciendo una activación “completa” de CREB (revisado en Montminy, 1997). En linfocitos T, la fosforilación completa de CREB resultante de un estímulo conjunto del TCR y CD28 permite el reclutamiento de CBP/p300, p300 acetila la histona dejando a la cromatina en un estado de eucromatina y permitiendo el reclutamiento y asociación de RNAPolIII con CBP y mejorando la transcripción del gen de IL-2 (revisado en Mayr & Montminy, 2001, Tenbrock, et al., 2003; Tenbrock, et al., 2006).

Si bien existen evidencias de que las señales de CD43 son capaces de activar diversos factores de transcripción como NFAT, AP-1, NFκB (Santana, et al., 2000), no existían evidencias de si las señales de CD43 eran capaces de inducir la fosforilación de CREB. Aquí demostramos que las señales de CD43 por si solas inducen la fosforilación del factor de transcripción CREB en las serinas 133 y 129, y sugiere que en conjunto con los demás factores de transcripción activados también por las señales de CD43, podrían mejorar la transcripción del gen de IL-2.

Además, los resultados obtenidos muestran que las señales de CD43 en conjunto con las del TCR sinergizan para incrementar la fosforilación de CREB en ambas serinas tanto la 133 como la 129 comparado con la fosforilación inducida por el estímulo de CD43 o TCR solo, lo que pone en evidencia el papel de CD43 como una molécula co-estimuladora y que sinergiza con las señales del TCR al inducir una activación completa de CREB. Este efecto de CD43 como molécula co-estimuladora ha sido reportado anteriormente, ya que la activación a través de CD43 y TCR incrementa (comparado con células activadas a través de TCR solo) la fosforilación de ERK lo cual activa a los factores de transcripción AP-1 y NFκB, induciendo la expresión de IL-2 y aumentando la proliferación, indicando un estado de mayor activación del linfocito T (Pedraza-Alva, et al., 1998; Fierro, et al., 2006; Pedraza-Alva, et al., 2011). Nuestros resultados demuestran que CD43 participa en incrementar la activación de las células T al aumentar la fosforilación de ERK cuando se estimulan a través de CD43 y TCR.

En conjunto, estos resultados muestran que las señales de CD43 solas o en combinación con las del TCR inducen la fosforilación de CREB tanto en la S133 como en la S129. Las señales de CD43 sinergizan con las del TCR y pueden integrar diversas vías de señalización para fosforilar a CREB en ambas serinas, induciendo activación completa de CREB. En base a la literatura, se podría proponer que CD43 activa a PKC ζ (Del Río, et al., 2004) y esta a su vez activa a la adenilato ciclasa (AC), la cual hidroliza al ATP en AMPc induciendo la activación de PKA lo que resulta en la fosforilación de CREB en la serina 133, esto induciría un cambio conformacional dando lugar a la fosforilación de la S129, de la misma manera, PKA o PKC puede fosforilar a GSK-3 en la tirosina 216 lo que induce su activación (Peineau, et al., 2008) y posteriormente GSK-3 fosforila a CREB en la serina 129. Sin embargo, es importante remarcar que nuestros resultados son aun preliminares en

el sentido de que no podemos discernir si las vías de señalización que llevan a la activación de CREB a partir de CD43 son las mismas que las del TCR, y tampoco realizamos experimentos que nos permitieran saber cuales son. Para ello, habremos de realizar experimentos adicionales con inhibidores específicos y/o mutantes de distintas moléculas intracelulares reportadas como participantes en la activación de CREB en células linfoides.

6.2 CD43 incrementa la fosforilación de CREB en concentraciones sub-óptimas de TCR.

Un aspecto importante en la activación de células T es el reconocimiento del ligando en la APC, que puede llevar a una respuesta inmunológica completa o entrar a un estado de menor respuesta funcional, dependiendo de la intensidad, cantidad y duración en que sea recibida la señal (Rubio, et al., 2010). Se ha demostrado que se requiere de la interacción de diez moléculas del TCR con su respectivo ligando para la formación de una estable sinapsis inmunológica, considerando así una condición fisiológica (revisado en Guy & Vignali, 2009).

