

00551

6

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**CD43 y el receptor de células T generan señales intracelulares
que pueden regularse mutuamente**

**Tesis de posgrado que, para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Bioquímicas presenta:**

Biol. Mario Ernesto Cruz Muñoz

**Director de tesis.
Dra. Yvonne Rosenstein
Instituto de Biotecnología**

Cuernavaca Morelos

Noviembre, 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Resumen.....	1
Abstract	3
CAPITULO I: Introducción.....	4
I. El complejo TCR-CD3- ζ	6
a) Estructura general.....	6
b) Estequiometria y ensamblado.....	8
II. Los ITAMs y la señalización en células del sistema inmune.....	9
III. Eventos tempranos de la señalización del TCR.....	13
a) Papel de las cinasas de tirosina de la familia Src.....	15
ii) p56 ^{lck}	17
iii) p59 ^{lyn}	19
b) Regulación y función de las cinasas de la familia Syk.....	20
i) La cinasa ZAP-70.....	21
c) LAT en la vía de señalización del TCR.....	22
d) Vav, un conector de la señalización del TCR con el citoesqueleto.....	23
IV. CD43, una molécula co-receptora.....	25
a) Estructura y distribución.....	25
b) CD43 y sus contrareceptores.....	28
i) ICAM.....	28
ii) HSA.....	29
iii) Galectina-1.....	29
iv) MHC.....	30
v) Sialoadhesina.....	30
vi) CD43 y su interacción con patógenos.....	31
c) El Ying-Yang o el ratón deficiente en CD43.....	32
d) CD43 ¿ una molécula incomoda o multifacética?	34
e) CD43 y su vía de señalización.....	37
V. Objetivos.....	41

CAPITULO II. Resultados y discusión de la participación de la cadena ζ en la vía de señalización de CD43.....	42
I CD43 induce la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ	43
II CD43 recluta a la cinasa ZAP-70.....	44
III Las señales mediadas por CD43 inducen la actividad de cinasa de Lck y Fyn.....	46
IV Lck media la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ mediada por CD43.....	47
V CD43 induce la polarización de ζ pero no del complejo TCR-CD3.....	47
VI CD43 también recluta a la cadena ζ en células NK.....	49
VII La coestimulación a través de CD43 y el TCR estabiliza la fosforilación de ZAP-70.....	50
VIII DISCUSIÓN.....	59

CAPITULO III. Resultados y Discusión de la participación de la molécula adaptadora Cbl en la vía de señalización de CD43).....	69
---	-----------

I Las señales coestimuladoras mediadas por CD43 reclutan a la molécula adaptadora Cbl.....	70
---	----

CAPITULO IV. Conclusiones.....	76
---------------------------------------	-----------

CAPITULO V. Materiales y Métodos.....	80
--	-----------

1. Anticuerpos y Reactivos.....	81
2. Líneas celulares y purificación de linfocitos T y NK cells de sangre periférica.....	81
3. Activación celular.....	83
4. Inmunoprecipitados.....	83
5. Inmunoblots.....	84
6. Ensayo de cinasa <i>in vitro</i>	84
7. Recubrimiento de esferas de látex poliestireno con anticuerpos.....	85
8. Inmunotinción y microscopía confocal.....	86

REFERENCIAS..... 87

APÉNDICE I

APÉNDICE II (Artículos)

RESUMEN

CD43 es una molécula coreceptora que regula distintas funciones celulares como adhesión, activación o muerte celular en linfocitos T (1), células dendríticas (2), células NK (3, 4) y monocitos (5), así como neutrófilos (6, 7). El hecho de que se expresen diferentes isoformas de esta molécula y que se hayan descrito varios ligandos sugiere que cada una de las funciones reguladas por CD43 parecen depender del ensamblaje de distintos complejos para activar cascadas de señalización. A la fecha, distintas evidencias señalan que el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular induce la activación de una variedad de proteínas de señalización tales como miembros de la familia de cinasas de Src y de Syk, la cinasa de adhesión PYK2, proteínas adaptadoras como Shc y SLP-76, el GEF Vav1, las MAPK cinasas ERK1/2 y p38, así como los factores transcripcionales NF-AT y NF- κ B. Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos tempranos de señalización a través de los cuales CD43 conlleva al reclutamiento de toda esta gama de proteínas de señalización. En este trabajo encontramos que en linfocitos T, la cadena ζ es parte de la maquinaria de señalización de CD43. La fosforilación en residuos de tirosina de la cadena ζ en respuesta al entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular resulta en el reclutamiento y fosforilación de la cinasa ZAP-70 y del GEF Vav. Mediante ensayos de cinasa *in vitro*, mostramos que ZAP-70 puede contribuir a incrementar la actividad de cinasa asociada a la cadena ζ en respuesta a señales mediadas por CD43. El entrecruzamiento de CD43 en la superficie de células deficientes en la expresión de Lck (JCaM.1) no indujo un incremento en la fosforilación en residuos de tirosina de la cadena ζ ni de las proteínas asociadas, lo que sugiere que Lck es un elemento clave en la vía de señalización de CD43 que media la fosforilación de la cadena ζ . Utilizando esferas de latex recubiertas con anticuerpo anti-CD43, las señales mediadas por CD43 indujeron la redistribución de la cadena ζ hacia los sitios de contacto establecidos entre célula y esfera, sin embargo, la distribución del complejo CD3 no pareció verse afectada. El reclutamiento de la cadena ζ en la vía de señalización mediada por CD43 no es un evento restringido a linfocitos T ya que la fosforilación y la redistribución de la cadena ζ también se observan en células NK. Nuestros resultados aportan evidencia de que la cadena ζ funciona como una molécula de andamiaje en la vía

de señalización de CD43, lo que favorece el reclutamiento y formación de complejos de señalización involucrados en la activación celular de linfocitos T y otras células hematopoyéticas como células NK. Adicionalmente, cuando los linfocitos T se estimularon a través de CD43 y el TCR, la fosforilación en residuos de tirosina de la cinasa ZAP-70 resultó más estable y prolongada respecto a células estimuladas solo a través del TCR, lo que sugiere que las señales mediadas por CD43 afectan a aquellas generadas a través del TCR. Por último, la participación de la molécula adaptadora Cbl en la vía de señalización de CD43 sugiere que esta molécula coreceptora puede regular los umbrales de activación en linfocitos T.

ABSTRACT

CD43 is an abundant cell surface sialoglycoprotein implicated in hematopoietic cell adhesion and activation. Cell stimulation through CD43 results in recruitment of different signaling proteins, including members of the Src family kinases, Syk, PLC γ 2, the adapter protein Shc, the guanine nucleotide exchange factor Vav and activation of PKC. Here we report that in human T lymphocytes, the ζ chain is part of the CD43 signaling pathway. Upon CD43 engagement, the ζ chain was tyrosine phosphorylated, generating docking sites for tyrosine phosphorylated ZAP-70 and Vav. *In vitro* kinase assays suggested that ZAP-70 could account for the kinase activity associated with the ζ chain following CD43 engagement. Crosslinking CD43 on the surface of the Lck deficient JCaM.1 cells failed to phosphorylate the ζ chain and associated proteins, suggesting that Lck is a key element in the CD43 signaling pathway leading to ζ phosphorylation. CD43 engagement with beads coated with anti-CD43 mAb resulted in concentration of the ζ chain towards the bead attachment site, but interestingly, the distribution of the T cell antigen receptor complex remained unaffected. Recruitment of the ζ chain through CD43-mediated signals was not restricted to T lymphocytes since phosphorylation and redistribution of the ζ chain was also observed in natural killer cells. Our results provide evidence that the ζ chain functions as a scaffold molecule in the CD43 signaling pathway, favoring the recruitment and formation of downstream signaling complexes involved in the CD43-mediated cell activation of T lymphocytes and other leukocytes such as NK cells. Moreover, when T cells were stimulated through CD43 and TCR, the tyrosine phosphorylation of ZAP-70 was sustained compared with that induced in response to TCR crosslinking alone. The recruitment of the adapter protein Cbl in the CD43 signaling pathway suggest that CD43 can be involved in the establishment of the activation threshold in T cells.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Una respuesta inmune requiere la participación coordinada de distintas células tales como linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, macrófagos y de células "Natural Killer" (NK) entre otras. A su vez, cada una de estas células responde a estímulos provenientes de patógenos y/o sus productos o bien del propio organismo, necesarios para mantener la homeostasis celular. La capacidad de respuesta, es decir, la activación de estas células está a cargo de distintos receptores de la membrana celular que disparan cascadas de señalización intracelular altamente reguladas. Los receptores responsables de reconocer específicamente el antígeno juegan un papel central en la activación de células del sistema inmune y pertenecen a la familia de los inmunoreceptores. Entre los miembros de esta familia se incluyen al receptor para el antígeno de células T (TCR), al receptor para el antígeno de células B (BCR), a distintos receptores para las porciones Fc de las inmunoglobulinas (Igs) y a receptores de citotoxicidad natural (NCRs) (8, 9). Sin embargo, si bien la interacción de los inmunoreceptores con su antígeno específico es el detonador de un elaborado proceso de activación, se requieren también las señales generadas por la interacción de otros receptores de membrana con sus respectivos ligandos para lograr que la célula se comprometa plenamente para diferenciarse y generar funciones efectoras como secreción de citocinas, actividad citotóxica o producción de anticuerpos. En conjunto, las señales generadas por las moléculas coreceptoras modulan las distintas repuestas celulares, modificando ya sea cuantitativa o cualitativamente las señales intracelulares que se generan a través de los inmunoreceptores.

En linfocitos T, la función específica de las moléculas accesorias, o moléculas coreceptoras es compleja ya que algunas de ellas forman parte del aparato de señalización normal del TCR (i. e. CD4, CD8 o CD45) mientras que otras favorecen la interacción física entre la célula efectora y las células presentadoras de antígeno, a la vez que generan señales que pueden modular positiva o negativamente las señales del receptor para el antígeno, así como señales propias. Por ejemplo, las integrinas leucocitarias, al interactuar con sus ligandos respectivos funcionan tanto como moléculas que regulan la adhesión como moléculas que suministran señales intracelulares que al ser integradas por la célula, generan una respuesta única.

La molécula CD43, también conocida como leucosialina o sialoforina, es una molécula con funciones múltiples. Es, junto con la fosfatasa CD45, una de las proteínas

más abundantes de la superficie de los linfocitos T. CD43 se asoció inicialmente con el síndrome de Wiskott-Aldrich, una inmunodeficiencia asociada al cromosoma X (10). La expresión deficiente de CD43 en la superficie celular de linfocitos en pacientes que sufren esta enfermedad sugirió que CD43 es una molécula implicada en la activación celular de linfocitos T. Sin embargo, ahora se sabe que una mutación en CD43 no es la principal causa de esta inmunodeficiencia ya que el gene que codifica para CD43 se localiza en el cromosoma 16 en humanos y que una mutación en una proteína intracelular de 502 aminoácidos, denominada WASP, es la causa de esta enfermedad (11).

No obstante, hay abundantes referencias que sustentan al papel de CD43 como una molécula coreceptora. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales el dominio intracelular de CD43 se conecta con distintas proteínas de señalización se conocen solo parcialmente. En este estudio, nos hemos propuesto identificar proteínas que jueguen un papel importante en la vía de CD43, lo que permitirá entender como su cascada de señalización es ensamblada y como esta puede integrarse con aquella generada a través del TCR.

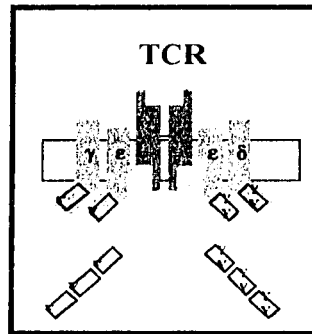
1. El complejo TCR-CD3- ζ

a) estructura general

Una característica común de los distintos tipos de inmunoreceptores es que constan de subunidades de reconocimiento asociadas a un complejo de proteínas que constituyen a su vez el aparato de señalización de estos receptores. Este tipo de módulos se encuentran en el receptor para el antígeno de células T (TCR); de células B (BCR); así como en varios receptores de células "Natural Killer" (NK), algunos receptores para fragmentos Fc, y otros receptores de células hematopoyéticas.

En la mayoría de los linfocitos T, el TCR-CD3 se compone de seis cadenas polipeptídicas distintas, las cadenas $\alpha\beta$ o ($\gamma\delta$), ϵ , γ , δ y ζ (Fig. 1). El dominio amino terminal de cada una de ellas está orientado hacia la parte extracelular y el dominio hidrofóbico atraviesa la membrana celular una sola vez. Las cadenas $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, pertenecen a la súperfamilia de las inmunoglobulinas, constituyen la subunidad de reconocimiento del antígeno propiamente dicho, y son altamente polimórficas como resultado de la recombinación somática de distintos segmentos genéticos, lo que da lugar a un receptor

con características clonales. El dominio citoplasmático de las cadenas $\alpha\beta$ consta de tan solo 12 aminoácidos por lo que se piensa que no participa en la transducción de señales intracelulares.



TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

Fig.1 Estructura del receptor para el antígeno de células T (TCR)

El conjunto de cadenas invariables constituido por miembros del complejo CD3 y miembros de la familia de la cadena ζ forman el aparato de señalización del TCR (12). El complejo CD3 se compone de tres cadenas polipeptídicas relacionadas entre si y con pesos moleculares de entre 20 y 26 kDa (13, 14). Estas cadenas, denominadas CD3- δ , CD3- ϵ , y CD3- γ , presentan dominios intracelulares de entre 79 y 104 aminoácidos, y son miembros de la súperfamilia de genes de las inmunoglobulinas. CD3- δ y CD3- γ , son los únicos miembros del complejo CD3 que contienen unidades de carbohidratos unidos por enlaces N-glicosídicos (15). Todos los miembros de este complejo se caracterizan por tener por lo menos un ITAM, una estructura cuya importancia se describe más adelante. Se ha propuesto que los genes que codifican para las cadenas CD3- δ y CD3- γ surgieron por duplicación genética hace alrededor de 200 millones de años (16).

La cadena ζ es un polipéptido de 16 kDa que existe principalmente como un homodímero estructural y genéticamente distinto de las cadenas CD3- δ CD3- ϵ CD3- γ (17, 18). La cadena ζ presenta un dominio extracelular de tan solo nueve aminoácidos mientras que su dominio citoplasmático se compone de 122 aminoácidos en ratón y 113 en humanos. A lo largo de su cola citoplásmica hay seis residuos de tirosina que son sustratos de cinasas. En su extremo carboxilo terminal existe una secuencia consenso

para la unión de nucleótidos, a través del cual la cadena ζ puede unir análogos de GTP (19).

Aunque la mayoría de los TCR expresados en la superficie de los linfocitos T contienen el homodímero $\zeta\zeta$, una de las cadenas puede ser substituida por la cadena η , producto de un empalme alternativo del gene de ζ , o por la subunidad γ del receptor Fc para IgE ($FC\epsilon-\gamma$) (20). La cadena η es idéntica a ζ , excepto en su extremo carboxilo terminal, donde el octavo exón de ζ es substituido por un exón específico de η lo que resulta en un polipéptido de 22 kDa que no contiene el último residuo de tirosina de ζ ni un sitio de unión a GTP (21, 22). En células murinas, el 5% de los complejos TCRs contienen el dímero $\zeta\eta$ (23) mientras que en humanos menos del 0.25% de las linfocitos T presentan este dímero (24).

El dominio transmembranal de la cadena ζ y el de la subunidad γ del receptor $FC\epsilon-\gamma$ es idéntico en un 65% (25). De manera interesante, en ratones deficientes en montar respuestas citolíticas contra células cancerosas, la cadena ζ es reemplazada por γ , lo que sugiere que este cambio de isotipo puede contribuir a un fenotipo inmunodeficiente (26).

A diferencia de los miembros del complejo CD3, la cadena ζ y sus proteínas relacionadas no se asocian exclusivamente con el TCR ya que son capaces de ensamblarse con otros receptores de membrana. Tanto la cadena ζ y $FC\epsilon-\gamma$ se expresan en células NK donde se ensamblan con la forma transmembranal de CD16 (27). La cadena ζ también puede sustituir a $FC\epsilon-\gamma$ en el ensamblado del receptor Fc para IgE (28). En linfocitos T, la cadena ζ forma parte de la vía de señalización de distintas moléculas de la superficie celular tales como CD4 (29, 30), CD8 (31-33), CD5 (34, 35), CD55 (36), CD59 (37), and CD43 (38). Consistente con esta idea, se han reportado complejos estables de CD2, CD4, CD5 CD8 con el complejo TCR (34).

b) Estequiometría y ensamblado

El complejo TCR se caracterizó inicialmente como un complejo macromolecular compuesto de siete cadenas polipeptídicas en el cual cada subunidad estaba presente en una sola copia con la excepción del dímero $\zeta\zeta$. Sin embargo, múltiples líneas de investigación ahora sugieren que existen dos subunidades CD- ϵ por receptor (39-41).

Estudios adicionales sugieren que el TCR puede ser visto como un complejo formado por cuatro dímeros estables: las cadenas $\alpha\beta$, CD3- $\delta\epsilon$, CD3- $\gamma\epsilon$ y $\zeta\zeta$ (40). Este modelo de octámero, sin embargo, es difícilmente visualizado por estudios de coimmunoprecipitación, en donde los complejos purificados a partir de la membrana celular utilizando anticuerpos anti- δ o anti- γ contienen CD3- δ pero no CD3- γ y viceversa (42). Ya que las subunidades CD3- δ y CD3- γ están muy relacionadas entre sí, y además asociadas con CD3- ϵ , es probable que CD3- δ y CD3- γ puedan sustituirse mutuamente durante el ensamblaje del receptor. Sin embargo, también es posible considerar otros modelos del complejo en donde el TCR pueda visualizarse como un complejo altamente ordenado con más de un dímero $\alpha\beta$ o $\zeta\zeta$.

El proceso de ensamblaje del TCR comienza en el retículo endoplásmico con la formación de los dímeros CD3 $\gamma\epsilon$ y CD3 $\delta\epsilon$. El dímero CD3 $\gamma\epsilon$ se aparea con la cadena TCR- β y el complejo CD3 $\delta\epsilon$ se aparea con la cadena TCR- α a través de los aminoácidos cargados positivamente presentes en sus dominios transmembranales. El apareamiento individual de las cadenas TCR α y TCR β con los dímeros CD3 minimiza la repulsión de cargas entre las dos cadenas del TCR antes de formarse el enlace disulfuro entre ambas. El homodímero $\zeta\zeta$ es el último componente en sumarse al complejo parcialmente ensamblado antes de transitar hacia el aparato de Golgi.

Cuando el cDNA que codifica para cada uno de los componentes del complejo TCR se transfecta simultáneamente en células que no son linfocitos T, por ejemplo, fibroblastos, el complejo CD3 y la cadena ζ son suficientes para permitir la expresión del complejo TCR en la superficie celular (22, 43). En hibridomas, la expresión del TCR en la superficie celular está limitada por la cantidad de ζ sintetizada. Complejos parciales, que carecen de ζ pueden ensamblarse y salir del retículo endoplásmico, pero son rápidamente degradados en compartimentos lisosomales (44-46) mientras que las subunidades individuales y otros complejos parciales son degradados en retículo endoplásmico (47).

II. Los ITAMs y la señalización en células del sistema inmune

Como ya se mencionó anteriormente, una característica estructural común a los módulos de señalización encontrados en los distintos tipos de inmunoreceptores es la presencia de una o más copias de un dominio de señalización denominado ITAM, por sus siglas en inglés (Immunoreceptor Tyrosine Activation Motif), cuya secuencia consenso es YXXL/(X₆₋₈)YXXL/I, donde X denota cualquier aminoácido (48, 49). La firma de este dominio está constituida por dos residuos de tirosina que son sustratos de miembros de la familia de cinasas de tirosina de Src (ver más adelante). La familia de proteínas que contienen uno o más ITAMs incluye a las cadenas CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ y las cadenas ζ , asociadas al TCR; las cadenas Ig α e Ig β asociadas al BCR; la cadena Fc ϵ R1 β ; la cadena γ asociada a los receptores Fc ϵ R1-, Fc γ R1-, y Fc γ R3; DAP12; y varias moléculas transmembranales codificadas por virus (50)(Fig. 2).

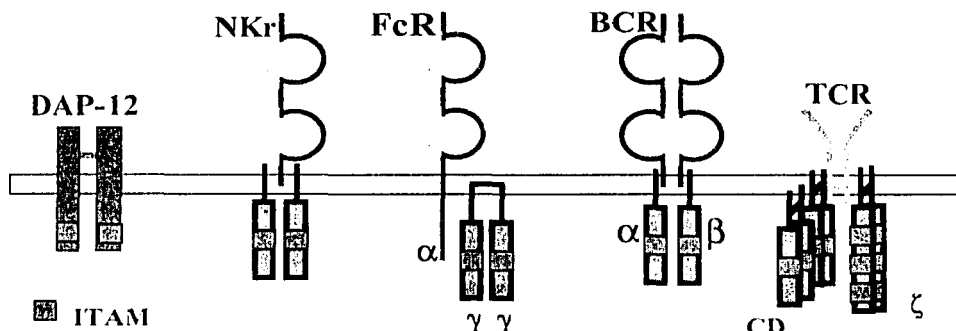


Fig.2 Proteínas de superficie que contienen ITAMs.

Los ITAMs ocupan una posición clave en la propagación de cascadas de señalización intracelular en respuesta a la unión del receptor con su antígeno específico (50, 51). En general, uno de los eventos más tempranos que resultan de la unión del receptor con su ligando, es la fosforilación de los residuos de tirosinas presentes en los ITAMs. Dependiendo del estado de maduración de la célula, así como del tipo celular, estas cascadas de señalización culminan en distintas respuestas celulares tales como

diferenciación, muerte celular programada, sobre vivencia o desempeño de funciones efectoras que comprenden la producción de citocinas o actividad citotóxica.

En el caso de los ITAMs presentes en el complejo CD3 y en la cadena ζ , la fosforilación de estos residuos de tirosina conlleva al reclutamiento y activación de las cinasas de tirosina de la familia Syk, ZAP-70 y Syk. A su vez, la activación de estas cinasas permite el reclutamiento y fosforilación de múltiples proteínas de señalización involucradas en conectar al receptor con una cascada de señalización y subsecuentes funciones efectoras (52). Se ha sugerido que una posible función de estos complejos multi-ITAM es la de facilitar la amplificación de la señal que se transmite a través de estos receptores, al incrementar la concentración local de proteínas efectoras (53, 54). Alternativamente, se ha propuesto que la presencia de múltiples ITAMs permite que un receptor se acople a distintas cascadas de señalización iniciadas por la unión diferencial de cada ITAM con diferentes moléculas de señalización, lo que induciría señales intracelulares que difieran de manera cualitativa (54-57). Se ha demostrado que todos los ITAMs del complejo CD3- ζ reclutan a la cinasa ZAP-70, pero que también pueden asociarse diferencialmente con la cinasa Fyn, las proteínas adaptadoras Shc, Grb-2 o la subunidad p85 de la PI3-K (56, 57). Sin embargo, debido a que la mayoría de estas asociaciones adicionales se ha demostrado *in vitro*, queda aún por determinar la relevancia funcional *in vivo* de estas asociaciones alternativas.