De este modo, células estimuladas a través de TCR en concentraciones sub-óptimas y óptimas de CD28 incrementa la respuesta funcional del linfocito T hasta en 2 grados de magnitud (revisado en Acuto & Michel, 2003). Nuestros datos muestran que la intensidad de la fosforilación de CREB se incrementó considerablemente cuando las células se estimularon en concentraciones saturantes de CD43 y sub-óptimas de TCR. Este resultado es congruente con otros datos del laboratorio, en donde linfocitos T que se estimularon en concentraciones sub-óptimas de TCR y saturantes de CD43 (en comparación con concentraciones óptimas de TCR y CD43) presentaron una fosforilación mas intensa de la cinasa ERK así como un mayor reclutamiento de los factores de transcripción AP-1 y NFAT al promotor de IL-2 que las células que solo recibieron la misma estimulación a través del TCR, resultando en un incremento de la respuesta del linfocito T (Santana, et al., 2000; Pedraza-Alva, et al., 2011). De manera interesante, cuando el numero de moléculas del TCR comprometidas es alto (concentraciones de OKT3 elevadas), lo cual podria semejar una condición anergizante, las señales de CD43 no incrementan la fosforilación de CREB, sino mas bien la disminuyen ligeramente. Alternativamente, se puede pensar que en condiciones de una elevada interacción de moléculas de TCR con su ligando, esta

interacción pudiera compensar en parte o totalmente las señales de CD43 y por tanto ya no es posible observar el efecto de la molécula co-estimuladora CD43 sobre la fosforilación de CREB; esto ha sido demostrado en un modelo cuantitativo donde, linfocitos T que se estimularon a través de concentraciones óptimas de TCR compensaron parcialmente o totalmente la carencia de co-estimulación a través de CD28 (Acuto & Michel, 2003).

En conjunto estos resultados demuestran que en condiciones fisiológicas las señales de CD43 incrementan y sinergizan con las señales del TCR, aumentando la fosforilación de CREB y que esto podría participar en aumentar la respuesta funcional del linfocito T al mejorar la transcripción de genes.

6.3 CD43 previene la entrada a un menor estado de respuesta funcional.

La anergia es un mecanismo de tolerancia periférica que resulta en un estado de menor respuesta funcional de los linfocitos T auto-reactivos para limitar la auto-inmunidad (Bandyopadhyay, Soto-Nieves & Macián, 2007). Diferentes modelos se han descrito para inducir este estado de menor respuesta funcional, entre ellos el tratamiento con el ionoforo de calcio ionomicina. Estos modelos tienen en común la activación de la vía de señalización por calcio y una ausencia o menor activación de las otras vías de señalización, lo que induce la expresión de un conjunto de genes dependientes de calcio; mas aún, los experimentos realizados en presencia de ciclohexamina (inhibidor de síntesis de proteínas) no inducen anergia (Bandyopadhyay, Soto-Nieves & Macián, 2007; Srinivasan & Frauwirth, 2007), indicando que la síntesis de proteínas es necesaria para la inducción de anergia.

La vía de señalización en células anérgicas aun no ha sido del todo descrita, sin embargo se sabe que el aumento de calcio activa a calmodulina, la cual activa a la fosfatasa calcineurina que defosforila a NFAT y permite su translocación al núcleo y en ausencia de otros factores de transcripción como AP-1, se permite la transcripción de genes como DGK la cual es una cinasa que inhibe la activación de Ras y por lo tanto la vía de ERK; también, se transcriben factores de transcripción como Egr2, Egr3, Ikaros y CREM que remodelan la cromatina a un estado menos accesible (heterocromatina) suprimiendo la transcripción del gen de IL-2 (Wells, 2009).

En particular, en el modelo de anergia por ionomicina además de inducir la vía de señalización previamente descrita, no se activan otras vías de señalización ya que no hay moléculas de TCR ni co-estimuladoras que participen; en este modelo una pérdida o disminución en la fosforilación de ERK indica un estado de menor respuesta funcional del linfocito T (Baine, Abe & Macian, 2009). Nuestros resultados demuestran que las células se indujeron a un estado de menor respuesta funcional debido a que la fosforilación de ERK se abatió cuando se trataron las células con ionomicina por 18 horas, lo cual concuerda con datos publicados anteriormente (Howe, et al., 2003). Por otro lado, Howe en su trabajo del 2003 también demostró que las células pueden recuperar el nivel de fosforilación de ERK al ser estimuladas a través de PMA, siendo este un estímulo de rescate de anergia. Con estos antecedentes, nosotros demostramos que cuando las células son inducidas a anergia y después estimuladas con PMA los niveles de fosforilación de ERK se recuperan, demostrando que el modelo de anergia se reprodujo exitosamente.