El papel funcional de los ITAMs en la señalización del complejo TCR ha sido estudiado mediante el empleo de distintas mutantes del complejo CD3 o de la cadena ζ que carecen de uno o más ITAMs. En ratones deficientes para el gen que codifica para la cadena ζ , la expresión del TCR en la superficie de los timocitos disminuye; además estos animales tienen cantidades reducidas de timocitos y de células T periféricas, lo que sugiere deficiencias en los mecanismos de selección positiva (53, 58). Más aún, cuando se examinó la especificidad de los TCRs presentes en la superficie de las células T maduras de estos ratones, se encontró que los TCRs son autoreactivos, lo que también sugiere deficiencias en los procesos de selección negativa (59). Sin embargo, debido a que la expresión del TCR es extremadamente baja en estos ratones, la contribución directa de cada uno de los ITAMs presentes en la cadena ζ no puede ser evaluada. Para valorar la importancia biológica de cada uno de los ITAMs con mayor precisión, los

ratones deficientes en ζ fueron reconstituídos con transgenes que codifican para cadenas ζ con tres, dos, uno o ninguno de los ITAMs presentes en la cadena ζ . Los experimentos realizados con estos ratones demuestran que la eficiencia de la selección positiva o negativa correlaciona directamente con el número de ITAMs presentes en la cadena ζ del complejo TCR (54, 60). En conjunto, estos datos apoyan la idea de que los distintos ITAMs presentes en la cadena ζ regulan de manera cuantitativa la señalización del TCR durante los procesos de selección de los timocitos.

El TCR une a sus ligandos dentro de una ventana amplia de afinidades por lo que se puede pensar que los distintos ligandos inducen señales intracelulares de distinta intensidad, y que la intensidad de las señales se verá reflejada de acuerdo al número de ITAMs fosforilados en la cadena ζ . Lo anterior fué demostrado en estudios en los que diferentes ratones que expresan TCRs transgénicos con especificidades y afinidades particulares por sus ligandos tienen distintas dependencias por el número de ITAMs presentes en la cadena ζ durante eventos de selección positiva (54). Péptidos que inducen selección negativa pueden inducir selección positiva si la fuerza de la señal generada a través del TCR es alterada disminuyendo el número de ITAMs presentes en la cadena ζ .

La contribución de los ITAMs presentes en la cadena ζ también ha sido evaluada en linfocitos T periféricos mediante el empleo de distintas mutantes de la cadena ζ . Estudios en donde proteínas quiméricas que consisten del dominio extracelular de CD16 o CD8 fusionado al dominio transmembranal y a una región que contiene uno de los tres ITAMs presente en la cola citoplásmica de ζ han demostrado una función redundante de los ITAMs en mediar actividad citolítica, flujos de Ca^{2+} intracelular y reclutamiento de la cinasa ZAP-70 ζ (61). De acuerdo a lo anterior, estos estudios sugieren un papel redundante de los ITAMs presentes en la cadena TCR- ζ en la señalización mediada a través del TCR en linfocitos T periféricos.

La contribución funcional de la cadena CD3 γ también ha sido evaluada a partir de ratones deficientes en su expresión. Estos animales se caracterizan por una disminución importante en el número de timocitos doble positivos y de células T maduras, sugiriendo que CD3 γ juega un papel importante durante las diferentes fases de la selección tímica. Los estudios realizados en ratones deficientes en la expresión de CD3 γ pero que son reconstituídos con una cadena CD3 γ que carece de su dominio ITAM permitieron

establecer el papel crucial de CD3 γ en mediar eventos de selección positiva, aunque su participación parece ser dispensable en eventos de selección negativa. De manera interesante, en estos ratones la fosforilación de las cinasas ERK1/2 y LAT es deficientes mientras que la de ZAP-70 y JNK no parece verse afectada, lo que sugiere que las cadenas del complejo TCR pueden inducir diferentes cascadas de señalización (62).

A semejanza de lo que ocurre con la cadena CD3- γ , un estudio reciente ha demostrado que las células T de un ratón deficiente en la expresión de la cadena CD3- δ no sufren procesos de selección positiva. Además en estas células no hay fosforilación de la cadena ζ presente en microdominios membranales ni activación de las MAPK cinasas ERK1/2 (63). Interesantemente, el fenotipo normal en estos ratones es reconstituido con la introducción de una mutante de CD3- δ que carece no solo de los ITAMS sino de su dominio citoplásmico. En consistencia con esto datos, ratones con mutaciones en el dominio α del TCR, requerido para su asociación con la cadena δ , sufren de un bloqueo en la selección positiva (64). Estos hallazgos demuestran no solo la importancia de los ITAMs en la señalización intracelular, sino también la participación de los dominios no-ITAMS presentes en el complejo CD3 en detectar o percibir cambios conformacionales ocurridos durante la interacción con su ligando. Esta idea ha sido corroborada por trabajos recientes que demuestran que el reclutamiento de la proteína adaptadora Nck a la cadena CD3 ϵ revela un cambio conformacional de TCR esencial para la señalización intracelular del TCR y establecimiento de la sinapsis inmunológica. Este cambio conformacional precede cualquier evento de fosforilación en residuos de tirosinas mediado por el TCR y es independiente del entrecruzamiento del TCR (65).

III. Eventos tempranos de la señalización del TCR

El evento central que conlleva a la activación y diferenciación de un linfocito T es la unión entre el TCR y su antígeno específico, un péptido de entre siete y doce aminoácidos presentado en asociación con las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad expresadas en la superficie de células presentadoras de antígeno u otra célula blanco (Fig. 3). Este evento genera una miríada de señales intracelulares en las que participan segundos mensajeros, cinasas, fosfatasas así como proteínas

adaptadoras. En conjunto, estas señales regulan la expresión de distintos genes de acuerdo a los programas genéticos característicos de los distintos subgrupos de células T.

Dada la información que tenemos, se intuye que son muchas las cascadas de señalización que se activan, pero los eventos muy tempranos son compartidos por la gran mayoría de tales cascadas.



Fig.3 Interacción específica del TCR con un antígeno presentado por las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) expresado sobre la superficie de células presentadoras de antígeno

Uno de los primeros eventos de la activación de los linfocitos T en respuesta al antígeno es la fosforilación de los residuos de tirosinas presentes en cada uno de los ITAMs del complejo CD3- ζ por cinasas de la familia Src, Lck/Fyn. Como ya se mencionó anteriormente, las colas citoplasmáticas del complejo CD3 presentan una sola copia de este dominio, mientras que la cadena ζ contiene tres dominios ITAMs. A diferencia de las cadenas del complejo CD3, la fosforilación de la cadena ζ resulta en la generación de dos isoformas fosforiladas denominadas p21 y p23, las cuales han sido detectadas en linfocitos T en reposo y activados respectivamente (66). Aunque se desconoce el mecanismo exacto a través del cual el reconocimiento del antígeno induce estos eventos de fosforilación, se han propuesto algunos modelos (Fig. 4). Uno de ellos propone que la yuxtaposición de Lck con el TCR, mediada por los coreceptores CD4/CD8, permite iniciar la fosforilación del complejo TRC (Fig. 4A). Por otro lado, se sugiere que la distribución y el aumento subsecuente en la concentración focal del complejo TCR y de varias cinasas junto con la coalescencia de microdominios lipídicos

hacia estos sitios constituyen el mecanismo de disparo de la activación celular (Fig. 4B). Finalmente, se ha sugerido que la exclusión de fosfatasa de la proximidad del complejo TCR favorece el balance entre fosforilaciones y desfosforilaciones hacia un aumento en el número de proteínas fosforiladas (Fig. 4C). En realidad, es probable que estos mecanismos no sean excluyentes entre sí, y que todos ellos participen de manera coordinada en iniciar la cascada de señalización a través del TCR (67).

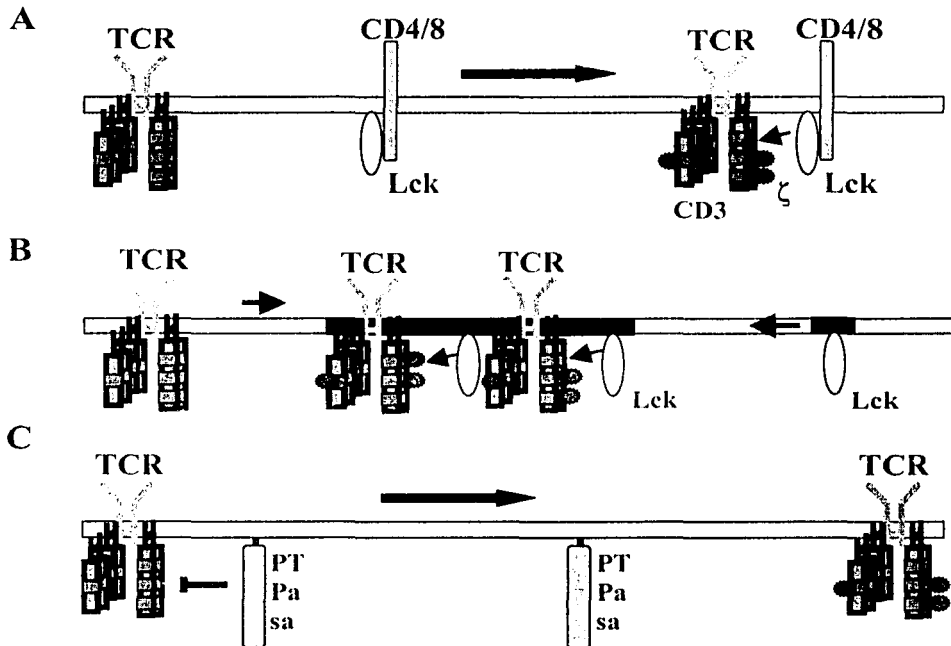


Fig. 4 Modelos a partir de los cuales se explica como se inicia la señalización intracelular a través del TCR

a) Papel de las cinasas de tirosina de la familia Src

La familia Src de cinasas de tirosina está compuesta por nueve miembros llamados -Src, c-Yes, c-Fgr, Lck, Fyn, Lyn Hck, Blk y Yrk (68, 69). La estructura primaria de estas cinasas está altamente conservada (Fig. 5) (68). Todas poseen un sitio de miristoilación en el extremo amino terminal, el cual se requiere para su asociación estable con la cara interna de la membrana plasmática. Cada una de ellas contiene un dominio único de 60 a

80 aminoácidos cuya secuencia es diferente en todos los miembros de la familia. En el caso de Lck y Fyn, los sitios de interacciones específicas con los coreceptores CD4/CD8 y el complejo CD3- ζ respectivamente se encuentran en la región correspondiente a esas secuencias (29, 70-72). Estas cinasas pueden asociarse con secuencias ricas en residuos de prolina a través de un dominio SH3 ubicado en el dominio amino terminal (73). La presencia de un dominio SH2 favorece las asociaciones con proteínas que contienen residuos de tirosina fosforiladas. En el extremo carboxilo terminal se ubica el dominio catalítico, el cual contiene los sitios de unión a ATP y de autofosforilación. Por último, también en el extremo carboxilo terminal, se encuentra un residuo de tirosina (Tyr⁵²⁸) cuya fosforilación regula de manera negativa la función de cinasa, y constituye el principal sitio de fosforilación *in vivo* (74-77).

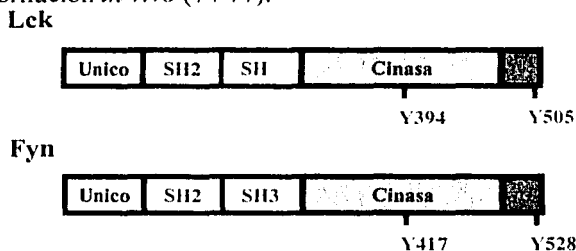


Fig. 5 Estructura general de las cinasas de la familia Src (Lck y Fyn)

La función catalítica de las cinasas de la familia Src está regulada principalmente por fosforilación en residuos de tirosinas (78). La fosforilación de los residuos de tirosina localizado en el extremo carboxilo terminal (Tyr⁵⁰⁵ en Lck y Tyr⁵²⁸ en Fyn) está mediada por un grupo único de enzimas, de las cuales Csk es la mejor caracterizada. Csk posee una estructura similar a los miembros de la familia Src, pero carece de sitios que sufren modificación por lípidos y no presenta un residuo de tirosina en el extremo carboxilo terminal que regule negativamente su función, por lo que es una cinasa constitutivamente activa (79-83).

La sustitución de la Tyr⁵⁰⁵ en Lck o de la Tyr⁵²⁸ en Fyn por fenilalanina resulta en la activación constitutiva de cada una de estas cinasas y puede conferir propiedades oncogénicas si se expresan estas mutantes en células de linaje fibroblástico. Se ha propuesto que la fosforilación en este residuo promueve una asociación intramolecular

entre el extremo carboxilo terminal y el dominio SH2 de la enzima, lo que la imposibilita para interactuar con sustratos intracelulares (58, 84). Adicionalmente, la delección del dominio SH2 tiene la capacidad de activar el potencial oncogénico de estas enzimas en una manera análoga a lo que sucede con la mutación de la Tyr⁵⁰⁵ en Lck o la Tyr⁵²⁸ de Fyn (85, 86).

ii) p56^{lck}

Lck es una proteína de 56 kDa que se expresa exclusivamente en células de origen linfoide (31, 87). Lck es abundante en todas las poblaciones de linfocitos T maduros así como en todos los subgrupos de timocitos (31). Se expresa también en niveles altos en células NK (88) y células B activadas (89).

Lck está física y funcionalmente asociada con CD4 y CD8 (72). Se estima que tanto en linfocitos T maduros como inmaduros entre el 50 y 90% de la Lck celular total está establemente unida a CD4, mientras que una fracción menor (10-25%) está asociada con CD8 (31).

Como se mencionó anteriormente, la función de Lck está regulada principalmente por fosforilación en tirosinas y su actividad catalítica es reprimida por fosforilación de la Tyr⁵⁰⁵ ubicada en el extremo carboxilo terminal (67, 90-93). El estado de fosforilación de esta tirosina es el resultado del balance de las funciones opuestas entre la cinasa Csk y de CD45, una fosfatasa de tirosinas expresada abundantemente en células hematopoyéticas. La capacidad de CD45 para desfosforilar la Tyr⁵⁰⁵ de Lck se ha demostrado por análisis en líneas celulares deficientes en CD45, en donde la fosforilación de la Tyr⁵⁰⁵ está aumentada con respecto a la observada en líneas silvestres (76, 94). Debido a que líneas celulares carentes en CD45 muestran una señalización deficiente a través del TCR, se piensa que la desfosforilación de Lck mediada por CD45 sea un requisito para iniciar la cascada de señalización a través del TCR (75, 77, 95-98).

El sitio de autofosforilación de Lck, la Tyr³⁹⁴, no se observa significativamente fosforilado en células T en reposo, pero es rápidamente inducido en respuesta al entrecruzamiento de CD4 (33). Así mismo, se nota un aumento en la fosforilación de la Tyr³⁹⁴, cuando se expresan mutantes de Lck en las que la Tyr⁵⁰⁵ se muta en líneas celulares de fibroblastos (32). Además de ser un marcador de activación de Lck, la

Tyr³⁹⁴ parece contribuir a la activación enzimática de Lck ya que cuando la Tyr³⁹⁴ es sustituida por un residuo de fenilalanina no fosforilable, Lck pierde la capacidad de aumentar la capacidad de respuesta de las células (85).

La activación de células T a través de un estímulo fisiológico o bien mediante el empleo de anticuerpos anti-TCR o lectinas induce la fosforilación de Lck en por lo menos dos residuos de serina, la Ser⁴² y la Ser⁴⁹, localizados en el extremo carboxilo terminal de Lck (31, 87). Recientemente se ha demostrado que la fosforilación de estos residuos de serina por miembros de la familia de las MAP cinasas constituye una retroalimentación positiva de la señalización a través del TCR, y parece permitir discriminar entre respuestas inducidas por ligandos agonistas y agonistas parciales.

Las interacciones intra e intermoleculares de Lck regulan la funcionalidad de la enzima. La asociación entre el dominio SH2 de Lck y la Tyr⁵⁰⁵ situada en el extremo carboxilo terminal es de baja afinidad, y la interacción de los dominios SH2 o SH3 de Lck con secuencias de mayor afinidad, presentes en otras proteínas desplaza la interacción del dominio SH2 de Lck con su Tyr⁵⁰⁵ (97, 99). La actividad enzimática de Lck puede regularse independientemente del estado de fosforilación de la Tyr⁵⁰⁵ pero depende de la interacción de Lck con proteínas fosforiladas en tirosinas. Este mecanismo de activación se ve ejemplificado durante el reclutamiento de Lck a los sitios de adhesión focal mediados por integrinas, donde su asociación con la cinasa de adhesión focal FAK estimula la actividad enzimática de Lck, independientemente del estado de fosforilación de la Tyr⁵⁰⁵ (99).

iii) p59^{fyn}

Fyn es una proteína cinasa de 59 kDa que se expresa en células de origen neuronal y hematopoyético (100). Como consecuencia de un empalme alternativo, existen dos isoformas de Fyn. Mientras que la isoforma más convencional, FynB, es detectada principalmente en cerebro, el producto alternativo, FynT, se acumula en células del linaje hematopoyético, especialmente linfocitos T. Estas dos isoformas difieren exclusivamente en una secuencia de 50 aminoácidos, localizada en el extremo del dominio SH2 y el principio del dominio catalítico.

Fyn se expresa poco en timocitos dobles positivos CD4⁺CD8⁺; sin embargo, su expresión se incrementa en distintos subgrupos de linfocitos T maduros (101). La participación de Fyn en las señales de linfocitos T generadas a través del TCR se infirió a partir del hallazgo de que pequeñas cantidades de Fyn están asociadas al complejo TCR en lisados de células T maduras obtenidos en presencia de detergentes suaves (71). Aunque la naturaleza de esta interacción aún aguarda una determinación exacta, los experimentos *in vitro* señalan que está mediada por los diez primeros aminoácidos de Fyn y los dominios citoplasmáticos del complejo CD3 y de la cadena ζ (70).

La contribución de Fyn a la señalización del TCR se ha establecido a partir de distintos estudios. En ratones transgénicos que sobreexpresan Fyn en el timo, se encuentra un incremento en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, movilización de Ca²⁺ intracelular y la producción de IL-2 en respuesta al entrecruzamiento TCR (101). Por lo contrario, los timocitos de un ratón transgénico en los que se expresa una dominante negativa de Fyn, las respuestas mediadas por el TCR se atenúan (101). La pérdida de expresión de Fyn mediante recombinación homóloga en células progenitoras embrionarias resulta en una respuesta pobre, lo que sugiere que la presencia de Fyn es necesaria para una respuesta óptima de timocitos en respuesta a las señales del TCR. Sin embargo, la ausencia de expresión de Fyn no afecta el desarrollo de células T maduras (102, 103).

De manera similar a Lck, la función catalítica de Fyn está regulada por fosforilación en tirosinas. La fosforilación de la Tyr⁵²⁸ de Fyn, localizada en el extremo carboxilo terminal, regula negativamente la actividad catalítica de la enzima. Por lo contrario, la defosforilación de esta tirosina por CD45 incrementa la actividad catalítica de la enzima. Ya que Fyn puede estar asociada con el complejo CD3 y de la cadena ζ , se ha propuesto que la actividad catalítica de Fyn se estimula en respuesta a la interacción del TCR con su ligando. El entrecruzamiento del TCR en la superficie celular con anticuerpos anti-TCR induce un ligero, pero reproducible incremento en la actividad catalítica de Fyn (91). Alternativamente, y al igual que Lck, la actividad catalítica de Fyn puede ser regulada independientemente del estado de fosforilación de la tirosina presente en el extremo carboxilo terminal de estas enzimas(99). La interacción del dominio SH3 de Fyn con el dominio SH2 de la proteína adaptadora SAP, induce un cambio

conformacional de la cinasa Fyn que permite su activación al quedar expuesto el sitio catalítico de la enzima (104).

Como en el caso de Lck, Fyn contribuye a la señalización temprana inducida por el TCR. Sin embargo, queda por esclarecer si Fyn y Lck ejercen las mismas funciones en células T. Mientras Lck es esencial para la funcionalidad tanto de linfocitos T inmaduros como maduros, la participación de Fyn parece estar restringida a subgrupos de linfocitos T maduros. En respuesta a las señales del TCR, es probable que mediante la fosforilación de los ITAMs presentes en la colas citoplasmáticas del complejo CD3- ζ , Lck y Fyn funcionen en paralelo, iniciando cascadas de señalización independientes. Alternativamente, es posible que estas dos enzimas funcionen a distintos niveles dentro de la cascada de señalización inducida por el TCR. Consistente con la segunda posibilidad, se ha reportado que Fyn pero no Lck, permite la señalización a partir de TCR- ζ expresada en células no linfoides tales como las células Cos-1 (105).

A pesar de que Lck y Fyn pueden inducir la fosforilación *in vitro* de los ITAMs presentes en el complejo CD3- ζ , los estudios realizados en una línea celular deficiente en la expresión de Lck más no de Fyn, células JCaM, señalan que la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ es mínima y que la fosforilación de ZAP-70 es prácticamente nula (106). Estos datos sugieren que Lck parece ser la cinasa que induce la fosforilación en residuos de tirosina de la cadena ζ . Fyn por su parte, parece inducir sólo cierto grado de fosforilación de la cadena ζ en ausencia de Lck, pero es incapaz de compensar la ausencia de ésta (106). Por otra parte, la fosforilación de la proteína adaptadora SLP-76, las vías de las MAPK cinasas y la de los fosfoinosítidos así como la expresión de CD69 y la activación de NF-AT parecen ser normales en estas mismas células (107), sugiriendo que Fyn puede mediar una vía de señalización alternativa a través del TCR, independiente de ζ y de ZAP-70. Es posible pensar que distintos fenotipos podrían resultar del uso alternativo de Lck o Fyn en respuesta a las señales del TCR.

b) Regulación y función de las cinasas de la familia Syk.

La familia de cinasas de la familia Syk, se caracteriza por la presencia de dos dominios SH2 en serie que preceden un dominio catalítico altamente conservado (Fig. 6) (108). Mientras ZAP-70 es una proteína expresada exclusivamente en linfocitos T y NKs, Syk

parecer estar expresada abundantemente en linfocitos B, y otros tipos celulares incluyendo linfocitos T, plaquetas y células mieloides (109, 110).

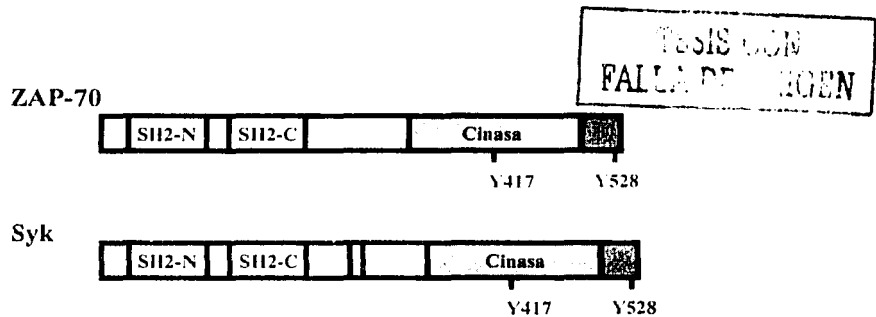


Fig. 6 Estructura general de la cinasas de la familia Syk (ZAP-70 y Syk)

Una de las principales funciones que cumple la fosforilación de los ITAMs en las colas citoplásmicas de los inmunoreceptores es la de generar sitios de unión para proteínas con dominios SH2 (52, 66, 67). ZAP-70 es una de las principales proteínas reclutadas al complejo CD3- ζ en respuesta al entrecruzamiento del TCR en la superficie celular. Debido a la presencia de diez ITAMs dentro del complejo CD3- ζ , se pueden reclutar potencialmente hasta diez moléculas de ZAP-70. Se desconoce si existen diferencias en el número de moléculas ZAP-70 asociadas al complejo CD3- ζ reclutadas en respuesta a distintos estímulos, y si esto contribuye con diferencias cuantitativas o cualitativas a la señalización a través del TCR.

i) La cinasa ZAP-70

La función crucial de la cinasa ZAP-70 en la señalización intracelular de linfocitos T ha sido demostrada a partir de estudios realizados en ratones deficientes en ZAP-70 y en humanos que padecen de una deficiencia genética en esta cinasa. En humanos, la carencia de ZAP-70 en humanos conlleva a una inmunodeficiencia caracterizada por la ausencia de células T CD8⁺ y células T CD4⁺ maduras (108). Los ratones deficientes en la expresión de ZAP-70 son también deficientes en la producción de células T CD4⁺ mientras que no muestran deficiencias en células NK (111). Por otro

lado, los ratones deficientes en la cinasa Syk mueren *in utero* debido a una hemorragia masiva, mientras que ratones RAG^{-/-} reconstituídos con células de hígado fetal de ratones deficientes en Syk no desarrollan linfocitos B ni algunas células T $\gamma\delta^+$ intraepiteliales (112). En estos ratones, la mayoría de las células T, así como otros tipos de leucocitos, parecen ser normales, lo que sugiere que la cinasa Syk no es esencial para el desarrollo de linfocitos T $\alpha\beta^+$.