La posibilidad de que las señales de CD43 prevengan el estado de anergia ha sido considerada anteriormente ya que las señales co-estimuladoras de CD43 activan cascadas de señalización que inducen la producción de IL-2, y que estas señales parecen prevenir el estado de anergia inducido por las señales del TCR (Fierro et al., 2006). Observamos que una vez que las células han sido inducidas a anergia con el modelo de ionomicina, el estímulo independiente a través de TCR o CD43, no es suficiente para recuperar los niveles de fosforilación de ERK resultantes de la inducción de anergia. Esto sugiere que una vez que se ha iniciado con el programa de anergia, las señales de CD43 o TCR no son capaces de contrarrestar este efecto. Esto podría deberse a que durante las 18hrs de inducción a anergia con ionomicina ya se expresaron proteínas que conducen al linfocito T a un estado de anergia el cual puede ser revertido únicamente por adición de IL-2 o PMA (Heissmeyer, et al., 2005).

De manera interesante encontramos que si las células perciben las señales de CD43 al mismo tiempo que las de ionomicina durante 18 hrs, en las células que se activan posteriormente a través del TCR, los niveles de pERK parecen restaurarse a niveles comparables de células que solo se activan con CD43 y luego por el TCR, y sin ionomicina. También parece importante recalcar que en estas células los niveles de p-ERK son mucho más elevados que en las células estimuladas solo a través del TCR, con y sin ionomicina.

El rescate en la fosforilación de ERK observado por el estímulo con CD43 por 18 hrs es efecto de las señales de CD43 ya que cuando se incubó con el control de isotipo los niveles de fosforilación de ERK son muy similares a las células incubadas con ionomicina y activadas a través de TCR, sugiriendo que las señales mediadas por CD43 restauran vías de señalización que inciden sobre la intensidad (y probablemente duración) de la señal derivada de ERK, contrarrestando las señales energizantes de la ionomicina. Estos resultados son consistentes con antecedentes del laboratorio que muestran que cuando a las señales anergizantes del TCR anteceden las de CD43 por no más de 30 minutos, los LT presentan un incremento en la fosforilación de ERK1/2, son capaces de producir IL-2 y por lo tanto de proliferar (Fierro, et al., 2006). La duración e intensidad de la activación de ERK regula la proliferación y diferenciación del linfocito T al inducir la transcripción de genes (revisado en McKay & Morrison, 2007). Así, las señales de CD43 podrían prevenir que el linfocito T entrara a un estado de menor respuesta funcional.

Estos resultados son alentadores, pero una vez mas son necesarios experimentos adicionales que permitan identificar las señales de CD43 que contrarrestan las señales energizantes de la ionomicina.

En conclusión, este trabajo presenta evidencia de que las señales de CD43 incrementa la fosforilación de la cinasa ERK en condiciones normales de activación y que también induce la fosforilación de CREB en la S133 y S129, demostrando un papel importante de las señales de CD43 para la activación del linfocito T. Así, las señales de CD43 podrían prevenir que el linfocito T entrara a un estado de menor respuesta funcional, proporcionando un circuito de retro-alimentación positiva al inducir una fosforilación sostenida de ERK, esto mediante inhibir la función de la fosfatasa SHP-1 sobre Lck, manteniendo así la fosforilación de ERK por más tiempo que el solo estímulo a través de TCR (Fierro, et al., 2006). En conjunto, estos datos sugieren que al rescatar la fosforilación de ERK en el modelo de anergia, las señales de CD43 podrían participar en inducir un programa de activación del linfocito T, en lugar de favorecer la expresión de proteínas que inducen a anergia. Nuestros resultados muestran que las señales de CD43 inducen la fosforilación de CREB en la serina 133 y 129, lo que sugiere una activación completa de CREB al integrar diversas vías de señalización posiblemente PKA y GSK-3 y que puede

participar en la transcripción del gen de IL-2. También, observamos que si las señales de CD43 son recibidas durante la inducción de anergia en un modelo de ionomicina, el cual se estableció en este trabajo, los niveles de fosforilación de ERK se recuperan, los cuales se abaten en anergia.

En conjunto, los datos de este trabajo demuestran el papel de CD43 como una molécula co-estimuladora, de señales independientes a las del TCR y que sinergiza con ellas para aumentar la respuesta del linfocito T, todo esto sugiere la importancia de CD43 como una molécula clave para la prevención un estado de anergia.

7. Perspectivas

En Células Jurkat

- Realizar ensayos de inmunoblot en células Jurkat bajo y sin el modelo de anergia incubadas con inhibidores de la vía de PKC ζ , CamKIV, AMPK, PKA, CSK, etc. para determinar si estas vías están involucradas en la fosforilación de CREB por las señales co-estimuladoras de CD43.
- Cuantificar IL-2 en células J22 sin inducir e inducidas a anergia.
- En células J22 normales y anérgicas montar el experimento de ChIP de CREB/CREM para determinar si de manera in vivo y en ambos modelos se encuentran unidos al promotor de IL-2 y si varían bajo el estímulo de CD43.

En Linfocitos T

- Montar el modelo de anergia a través del estímulo para TCR en elevadas concentraciones en linfocitos T humanos y realizar ensayos de proliferación y de cuantificación de IL-2.
- Medir presencia o ausencia de CREB/CREM por ChIP bajo el estímulo de CD43 en LyT.

8. Bibliografía

- Acuto O. & Michel F., 2003. CD28-Mediated Co-Stimulation: A Quantitative Support for TCR Signaling. *Nature Reviews Immunology*. 3., pp.939-951
- Aguilar-Delfin, I. A., Fierro, N. A., Rosenstein, Y., 2006. CD43, UCSD-Nature.
- Baine I., Abe B. T., & Macian F., 2009. Regulation of T-Cell Tolerance by Calcium/NFAT Signaling. *Immunological Reviews*. 231. pp., 225-240.
- Balagopalan L., Coussens N. P., Sherman E., Samelson L. E., y Sommers C. L., 2010. The LAT Story: A Tale of Cooperativity, Coordination, and Choreography. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi: 10.1101/cshperspect.a005512.
- Bandyopadhyay S., Soto-Nieves N., & Macian F., 2007. Transcriptional Regulation of T Cell Tolerance. *Seminars in Immunology*. ELSEIVER. 19. pp., 180-187.
- Borde M., Barrington R. A., Heissmeyer V., Carrol M. C., Rao A., 2006. Transcriptional basis of lymphocyte tolerance. *Immunological Reviews*. 210. pp., 105-119.
- Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 7 (72). pp., 248-254.
- Bravo-Adame M. E., Sandoval-Hernandez M. A., Migueles-Lozano O. A. Y Rosenstein Y., 2011. CD43. Springer Science. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. DOI 10.1007/978-1-4419-0461-4.
- Carlezon, W. A. Jr., Duman, R. S., & Nestler, E. J., 2005. The many faces of CREB. *Trends in Neurosciences*, 28 (8), pp.436-445.
- Carlsson, S. R., & Fukuda, M., 1986. Isolation and characterization of leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 261 (27), pp. 12779-12786.
- Crispín J. C. & Tsokos G. C., 2009. Transcriptional regulation of IL-2 in health and autoimmunity. *Autoimmun Rev.*, 8(3), pp.190-195.
- Cruz-Muñoz M. E., Salas-Vidal E., Salaiza-Suazo N., Becker I., Pedraza-Alva G. Y Rosenstein Y., 2003. The CD43 Coreceptor Molecule Recruits the ζ -Chain as Part of Its Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*. 171., pp.1901-1908.
- Chaplin D. D., 2010. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 125 (2), pp. S3-23.
- Choi S. & Schwartz R. H., 2007. Molecular Mechanisms for Adaptive Tolerance and Other T Cell Anergy Models. *Semin Immunol*. 19(3), pp.140-152.
- Daniel P. B., Walker W. H., Y Habener J. F., 1998. Cyclic AMP Signaling and Gene Regulation. *Annu. Rev. Nutr.* 18., pp.353-83.
- De Cesare D., Fimia G. M. Y Sassone-Corsi P., 1999. Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *TIBS from Elsevier Science.*, pp.281-285.
- Del Rio R., Rincón M., Layseca-Espinosa E., Fierro N. A., Rosenstein Y., Pedraza-Alva G., 2004. PKC θ is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 325., pp.133-143.
- Elliot M. R., Tolnay M., Tsocos G. C., Kammer, G. M., 2003. Protein Kinase A Regulatory Subunit Type II beta Directly Interacts with and Suppresses CREB Transcriptional Activity in Activated T Cells. *The Journal of Immunology*. 171. pp., 3636-3644.
- Fehr T., Lucas C. L., Kurtz J., Onoe T., Zhao G., Hogan T., Vallot C., Rao A. Y Sykes M., 2010. ACD8 T cell-intrinsic role for the calcineurin-NFAT pathway for tolerance induction in vivo. *BLOOD*. 115 (6), pp.1280-1287.
- Fierro, N. A., Pedraza-Alva, G., & Rosenstein Y., 2006. TCR-Dependent cell response is modulated by the timing of CD43 engagement. *The Journal of Immunology*, 176, pp. 7346-7353.
- Fiol C. J., Wang A., Roeske R. W., Roach P. J., 1990. Ordered Multisite Protein Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 265 (11), pp. 6061-6065.