Con la reciente caracterización de una línea celular deficiente en la expresión de ZAP-70 (P116), se ha confirmado el papel de ZAP-70 en mediar dos eventos claves en la señalización intracelular de linfocitos T a través del TCR. El primero, como cinasa importante para mediar la fosforilación de LAT, PLC γ 2, y SLP-76, y el segundo, como una molécula indispensable para mediar la movilización de Ca²⁺, la activación del factor de transcripción NF-AT y la producción de IL-2.

El estímulo a través del receptor para el antígeno resulta en la fosforilación de ZAP-70 en múltiples residuos de tirosina. Entre las tirosinas que regulan de manera positiva la actividad de ZAP-70 se encuentran las Tyr³¹⁵, la cual recluta a Vav, y la Tyr³¹⁹; cuya mutación inhibe la actividad catalítica de ZAP-70. El reclutamiento de Lck, a través de su dominio SH2, a esta tirosina es crucial para estimular la actividad de cinasa de ZAP-70. En contraste, la Tyr²⁹² regula de manera negativa la actividad de ZAP-70 al favorecer el reclutamiento de Cbl, una molécula adaptadora que regula negativamente la señalización a través del TCR. La actividad de ZAP-70 es además regulada negativamente por fosforilación en la Tyr⁴⁹², la cual afecta la actividad intrínseca de cinasa de ZAP-70, y por fosforilación de la Tyr⁵⁹⁸ en el extremo carboxilo terminal de ZAP-70 (66).

c) LAT en la vía de señalización del TCR

LAT (previamente identificada como pp36/38) es una proteína adaptadora transmembranal expresada en células T, NKs, células cebadas y plaquetas, blanco de fosforilación por la cinasa ZAP-70. La fosforilación en tirosinas de LAT permite el reclutamiento de diversas proteínas a la membrana celular; estas proteínas incluyen a PLC γ 2, Gbr2, Grap y p85, así como a proteínas que se unen al dominio SH3 de Grb2, Sos, c-Cbl y el complejo SLP-76-Vav. LAT es una proteína que además de estar

fosforilada, es palmitoilada, lo cual permite su asociación constitutiva con microdominios lipídicos ricos en glucolípidos, a la vez que favorece su fosforilación y reclutamiento de proteínas clave (66). Estudios realizados en líneas celulares deficientes en la expresión de LAT (JCaM.2) han demostrado que LAT es esencial para acoplar al TCR con las vías de PLC γ 2-Ca $^{2+}$ y Ras. Así mismo, estos datos sugieren que la activación deficiente de las vías de Ras y los flujos de Ca $^{2+}$ que se observa en líneas celulares deficientes en ZAP-70 puede atribuirse a una ausencia en la fosforilación de LAT y consecuentemente a una falla en el reclutamiento de PLC γ 2, Grb2-Sos y el complejo SLP-76-Vav.

d) Vav, un conector de la señalización del TCR con el citoesqueleto

Al interactuar con células presentadoras de antígeno, los linfocitos T sufren dramáticos cambios de forma a través de los cuales las células se polarizan. La polaridad celular depende de rearrreglos del citoesqueleto, y es el resultado de múltiples eventos altamente regulados en tiempo y espacio por numerosas moléculas. Vav es una proteína de 95 kDa que contiene distintos dominios que regulan las interacciones proteína-proteína tales como un dominio con homología a calponina (CH), que se une a actina filamentosa; un dominio con homología a Dbl (DH), que induce el desplazamiento de GDP en GTPasas de la familia Rho; un dominio con homología a pleckstrina (PH), un dominio de unión a fosfoinosítidos; y un dominio SH2 flanqueado por dominios SH3 (113, 114).

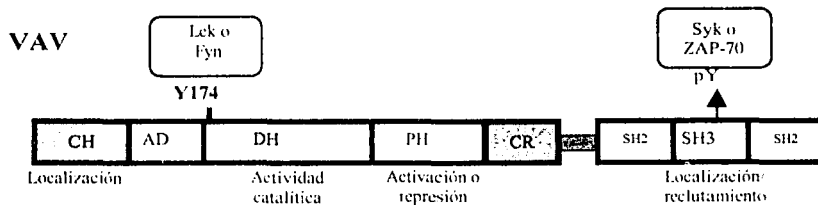


Fig. 7 Estructura general del GEF VAV

Inicialmente, Vav se identificó como una proteína fosforilada en tirosinas en respuesta al entrecruzamiento del TCR y BCR (115). Tanto Lck como Fyn pueden inducir la fosforilación en tirosinas de Vav *in vitro*, lo que estimula la actividad de GEF

de Vav (116). Sin embargo, existe evidencia de que miembros de la familia Syk también pueden inducir la fosforilación en tirosinas de Vav. Vav puede unirse a ZAP-70 y a Syk a través de su dominio SH2, el cual reconoce la Tyr³¹⁵ de ZAP-70 y probablemente la Tyr³⁴¹ de Syk. La mutación de la Tyr³¹⁵ de ZAP-70 inhibe su asociación con Vav así como la señalización del TCR, lo que sugiere que la asociación de Vav con ZAP-70 es significativamente funcional (117). Sin embargo, la fosforilación de Vav mediada por ZAP-70 o Syk no se ha demostrado *in vivo*.

Además de asociarse con miembros de la familia de Syk, Vav también puede asociarse con SLP-76 fosforilada en residuos de tirosina. La coexpresión de Vav y SLP-76 en células Jurkat resulta en un incremento sinérgico de la actividad transcripcional de NF-AT, implicando una relación funcional entre Vav y SLP-76 (118). Así mismo, la asociación funcional entre Vav y PI3-K también ha sido sugerida ya que la actividad de Vav puede ser modulada por los productos de PI3-K.

En células T deficientes en la expresión de Vav, la fosforilación en tirosinas del complejo CD3, de la cadena ζ y de ZAP-70 así como el reclutamiento de moléculas que se encuentran río abajo tales como las MAP quinasas es normal en respuesta a las señales del TCR (114). Por otro lado, en ausencia de CD45 o de Lck, la activación de NF-AT dependiente de Vav en respuesta a las señales del TCR es abolida (119), mientras que la sobreexpresión de Vav resulta en un incremento en la actividad transcripcional de NF-AT en condiciones basales así como en respuesta al TCR. En conjunto, estos datos sugieren que la actividad de Vav depende de los elementos de señalización tempranos del TCR.

Vav es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina para GTPasas de la familia Rho, implicadas en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina. Los timocitos y linfocitos T provenientes de ratones Vav^{-/-} muestran deficiencias en la capacidad de oligomerizar y formar agregados (Caps) del TCR lo que sugiere que Vav es un elemento importante para inducir la reorganización del citoesqueleto necesaria para la redistribución del TCR en la superficie celular, y en la formación de la sinapsis inmunológica (114).

En resumen podemos decir que Vav es un factor que promueve el intercambio de nucleótidos de guanina para GTPasas de la familia Rho y está implicada en regular la reorganización del citoesqueleto de actina. Aunque Vav parece no ser esencial para

mediar las señales tempranas que emanan del complejo TCR, Vav es importante para la producción de IL-2, proliferación y diferenciación de los linfocitos T.

III CD43, una molécula co-receptora

a) Estructura y distribución

Como se mencionó anteriormente, las señales que resultan de la interacción del complejo TCR con su antígeno, presentado por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, no son suficientes para comprometer a un linfocito T en generar funciones efectoras. La participación de otras moléculas de la superficie celular conocidas como moléculas accesorias o coreceptoras que generan señales adicionales que se suman a aquellas generadas por el TCR, permite no solo generar funciones efectoras sino también modular las distintas respuestas en las que participan los linfocitos T. Esta visión de la activación celular ha dado lugar al “modelo de las dos señales” para la activación de linfocitos.

La hipótesis en la que se basa este modelo fue inicialmente propuesta para explicar como los linfocitos B discriminan entre lo “propio” y lo “no propio”. Este modelo propone que las señales resultantes de la interacción del receptor con su antígeno generan tolerancia, un estado conocido como anergia, mientras que la señal generada a través del receptor para el antígeno, acompañada de una segunda señal resulta en la activación celular (120, 121). Posteriormente, se sugirió que este modelo también podría aplicar para la activación de linfocitos T (122). Actualmente, el papel de las moléculas co-receptoras en generar señales que contribuyen a la modulación de aquellas del receptor para el antígeno es ampliamente aceptado. Las funciones de las moléculas co-receptoras son muy variadas. Entre las más abundantes se encuentran CD43 y CD45, ya que se ha calculado que CD43 ocupa el 28% de la superficie de un linfocito T y CD45 el 23%.

CD43 es una proteína transmembranal de tipo I con alto grado de glucosilación. Codificada por un solo gene presente en el cromosoma 16 de humanos, CD43 se expresa en todas las células de origen hematopoyético con excepción de eritrocitos y células B no activadas (123-126). CD43 está constituida por tres dominios bien definidos. Un

dominio extracelular compuesto de 235 aminoácidos, de los cuales uno de cada cuatro son prolinas, serinas o treoninas. La prolina proporciona rigidez a la molécula mientras que los dos últimos residuos establecen uniones O-glucosídicas con la N-acetilgalactosamina. La adición de un residuo de galactosa y dos de ácido siálico da lugar a la presencia de 80 a 90 unidades de tetrasacárido del tipo mucina (Fig. 9) (127-129). El dominio transmembranal consta de 23 aminoácidos mientras que el dominio citoplásmico se compone de 123 aminoácidos (130-132).

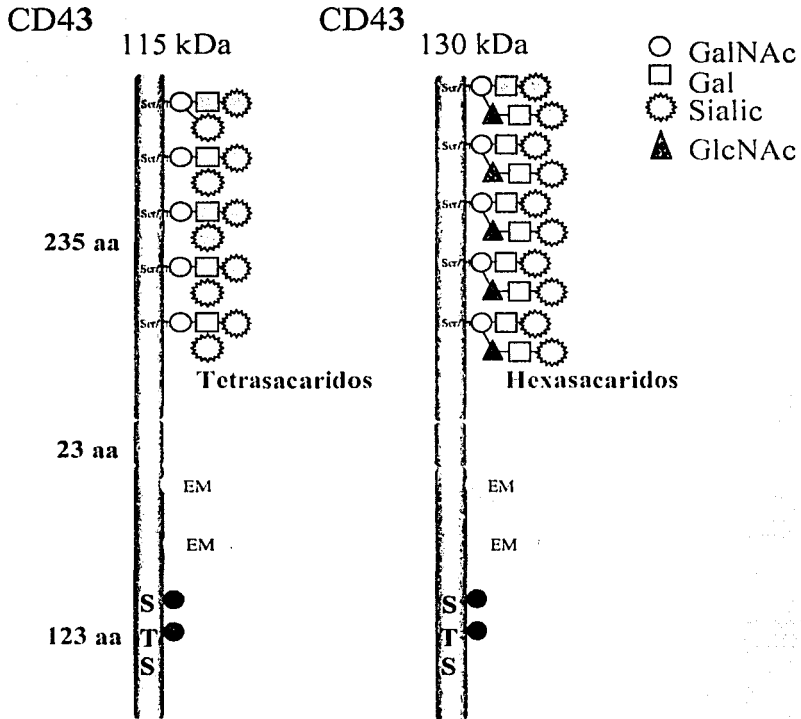


Fig. 8 Estructura de la molécula coreceptora CD43

El dominio citoplasmático de CD43 carece de actividad enzimática pero resaltan un dominio rico en prolinas, dos secuencias consenso para la interacción con proteínas del citoesqueleto de la familia ERM (133-135), la presencia de residuos de serina y

treonina fosforilables en respuesta a PMA, siendo probablemente algunas de las serinas blanco de PKC (Fig. 8) (130-132). El dominio citoplásmico de CD43 de humano, ratón y rata presenta una homología del 72%, lo que sugiere que este dominio es altamente conservado en mamíferos (130, 132).