- Fiol C. J., Williams J. S., Chou Chin-Hua., Wang Q. M., Roach P. J., Andrisani O. M., 1994. A Secondary Phosphorylation of CREB³⁴¹ at Ser¹²⁹ Is Required for the cAMP-mediated Control of Gene Expression. A Role for Glycogen Synthase Kinase-3 in the Control of Gene Expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 269 (51), pp. 32187-32193.
- Freitas A. A. & Rocha B., 2000. Population Biology of Lymphocytes: The flight for survival, *Annu. Rev. Immunol.*, 18, pp. 83–111.
- Gerondakis S. & Siebenlist U., 2010. Roles of the NF-κB Pathway in Lymphocyte Development and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2:a000182.
- Gonzalez G. A. & Montminy M. R., 1989. Cyclic AMP Stimulates Somatostatin Gene Transcription by Phosphorylation of CREB at Serine 133. *Cell*. 59. pp., 675-680.
- Grady, G. C., Mason, S.M., Stephen, J., Zuniga-Pflucker, J. C. and Michie, A. M., 2004. Cyclic adenosine 5'-monophosphate response element binding protein plays a central role in mediating proliferation and differentiation downstream of the pre-TCR complex in developing thymocytes. *J. Immunol*. 173.1802-1810.
- Gupta, A. and Terhorst, C., 1994. CD3 delta enhancer. CREB interferes with the function of a murine CD3-delta A binding factor (M delta AF). *J. Immunol*. 152: 3895–3903.
- Guy C., & Vignali D. A. A., 2009. Organization of proximal signal initiation at the TCR:CD3 complex. *Immunol Reviews*. 232 (1). pp., 7-21.
- Heissmeyer V, Macián F, Varma R, Im SH, García-Cozar F, Horton HF, Byrne MC, Feske S, Venuprasad K, Gu H, Liu YC, Dustin ML, Rao A. 2005. A molecular dissection of lymphocyte unresponsiveness induced by sustained calcium signalling. *Novartis Foundation Symposium*. 267. pp., 165-74; discussion 174-9.
- Hess J., Angel P. y Schorpp-Kistner M., 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of Cell Science*. 117 (25), pp.5965-5973.
- Hoffman R. A., Kung P. C, Hansen W. P., & Goldstein G., 1980. Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77., pp.4914-4917.
- Howe C. J., LaHair M. M., Robinson P. J., Rodriguez-Mora O., McCubrey J. A., Franklin R. A., 2003. Models of Anergy in the Human Jurkat T Cell Line. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 1 (4), pp. 537-544.
- Israël A., 2010. The IKK Complex, a Central Regulator of NF-κB Activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2:a000158.
- Janeway C. A., Travers P., 1994. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. Current Biology-Garland-Blackwell.
- Julius M. H., Simpson E., Herzenberg L. A., 1973. A rapid Method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *European Journal of Immunology*. 3 (10). pp. 645-649.
- Kaiser M., Wiggin G. R., Lightfoot K., Arthur J. S. C., Macdonald A., 2007. MSK regulate TCR-induced CREB phosphorylation but not immediate early gene transcription. *European Journal of Immunology. Leukocyte signaling*. 37. pp., 2583-2595.
- Kersh, G. J., 2007. Lymphocyte activation signals: Transduction. *Encyclopedia Of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. doi: 10.1002/9780470015902.a0001185.pub2
- Kyttaris V. C., Wang Y., Juang Y. T., Weinstein A. y Tsokos G. C., 2007. Increased Levels of NF-ATc2 Differentially Regulate CD154 and IL-2 Genes in T Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.*, 178., pp.1960-1966.
- Leung-Theung-Long S., Mondor I., Guiraud M., Lamare C., Nageleekar V., Paulet P. E., Rincon M., Guerder S., 2009. Impaired NFAT Transcriptional Activity in Antigen-Stimulated CD8 T Cells Linked to Defective Phosphorylation of NFAT Transactivation Domain. *The Journal of Immunology*. 182. pp., 6807-6814.
- LI T., Wong V. K. W., YI X. Q., Wong Y. F., Zhou H., y LIU L., 2010. Matrine Induces Cell Anergy in Human Jurkat T Cells through Modulation of Mitogen-Activated Protein Kinases and Nuclear Factor of Activated T-Cells Signaling with Concomitant Up-Regulation of Anergy-Associated Genes Expression. *Biol. Pharm. Bull*. 33(1), pp.40-46.

- Lin, J. X., & Leonard W. J., 1997. Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus. *Cytokine & Growth Factors Reviews*, 8 (4), pp. 313-332.
- Lineberry N. & Fathman C. G., 2006. T Cell Anergy: Where It's LAT. *Immunity*. 24, pp.501–512
- Macian F., 2005. NFAT Proteins: Key Regulators of T-Cell Development and Function. *Nature Reviews Immunology*, 5., pp.472-484.
- Macián F., López-Rodríguez C., y Rao A., 2001. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Nature Oncogene*. 20, pp:2476-2489.
- Majdalawieh A. & Ro H. S., 2010. Regulation of I κ B α Function and NF- κ B Signaling: AEBP1 Is a Novel Proinflammatory Mediator in Macrophages. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation*, pp. 1-27.
- Malek T. R., 2008. The Biology of Interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* 26, pp.453–79. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090357.
- Manicassamy S., Gupta S. y Sun Z., 2006. Selective Function of PKC- θ in T cells. *Cellular & Molecular Immunology*. 3(4). pp.263-270.
- Mayr, B., & Montminy, M., 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation dependent factor CREB. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 2, pp. 599-609.
- McKay M. M., & Morrison D. K., 2007. Integrating Signals From RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*. 26. pp., 3113-3121.
- Meager A., & Wadhwa M., 2007. Interleukins. *Encyclopedia Of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. doi: 10.1002/9780470015902.a0000932.pub2.
- Medzhitov R., 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449, pp.819-826.
- Montminy M. R., & Bilezikjian L. M., 1987. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*. 328. pp., 175-178.
- Montminy, M., 1997. Transcriptional Regulation by cyclic AMP. *Annual Review of Biochemistry*, 66, pp. 807-822.
- Müller M. R., Rao A., 2010. NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nature Immunology*. 10. pp., 645-656. doi:10.1038/nri2818.
- Muthusany N. & Leiden J. M., 1998. A Protein Kinase C-, Ras-, and RSK2-dependent Signal Transduction Pathway Activates the cAMP-responsive Element-binding Protein Transcription Factor following T Cell Receptor Engagement. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (35). pp., 22841-22847.
- O'shea J. J. & Nutman T. B., 2001. Immunoregulation. *Encyclopedia of Life Sciences*. pp., 1-10.
- Palm N. W., & Medzhitov R., 2009. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 227, pp.221-233.
- Pallant A., Fukuda M., Frelinger J. G., 1990. CD43 (leukosialin, sialophorin, large sialoglycoprotein) can be expressed in both normal and Wiskott-Aldrich fibroblasts via transfection of a leukosialin cDNA. *European Journal of Immunology*. 20 (7), pp.1423-1428.
- Park, J. K., Rosenstein, Y. J., Remold-O'Donnell, E., Bierer, B. E., Rosen, F. S., & Burakoff S., 1991. Enhancement of T-cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Nature*, 350, pp. 706-709.
- Parkman R., Remold-O'Donnell, E., Kenney, D. M., Perrine, S., Rosen, F. S., 1981. Surface protein abnormalities in lymphocytes and platelets from patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *The Lancet*, 19 (26), pp. 1387-1389.
- Parry R. V. & Ward S. G., 2005. T-lymphocyte Activation. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1038/npg.els.0001184.
- Pedraza-Alva G, & Rosenstein Y., 2007 CD43: One molecule, many tales to recount. *Signal Transduction*. 7. pp., 372–385.