En individuos sanos, se han reportado principalmente dos isoformas de CD43, una de 115 kDa y otra de 130 kDa. La isoforma de 115 kDa se expresa preferencialmente en timocitos, linfocitos T CD4⁺ en estado de reposo, monocitos y células precursoras de eritrocitos. La isoforma de 130 kDa se expresa en plaquetas, linfocitos B activados, linfocitos T CD4⁺ activados, linfocitos T CD8⁺ y neutrófilos (125, 136-139). La isoforma de mayor peso molecular resulta de cambios en el patrón de O-glicosilación, en parte debido a una mayor expresión de la enzima C2GnT en células activadas, la cual adiciona residuos de N-acetilglucosamina y fucosa a los tetrasacáridos presentes en la isoforma de menor peso molecular (Fig. 8) (137, 138, 140). Sin embargo, en la superficie de una misma célula se pueden expresar más de una isoforma simultáneamente (141, 142).

Debido al alto contenido de residuos de prolina y al elevado grado de glicosilación y de cargas negativas, el dominio extracelular de CD43 adopta una conformación extendida. Estudios de microscopía electrónica revelan que CD43 se proyecta 45 nm desde la superficie celular, lo cual la hace ser una de las proteínas de mayor tamaño de la superficie celular (Fig. 9) (132). Además, el dominio extracelular de CD43 puede sufrir modificaciones por sulfatación (143). La glicosilación y sulfatación de las proteínas de la superficie celular participan de manera importante en eventos de reconocimiento celular, por lo que es posible que a través de este tipo de modificaciones post-traduccionales, CD43 regule eventos de adhesión celular. La presencia de epitopes sialyl-Lewis x (sLe^x) en el dominio extracelular de CD43 sugiere que esta molécula podría unirse a moléculas semejantes a lectinas tales como P- y E-selectinas (129, 144). Sin embargo, se ha propuesto que esta función adhesiva de CD43 puede ser contrarrestada por la presencia de más de 100 moléculas de ácido siálico cargadas negativamente (128). Considerando lo anterior y aunado a la abundancia de CD43 en la superficie celular (~10⁵ moléculas por célula) (132), es probable que CD43 sea responsable de regular los primeros contactos entre las células.

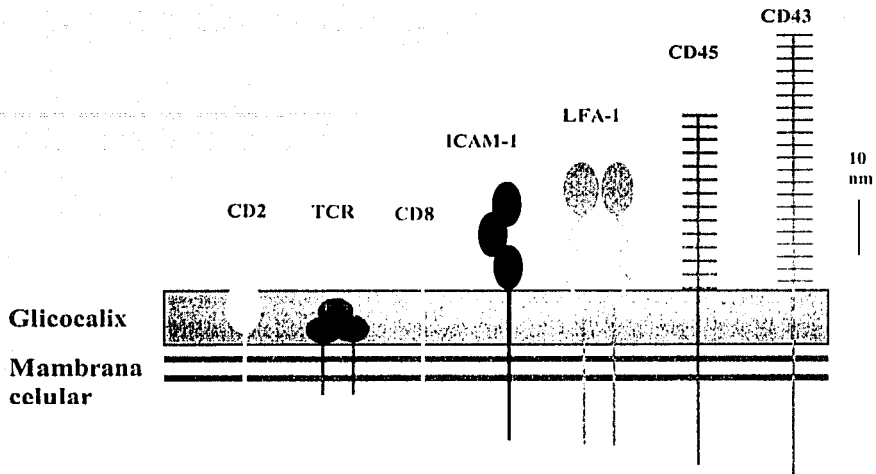


Fig. 9 Tamaños relativos de distintas proteínas de superficie de un linfocito T

b) CD43 y sus contrareceptores

La molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (145), albúmina de suero humana (HSA) (146), galectina-1 (147), las moléculas del complejo principal de hiscompatibilidad de clase I (MHC-I) (148) y la sialoadhesina (149) se han identificado como ligandos de CD43, aunque la relevancia funcional de cada una de estas interacciones *in vivo* aún no se conoce. Esta multiplicidad de ligandos sugiere que las funciones biológicas de esta molécula pueden estar mediadas por su interacción con uno o más receptores.

i) ICAM

ICAM-1 es un receptor de adhesión, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, ligando de las integrinas leucocitarias LFA-1 (CD11a/CD180) (150) y MAC-1 (CD11b/CD18) (151). Estudios previos demostraron que la expresión de CD43

humano en un hibridoma de células T incrementa su capacidad de producir IL-2 en respuesta a la estimulación con células Daudi, probablemente como consecuencia de la interacción de CD43 con un posible ligando expresado en células Daudi, además del reconocimiento específico del antígeno (152). El hecho de que la interacción específica de CD43 con células Daudi resultara inhibida por anticuerpos anti-CD43 o anti-ICAM-1, y que a su vez anticuerpos anti-CD43 o anti-ICAM-1 inhibieran las interacciones de CD43 con ICAM recombinante sugerían que ICAM-1 es un ligando de CD43 y que la interacción específica de CD43 con ICAM-1 puede contribuir al proceso de activación en linfocitos T (145).

ii) HSA

La asociación específica de CD43 con HSA se demostró por estudios de cromatografía de al pasar lisados de neutrófilos por columnas de HSA-sefarosa. La interacción de HSA con CD43 en la superficie celular de neutrófilos humanos inhibe el "spreading" celular y el estallido respiratorio en respuesta a TNF- α , sin afectar la adhesión celular. Así mismo la unión de HSA con CD43 también inhibe el corte proteolítico de CD43 de la superficie celular de neutrófilos en respuesta a TNF- α . Estos resultados sugieren que a través de la interacción de CD43 con HSA se regulan ciertas funciones celulares en neutrófilos (146).

iii) Galectina-1

La galectina-1 es un homodímero de 14 kDa, miembro de la familia de las lectinas que presentan un dominio de unión para carbohidratos como la galactosa (153, 154). La función exacta de la galectina-1 se desconoce, aunque se ha sugerido su participación en mediar eventos de adhesión celular (155, 156). La asociación de la galectina-1 con CD43 se demostró mediante el empleo de anticuerpos anti-CD43 y anti-galectina-1 los cuales bloquean la unión de linfoblastos T o timocitos a células del epitelio tímico. El grado de unión de la galectina-1 a timocitos varía de acuerdo al estado de maduración de los mismos, ya que timocitos inmaduros unen más galectina-1 que los timocitos maduros. Es probable que la unión preferencial de galectina-1 a timocitos inmaduros refleje diferencias en los patrones de glucosilación en ambas poblaciones de timocitos y que la adhesión mediada por la interacción de CD43 con galectina-1 participe en la maduración

de timocitos y que esta interacción se regule de acuerdo a la expresión de distintos epítopes glucosídicos sobre la superficie de los timocitos (147).

iv) MHC

Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) juegan un papel clave en el procesamiento y presentación del antígeno. Durante las interacciones entre células T y células presentadoras de antígeno (APC), la interacción del TCR y CD4/CD8 con moléculas del MHC da lugar a una serie de señales intracelulares esenciales para desencadenar el proceso de activación celular antígeno-específico. Estudios realizados con el fin de identificar moléculas involucradas en mediar la adhesión espontánea de células T y células presentadoras de antígeno, en este caso células dendríticas derivadas de monocitos demostraron la interacción de CD43 con moléculas del MHC clase I. La formación espontánea de estos conjugados puede ser inhibida preincubando las células con fragmentos Fab de un anticuerpo monoclonal anti-CD43 o con un anticuerpo monoclonal anti-MHC-I. Por otra parte, el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular de células T puede incrementar la afinidad de CD2 por su ligando CD58, y de la misma manera, señales generadas a partir del entrecruzamiento de CD2 puede aumentar la afinidad de CD43 por MHC-I. Estos resultados sugieren que CD43 y CD2 pueden ejercer funciones reguladoras entre si y que ambos pares moleculares (CD43/MHC-I y CD2/CD58) participan en regular la adhesión celular de linfocitos T con determinados tipos celulares (148).

v) Sialoadhesina

En macrófagos, CD43 se ha reportado también como molécula contrareceptora de la sialoadhesina, un receptor de adhesión de macrófagos implicado en mediar interacciones con células hematopoyéticas incluyendo linfocitos (149). La sialodhesina es un receptor de unión a ácido siálico; es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas; se expresa en la superficie celular de macrófagos y participa en eventos de adhesión celular entre macrófagos y células hematopoyéticas aunque también la sialodhesina puede

mediar la adhesión entre linfocitos T y B (157). La asociación entre CD43 y sialodhesina se demostró por experimentos de coimmunoprecipitación a partir de lisados de células COS transfectadas con CD43 y de linfomas murinos. Su interacción resultó ser dependiente de la presencia de ácido sialico y específica de las glucoformas de 115 y 130 kDa de CD43. Estos resultados sugieren que la interacción entre CD43 y sialodhesina puede promover las interacciones celulares entre macrófagos y células T.

Es claro que CD43 es una molécula que interactúa con más de una molécula. Sin embargo, en general, estas moléculas están restringidas a ciertos tipos celulares y estadios de diferenciación, por lo que parece posible que la interacción de CD43 con cada uno de sus contrareceptores desencadene respuestas distintas de acuerdo a un programa genético establecido en cada célula.

vi) CD43 y su interacción con patógenos

CD43 es también una molécula a través de la cual diversos patógenos ejercen sus efectos sobre las células hospederas. CD43 promueve interacciones estables entre micobacteria y macrófagos, lo cual a su vez resulta en un aumento en la producción de TNF- α (158). De acuerdo a esto, macrófagos deficientes en la expresión de CD43 no producen TNF- α en respuesta a micobacteria (158). Estos resultados sugieren una relación funcional entre CD43, la interacción de micobacteria a macrófagos y la producción de TNF- α .

CD43 también se ha identificado como una molécula reconocida por la hemaglutinina del virus de la influenza A (IAV) (159, 160). La disfunción de leucocitos polimorfonucleares inducida por IAV parece estar mediada por su interacción con CD43, sin embargo, experimentos realizados en células deficientes en CD43 permitirían dar una mejor conclusión al respecto. Interesantemente, se sabe que los efectos de IAV sobre la disfunción de células polimorfonucleares parecen estar mediadas por pequeñas proteínas G triméricas (161), por lo que estos datos sugieren que por lo menos parte de las cascadas de señalización inducidas por IAV pueden estar mediadas por CD43.

La trans-sialidasa es una enzima expresada en la superficie celular de *Trypanosoma cruzi*, un protozoario responsable de la enfermedad de Chagas (162). Por estudios de citometría de flujo y de inmunoprecipitación, se demostró que CD43 es un ligando natural de la trans-sialidasa (163), una proteína que transfiere residuos de ácido

siálico a glucoproteínas aceptoras semejantes a mucina (164). La interacción específica de CD43 con la trans-sialidasa de *Trypanosoma cruzi* induce señales de coestimulación en linfocitos T CD4⁺, lo que resulta en un incremento en la proliferación celular y en la producción de citocinas como TNF- α e IL-4.

Esos resultados sugieren que a través de la vía de señalización mediada por CD43, distintos patógenos pueden ejercer sus funciones sobre las células hospederas y que interesadamente, las interacciones de CD43 con antígenos de superficie de distintos patógenos desencadenan distintas respuestas celulares que a su vez son dependientes de cascadas de señalización.

Es importante mencionar también que en estadios asintomáticos, los individuos infectados con el virus del HIV desarrollan autoanticuerpos contra una forma hiposialilada de CD43 (165, 166) aunque no existe evidencia de que la infección por HIV afecte los patrones de glucosilación de CD43. CD43 además puede potenciar la actividad transcripcional del virus del HIV en respuesta a señales mediadas por el receptor para el antígeno de células T (TCR). Esta actividad coestimuladora es dependiente del reclutamiento de moléculas adaptadoras como LAT y SLP-76, así como de cinasas de la familia Src (167).

c) El Yin-Yang o el ratón deficiente en CD43.