- Pedraza-Alva G., Mérida L. B., Burakoff S. J., Y Rosenstein Y., 1998. T Cell Activation through the CD43 Molecule Leads to Vav Tyrosine Phosphorylation and Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(23), pp. 14218-14224.
- Pedraza-Alva G., Mérida L. B., Burakoff S. J., Y Rosenstein Y., 1996. CD43-specific Activation of T Cells Induces Association of CD43 to Fyn Kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 271 (44), pp. 27564-27568.
- Pedraza-Alva G., Mérida L. B., Del Rio R., Fierro N. A., Cruz-Muños M. E., Olivares N., Melchy E., Igras V., Holländer G. A., Burakoff S. J., Rosenstein Y., 2011. CD43 Regulates the Threshold for T Cell Activation by Targeting Cbl Functions. *IUBMB Life*. 63 (10). pp., 940-948.
- Powell J. D., Lerner C. G., Ewoldt G. R., Schwartz R. H., 1999. The -180 Site of the IL-2 promoter Is the Target of CREB/CREM Binding in T cell Anergy. *The Journal of Immunology*. 163. pp., 6631-6639.
- Remold-O'Donnell, E., Davis E. A., Kenney, D., Bhaskar, K. R., & Rosen F. S., 1986. Purification and chemical composition of gpL115, the human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich Syndrome. *The Journal of Biological Chemistry*, 261 (16), pp. 7526–7530.
- Roach Peter J., 1991. Multisite and Hierarchical Protein Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 266 (22), pp.14139-14142.
- Rubio I., Grund S., Song S. P., Biskup C., Bandemer S., Fricke M., Forster M., Graziani A., Wittig U., y Kliche S., 2010. TCR-Induced Activation of Ras Proceeds at the Plasma Membrane and Requires Palmitoylation of N-Ras. *The Journal of Immunology*. 185. pp., 3536-3543.
- Saibil, S. D., Deenick, E. K., & Ohashi, P. S., 2007. The sound of silence: modulating anergy in T lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*, 19, pp.658-664.
- Santana, M. A., Pedraza-Alva, G., Olivares-Zavaleta, N., Madrid-Marina, V., Horejsi, V., Burakoff, S. J., & Rosenstein Y., 2000. CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NFκB transcription factors in Human T lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (40), pp. 31460–31468.
- Schwartz, R. H., 2003. T cell anergy. *Annual Review of Immunology*, 21, pp.305-334.
- Seo W., & Ziltener H. J., 2009. CD43 processing and nuclear translocation of CD43 cytoplasmic tail are required for cell homeostasis. *Blood*. 114 (117). pp., 3567-3577.
- Serfling E., Klein-Hessling S., Palmetshofer A., Bopp T., Stassen M., y Schmitt E., 2006. NFAT transcription factors in control of peripheral T cell tolerance. *Eur. J. Immunol.*, 36., pp.2837–2843.
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., & Jordan, M. S., 2009. T cell activation. *Annual Review of Immunology*, 27, pp.591-619.
- Solomou, E. E., Juang, Y. T. and Tsokos, G. C., 2001. Protein kinase C-theta participates in the activation of cyclic AMP-responsive element-binding protein and its subsequent binding to the –180 site of the IL-2 promoter in normal human T lymphocytes. *J. Immunol*. 166: 5665–5674.
- Soto-Nieves N., Puga I., Abe B. T., Bandyopadhyay S., Baine I., Rao A., Macian F., 2009. Transcriptional complexes formed by NFAT dimers regulate the induction of T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine*. 206, 867–876 (2009).
- Sperling A. I., Green J. M., Lee M. R., Smith P. L., DiPaolo R. J., Klein J. R., Bluestone J. A., Thompson C. B., 1995. CD43 Is a Murine T Cell Costimulatory Receptor that Functions Independently of CD28. *Journal of Experimental Medicine*. 182. pp., 139-146.
- Srinivasan M. & Frauwirth K. A., 2007. Reciprocal NFAT1 and NFAT2 Nuclear Localization in CD8+ Anergic T Cells Is Regulated by Suboptimal Calcium Signaling. *The Journal of Immunology*. 179. pp., 3734-3741.
- Stefanova I., Hemmer B., Vergelli M., Martin R., Biddison W. E., Germain R. N., 2003. TCR Ligand Discrimination is Enforced by Competing ERK Positive And SHP-1 Negative Feedback Pathways. *Nature Immunology*. 4 (3). pp., 248-254.