Basándose en lo expuesto anteriormente, CD43 parece regular múltiples funciones ya que se ha asociado con eventos de adhesión, activación, proliferación celular así como con la generación de señales que conducen tanto a sobrevivencia como a muerte.

Debido a sus características estructurales como son un alto grado de glucosilación, la presencia de cargas negativas y la abundancia, se ha sugerido que CD43 es una molécula que regula la adhesión celular tanto de manera negativa como positiva. La participación de CD43 en la regulación negativa de la adhesión ha sido demostrada por estudios *in vivo* e *in vitro* en ratones deficientes en la expresión de CD43. Los linfocitos T de estos animales tienden a formar un número mayor de agregados celulares homotípicos y tienen mayor capacidad de unirse a fibronectina y a la molécula de adhesión intercelular, ICAM-1 (168). Asimismo, los estudios de inmunización *in vivo*, realizados en ratones CD43^{-/-} muestran que la ausencia de CD43 da lugar a una mayor

actividad citotóxica de linfocitos T contra células infectadas con *vaccinia* (168). Además, los linfocitos T de estos ratones proliferan más en respuesta a estímulos tanto dependientes como independientes del TCR (168, 169), lo que sugiere que otros mecanismos diferentes a la accesibilidad del TCR por su ligando son necesarios para explicar los efectos de CD43 en linfocitos T.

Por otra parte, los estudios realizados en el ratón deficiente en CD43 que expresa un TCR específico para el antígeno HY cuestionan las conclusiones anteriores respecto al papel de CD43 en la activación de linfocitos T (170). Los timocitos que expresan un TCR transgénico para el antígeno HY son seleccionados positivamente en hembras y negativamente en machos (171, 172). Los experimentos realizados en el ratón transgénico (HY) CD43^{-/-}, muestran que los linfocitos T periféricos de estos ratones no muestran un fenotipo hiper-responsivo en respuesta a mitógenos (170), un fenotipo asociado previamente con la ausencia de CD43 (168), y además que CD43 no es indispensable en la selección positiva o negativa de los timocitos.

Sin embargo, estos estudios no excluyen la posibilidad de que CD43 influya en la fisiología de los linfocitos T bajo ciertas condiciones. En este sentido, la ausencia de CD43 no afecta la respuesta de los linfocitos T CD8⁺ en contra de la infección por el virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCMC), pero la delección CD43 resulta en un incremento en el número de linfocitos CD8⁺ al día 15 de infección debido a un incremento en la expresión de Bcl-2 en los linfocitos, lo que resulta en una menor susceptibilidad a la muerte celular por apoptosis (173). Esta desregulación en la homeostasis linfocitaria puede causar mortandad en infecciones de tipo crónico en ratones deficientes en CD43 (173).

Cuando se analizan otras facetas de la respuesta inmune como la migración celular en ratones deficientes de CD43, los resultados demuestran que CD43 es una molécula con funciones duales. Los ratones deficientes en la expresión de CD43 presentan una mayor migración de linfocitos T hacia órganos linfoides secundarios en respuesta a estímulos quimiotácticos. Este incremento en la migración celular parece deberse en parte a un mayor rodamiento y adhesión de los linfocitos T a vénulas endoteliales (174, 175). Sin embargo, a pesar de ser más “pegajosos”, los leucocitos del ratón deficiente en CD43 muestran deficiencias en la infiltración de tejidos debido a una

incapacidad de emigrar fuera de la vasculatura (175). Estos resultados sugieren que CD43 es una molécula que participa en la regulación de la migración y de la extravasación de los leucocitos.

Los distintos fenotipos observados en el ratón deficiente de CD43 sugieren que esta es una molécula que regula distintas facetas de la respuesta inmune tales como activación linfocitaria o migración celular. CD43 es una molécula que se expresa en casi todo el linaje hematopoyético por lo que las consecuencias de la ausencia de CD43 deberán de ser evaluadas en otros tipos celulares como células NK y células dendríticas, en distintos escenarios.

d) CD43 ¿ la molécula incómoda o multifacética?

El hecho que distintos mecanismos regulen la expresión o distribución de CD43, sugiere que las funciones de CD43 en la adhesión celular son importantes. El dominio extracelular de CD43 puede ser cortado de la superficie celular de células cebadas y neutrófilos en respuesta a PMA o al entrecruzamiento de CD43 (176-178). La presencia del dominio extracelular de CD43 en plasma humano sugiere que tal mecanismo ocurre de manera natural (179). En neutrófilos humanos, el corte proteolítico de CD43 inducido por TNF- α puede inhibirse por HSA, lo que resulta en una inhibición del "spreading" celular y del estallido respiratorio (146). En una línea celular de células cebadas, el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular conlleva a una disminución en la expresión de CD43 precedida por un aumento en la expresión de TNF- α e IL-8 (180). Por otro lado, el entrecruzamiento de CD43 en células dendríticas derivadas de monocitos, induce su internalización por un mecanismo de endocitosis (181). En conjunto, estos estudios sugieren que el rasurado de CD43 parecer ser necesario para lograr una respuesta apropiada de los leucocitos. Otro estudio ha demostrado que en un hibridoma T, el entrecruzamiento de CD43 o la co-estimulación a través del TCR y CD43 resulta en una reducción en la expresión de CD43, lo que correlaciona con un aumento en la respuesta proliferativa de linfocitos T (169). Los neutrófilos de pacientes con síndromes mielodisplásicos muestran deficiencias en la expresión de CD43 lo que se ha asociado con un fenotipo activado de estas células (182). Otros estudios han demostrado que la expresión no regulada de CD43 en linfocitos B resulta en una inmunodeficiencia, a

pesar de que este ratón presente un aumento en el número de linfocitos B en bazo así como una menor susceptibilidad de estas células para sufrir apoptosis (183, 184), un fenotipo similar al que se observa en el ratón transgénico de Bcl-2 (185).

Recientemente se demostró que durante las interacciones entre linfocitos T y APCs que presentan el antígeno específico para el TCR, CD43 se excluye del sitio de contacto por un mecanismo dependiente de las señales inducidas por el TCR (186-189). La relocalización de CD43 resultante del contacto entre células T y APCs se asemeja a aquella que ocurre durante la migración celular. Durante la migración de linfocitos T del torrente sanguíneo hacia los sitios de inflamación, las células adoptan una morfología polarizada en donde se distinguen por lo menos dos compartimentos celulares, el "leading edge" (frente de movimiento) y en la parte posterior una proyección celular semejante a un pseudopodo llamada "urópodo" (190). Se ha propuesto que la redistribución de CD43 hacia el urópodo disminuye los impedimentos estéricos de la molécula en los sitios de contacto (leading edge) (135, 191, 192). Sin embargo, estudios en linfocitos deficientes en la expresión de CD43 que son reconstituídos con mutantes de CD43 que no se relocalizan hacia el uropodo, demuestran que la permanencia de CD43 en el "leading edge" no interfiere con la movilidad celular (192). En conjunto, estos datos sugieren que la expresión y distribución celular de CD43 representan puntos importantes de regulación de la adhesión celular.

El hecho de que el dominio citoplásmico de CD43 sea necesario para regular la redistribución celular de CD43 implica que el proceso de exclusión de CD43 es activo y que no es un movimiento pasivo que resulta de su carga y de su tamaño. Se ha propuesto que la exclusión de CD43 del sitio de interacción linfocito T-APC resulta de la defosforilación transitoria de las proteínas ERM, las cuales mantienen a CD43 anclada a la membrana.

Paradójicamente, a la vez que CD43 se asocia con la regulación negativa de la adhesión celular, numerosos reportes señalan que CD43 funciona también como un receptor que favorece las interacciones celulares. El entrecruzamiento de CD43 con anticuerpos anti-CD43 en la superficie de células dendríticas derivadas de monocitos aumenta su capacidad de formar conjugados con linfocitos T (181). Del mismo modo, anticuerpos anti-CD43 inducen la agregación celular homotípica de leucocitos humanos a

través de mecanismos dependientes e independientes de CD18/CD11 (LFA-1) (193). La agregación celular homotípica de timocitos inducida por el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular es dependiente de un citoesqueleto funcional, lo que sugiere que la adhesión celular mediada por CD43 es un proceso activo (194). Por otro lado, anticuerpos anti-CD43 pueden aumentar la adhesión celular mediada a través de integrinas de linfocitos T a fibras de fibronectina y a las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 (195). En este mismo sentido, los fragmentos Fab de anticuerpos anti-CD43 dirigidos contra las regiones O-glucosídicas de la molécula previenen la unión de linfocitos T a APC o células endoteliales, lo que sugiere que el entrecruzamiento de CD43 y los carbohidratos en unión O-glucosídica son importantes en la adhesión celular mediada por CD43 (147, 148)

Además de participar en los fenómenos de adhesión celular, CD43 regula también positivamente la activación celular de distintos leucocitos. El entrecruzamiento de CD43 induce señales que resultan en distintas respuestas celulares. En células dendríticas, CD43 promueve su maduración así como la expresión de distintos genes para citocinas tales como IL-6, IL-12, IL-10 y TNF- α (2). En células NK, CD43 estimula la secreción de distintas quimiocinas como RANTES y la proteína inflamatoria de macrófagos. En estas mismas células, la señalización a través de CD43 incrementa la actividad citotóxica así como su proliferación (4). En células progenitoras de células hematopoyéticas, el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular induce muerte celular a través de un mecanismo dependiente de la proteína pro-apoptótica Bad (196). En células Jurkat, un anticuerpo contra una forma hiposialilada de CD43 induce muerte celular (142). Interesantemente, a diferencia de este anticuerpo, otros anticuerpos dirigidos contra formas normales de CD43 no inducen muerte celular. En células polimorfonucleares, el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular induce el estallamiento oxidativo (6).

Parece ser que de acuerdo al nivel de expresión de CD43 en la superficie celular, las células T CD4⁺ de ratón, se pueden dividir en dos grupos funcionales. Las células que expresan niveles bajos de CD43 corresponden a un fenotipo de células no activadas o de reposo con base a los niveles de expresión de CD62L, CD45RB, y CD44, mientras que las células CD4⁺ con altos niveles de expresión de CD43 corresponden más bien a un

fenotipo de memoria (197). Los altos niveles de expresión de CD43 en linfocitos T de memoria parecen inhibir la muerte celular inducida por el TCR (198).

En linfocitos T, CD43 promueve la proliferación y producción de IL-2 de manera dependiente e independiente del TCR. Es interesante notar, que la coestimulación a través de CD43 y el TCR potencian la proliferación celular y producción de IL-2 (152). Esta función coestimuladora de CD43 es además independiente de la presencia de CD28, ya que en ratones deficientes en la expresión de este receptor, el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular aumenta la proliferación celular inducida por el TCR (199). En este mismo sentido, en linfocitos T intraepiteliales, CD43 potencia la proliferación en respuesta a anticuerpos anti-CD43 (200). Normalmente, los linfocitos intraepiteliales carecen de la expresión de CD28, por lo que CD43 podría desempeñar las funciones coestimuladoras de CD28 en linfocitos T intraepiteliales.

La actividad coestimuladora de CD43 en linfocitos T es dependiente de la presencia de su dominio intracelular (152), lo que sugiere que la cola citoplasmática de CD43 es indispensable para mediar estos efectos, probablemente a través de una cascada de señalización que se integra con aquella generada a través del TCR. En apoyo a esta idea, una asociación dependiente de señales mediadas a través de CD43 entre su cola citoplasmática y la cinasa Fyn puede inhibirse si se reclutan señales dependientes del TCR (201). Estos resultados sugieren un diálogo entre las vías de señalización de CD43 y el TCR.