- Sugamura K., Asao H., Kondo M., Tanaka N., Ishii N., Ohbo K., Nakamura M., y Takeshita T., 1996. The Interleukin-2 Receptor Chain: Its Role in the Multiple Cytokine Receptor Complexes and T Cell Development in XSCID. *Annu. Rev. Immunol.* 14., pp.179–205.
- Sun P., Enslin H., Myung P. S., Maurer R. A., 1994. Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes and Development.* 8. pp., 2527-2539.
- Tan N. Y., Khachigian L. M., 2009. Sp1 Phosphorylation and Its Regulation of Gene Transcription. *Molecular and Cellular Biology.* 29 (10)., pp. 2483-2488. doi:10.1128/MCB.01828-08.
- Tan Y., Rouse J., Zhang A., Cariati S, Cohen P., Comb M. J., 1996. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *The EMBO Journal.* 15 (17). pp., 4629-4642.
- Tenbrock K., Juang Y. T., Leukert N., Roth J., Y Tsokos G. C., 2006. The Transcriptional Repressor cAMP Response Element Modulator α Interacts with Histone Deacetylase 1 to Repress Promoter Activity. *The Journal of Immunology,* 177., pp.6159–6164.
- Tenbrock K., Juang Y. T., Tolnay M., & Tsokos G. C., 2003. 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,* 170., pp. 2971–2976.
- Tibbles L. A., Y Woodgett J. R., 1999. The stress-activated protein kinase pathways. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 55 (1999), pp.1230–1254.
- Turpaev K. T., 2006. Role of transcription factor AP-1 in integration of cell signaling systems. *Molecular Biology.* 40 (6)., pp.945-961.
- Tyson D. R., Swarouth J. T., Jefcoat S. C., Y Partridge N. C., 2002. PTH Induction of Transcriptional Activity of the cAMP Response Element-Binding Protein Requires the Serine 129 Site and Glycogen Synthase Kinase-3 Activity, But Not Casein Kinase II Sites. *Endocrinology* 143(2)., pp.674–682.
- Vainer G. W., Pikarsky E., Ben-Neriah Y., 2008. Contradictory functions of NF- κ B in liver physiology and cancer. *Cancer Letters.* 276(2). pp., 182-188.
- Vesely PW, Staber PB, Hoefler G, Kenner L., 2009. Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutat. Res.* 682(1). pp., 7-12.
- Veselya P. W., Staber P. B., Hoefler G., Y Kenner L., 2009. Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 682 (1)., pp.7-12.
- Wells, A. D., 2009. New insights into the molecular basis of T cell anergy: Anergy factors, avoidance sensors, and epigenetic imprinting. *The Journal of Immunology,* 182, pp. 7331-7341.
- Wertz I. E. & Dixit V. M., 2010. Signaling to NF- κ B: Regulation by Ubiquitination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* ;2:a003350.
- Wilson H. M. & Barker R. N., 2009. Cytokines. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS).* John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000929.pub2.
- Xing J., Kornhauser J. M., Xia Z., Thiele E. A., Greenberg M. E., 1998. Nerve Growth Factor Activates Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways To Stimulate CREB Serine 133 Phosphorylation. *Molecular and cellular Biology.* 18 (4). pp., 1946-1955.
- Zha Y, Marks R, Ho AW, Peterson AC, Janardhan S, Brown I, 2006. T cell anergy is reversed by active Ras and is regulated by diacylglycerol kinase- α . *Nature Immunol.* 7. pp., 1166–73.