En conclusión, CD43 es una molécula implicada en regular distintas facetas de la respuesta inmune en distintos tipos celulares del sistema inmune. Es probable que la multifuncionalidad de CD43 sea un reflejo de la existencia de distintas isoformas de CD43 así como de ligandos descritos, por lo que estudios utilizando los ligandos naturales de CD43 en los distintos tipos celulares que expresan diferencialmente las distintas isoformas de CD43 podrían ayudar a esclarecer las funciones de CD43.

e) CD43 y su vía de señalización

De todos los tipos celulares que expresan CD43, los linfocitos T representan quizás el modelo celular en donde mejor se ha caracterizado la vía de señalización de CD43 (Fig. 10). En el dominio intracelular de CD43 se han identificado tres sitios de fosforilación

por proteína cinasa C (PKC), así como una secuencia rica en prolinas que muestra homología con la secuencia consenso reconocida por dominios SH3 (132). Una hiperfosforilación de la cola citoplásmica de CD43 así como su inhibición por estaurosporina, sugieren que miembros de la familia de PKC están involucradas en mediar esta fosforilación (202).

Los primeros reportes sobre las cascadas de señalización reclutadas por esta molécula han mostrado que en monocitos y linfocitos T, el entrecruzamiento de CD43 induce incrementos en la producción de diacilglicerol y de fosfatos de inositol, acompañados de flujos de Ca^{2+} intracelular y activación de PKCs (203).

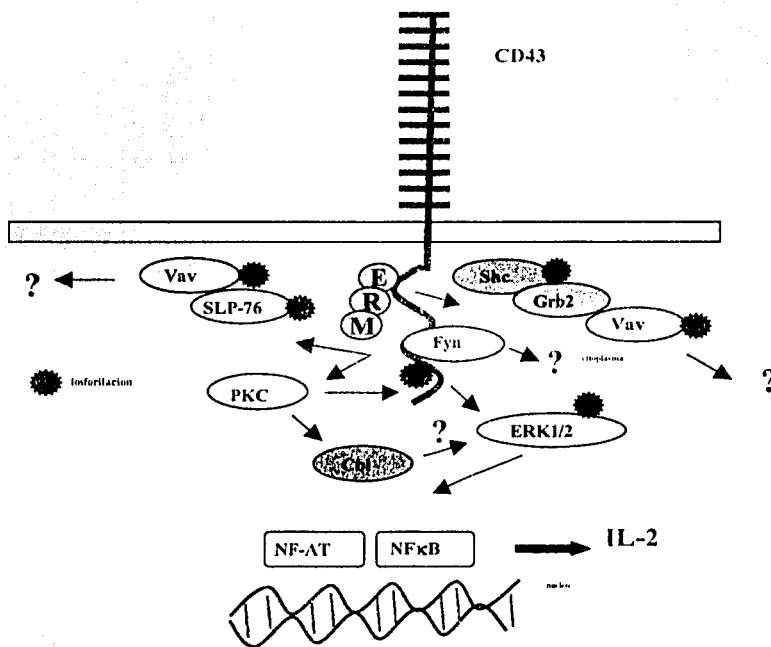


Fig 10 *La vía de señalización de CD43*

En linfocitos T, el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular induce la asociación de la cinasa Fyn con la cola citoplásmica de CD43; esta interacción está mediada por el dominio SH3 de Fyn y la secuencia rica en prolinas de CD43 (201). Una asociación

semejante de la cinasa Lck con la cola citoplásmica de CD43 también ha sido reportada (38). El entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular induce un incremento en la fosforilación en residuos de tirosina de la proteína adaptadora Shc, y el GEF Vav, lo que permite la formación de los complejos moleculares Shc/Grb2/Vav y Vav/SLP-76 (204). A su vez, la formación de estos complejos favorecen el reclutamiento de las cinasas ERK1/2 y la activación de los factores transcripcionales NF- κ B, AP-1 y NF-AT en respuesta a las señales de CD43 (205). En linfocitos T CD4⁺, la interacción de la transglucosidasa de *Trypanosoma cruzi* con CD43 induce la translocación de las MAP cinasas al núcleo y este efecto puede potenciarse si las señales mediadas por TCR son reclutadas (206).

Recientemente, se ha demostrado la participación de la molécula adaptadora Cbl en la vía de señalización de CD43. En leucocitos, Cbl es fosforilada transitoriamente en residuos de tirosina en respuesta al entrecruzamiento de distintos receptores y coreceptores incluyendo el TCR, BCR, receptores para Fc, receptores para citocinas como IL-3 o INF- γ , CD38, CD28 receptores para integrinas entre otros (207). La fosforilación en tirosinas de Cbl es mediada por las cinasas de la familia Syk, aunque no es claro si las cinasas de la familia Src participan también directamente en esta fosforilación (208, 209). La fosforilación en tirosinas de Cbl resulta en su asociación con proteínas como ZAP-70, Syk, Fyn, la cinasa de lípidos PI3-K, el GEF Vav, la molécula adaptadora Crk (210-214). A través de sus regiones ricas en prolinas, Cbl también puede asociarse con Fyn (215) y con las moléculas adaptadoras Grb2 y Nck (216, 217). Por último la fosforilación en serinas de Cbl favorece su asociación con proteínas de la familia 14-3-3 (218). Esta diversidad de complejos proteicos sugiere que Cbl juega un papel importante en la señalización intracelular. En células Jurkat, la sobreexpresión de Cbl inhibe la activación de las MAP cinasas y la actividad transcripcional de AP-1 de manera dependiente de Ras (219). El fenotipo del ratón deficiente en Cbl demuestra que la ausencia de Cbl incrementa la señalización intracelular en linfocitos T tras el entrecruzamiento del TCR (220). Sin embargo, Cbl parece ejercer un papel positivo en la adhesión células mediada por integrinas (221). En conjunto, estos resultados sugieren que Cbl es una molécula adaptadora que, dependiendo de la señal, puede tener funciones negativas o positivas.

A diferencia de las señales mediadas por el TCR, las señales de CD43 inducen la fosforilación en residuos de serina de Cbl (222). Esta fosforilación en residuos de serina de Cbl mediada por el entrecruzamiento de CD43 en la superficie de linfocitos T es dependiente del reclutamiento PKCs (222). Interesantemente, la asociación de Cbl con 14-3-3 inducida por las señales mediadas por CD43 puede prevenir el efecto inhibitor de Cbl sobre la vía de Ras y de las MAP cinasas (222). Adicionalmente, la activación de linfocitos T a través de CD43 previo a la activación del TCR previene la fosforilación en residuos de tirosina de Cbl inducida por el TCR, lo que inhibe las interacciones de Cbl con la molécula adaptadora CrkL (222). La preactivación a través de CD43 también resulta en una mayor fosforilación de las MAP cinasas ERK1/2, degradación de I κ B, translocación nuclear de NF- κ B y NFAT y activación de AP-1 (Pedraza-Alva et al., manuscrito en preparación). Importantemente, todas estas respuestas dependen del reclutamiento de PKCs, lo que sugiere un papel clave de PKC en la función coestimuladora de CD43.

Recientemente se demostró que la exclusión de CD43 del sitio de contacto entre célula T y APC es un proceso dependiente de señales inducidas por el TCR (186-188). Esta exclusión depende de la presencia de una región en la cola citoplásmica de CD43 requerida para su interacción con las proteínas del citoesqueleto ERM. La interacción de CD43 con las proteínas ERM mantienen anclada a CD43 con el citoesqueleto de actina. La desfosforilación de las proteínas ERM inducida por señales mediadas por el TCR resulta en una disociación de CD43 del citoesqueleto de actina, lo que permite que CD43 se excluya del sitio de contacto. Estos resultados sugieren en respuesta a las señales del TCR, las proteínas ERM regulan el movimiento de CD43 en la superficie celular.

En células hematopoyéticas inmaduras, CD43 induce la fosforilación de las cinasas Syk y Lyn y de otro grupo de proteínas identificadas como pp66, pp69 y pp77. El tratamiento con citocalasina D inhibe la fosforilación de la cinasa Syk y pp77 por lo que la participación de proteínas del citoesqueleto es necesaria para mediar la fosforilación de estas proteínas mediada por CD43 (223). En células progenitoras hematopoyéticas y en linfocitos T, CD43 recluta a PLC γ 2 mientras que en fibroblastos y células NK, CD43 induce la fosforilación de las proteínas Fak y Pyk 2 (4) (Núñez S, datos no publicados).

Esos datos sugieren que CD43 es una molécula que al interactuar con sus ligandos, contribuye a la generación de múltiples cascadas de señalización intracelular que en última instancia permiten regular distintas facetas de la fisiología de un linfocito T y de otras células hematopoyéticas.

IV OBJETIVO

La molécula CD43, también conocida como leucosialina o siloforina, es una molécula con funciones múltiples. Hay abundantes referencias que sustentan al papel de CD43 como una molécula coreceptora. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales el dominio intracelular de CD43 se conecta con distintas proteínas de señalización se conocen solo parcialmente. En este estudio, nos hemos propuesto identificar proteínas que jueguen un papel importante en la vía de CD43 lo que permitirá entender como su cascada de señalización es ensamblada y como esta puede integrarse con aquella generada a través del TCR.

CAPITULO II

**PARTICIPACIÓN DE LA CADENA ζ EN LA VÍA DE
SEÑALIZACIÓN DE CD43**

I CD43 induce la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ

La cadena ζ es una proteína integral de membrana de 16 kDa que forma parte del aparato de señalización de distintos coreceptores como CD2 (224, 225), CD4 (72, 83), CD8 (72, 75), CD16 (27, 226), CD26 (227). Se piensa que al regular el estado de fosforilación de la cadena ζ , moléculas de superficie celular CD45 (94, 96, 228, 229), CD4 (72, 75), CD8 (72) o CTLA-4 (230) regulan las vías de señalización generadas a través del TCR. Por ello se considera que la cadena ζ constituye un punto importante para la integración de señales generadas por distintos receptores de superficie celular. En este trabajo nos propusimos estudiar la participación de la cadena ζ en la vía de señalización mediada por CD43.

Para evaluar la participación de la cadena ζ en la vía de señalización de CD43, se hicieron inmunoprecipitados de la cadena ζ de células Jurkat estimuladas a través de CD43 por distintos tiempos utilizando L10, un anticuerpo monoclonal (mAb) específico para CD43. Los complejos inmunes se separaron por SDS-PAGE en un gel al 12%, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. El estado de fosforilación de la cadena ζ se evaluó por inmunoblot con un mAb anti-fosfotirosinas. En la Fig. 11A se muestra que a diferencia de células sin estimular, las señales mediadas por CD43 inducen un incremento en la fosforilación de tres proteínas de ~23, ~70 y ~95 kDa. El doblete de ~23 kDa observado en los inmunoprecipitados de la cadena ζ parece corresponder al peso molecular esperado para la cadena ζ fosforilada ya que se ha reportado que la cadena ζ es una proteína cuya fosforilación en residuos de tirosina resulta en la generación de dos isoformas denominadas p21 y p23. La fosforilación de la cadena ζ alcanzó niveles máximos al minuto de estímulo y regresó a niveles basales a los 10 min. Las proteínas de 70 y 95 kDa observadas en los inmunoprecipitados de la cadena ζ se identificaron como la cinasa de tirosinas ZAP-70, una proteína de 70 kDa que juega un papel importante en la señalización intracelular en linfocitos T (111) y el GEF Vav, una proteína de 95 kDa que participa en la activación de GTPasas de la familia Rho (114, 118), respectivamente (Fig. 11A). La cinética de fosforilación de ZAP-70 fue semejante a la observada para la cadena ζ , mientras que la fosforilación de Vav solo se observó a los tres minutos de estímulo (Fig. 11A). El inmunoblot anti-cadena ζ muestra cantidades equivalentes de proteína inmunoprecipitada en todos los carriles, por lo que las diferencias observadas en

los niveles de fosforilación no se deben a diferencias en la cantidad de proteína inmunoprecipitada.

Cuando este tipo de experimentos se realizaron en linfocitos T de sangre periférica, los resultados mostraron que el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular también induce un aumento en la fosforilación en residuos de tirosinas de la cadena ζ (Fig 11B). Sin embargo, la cinética de fosforilación de la cadena ζ y de sus proteínas asociadas en linfocitos T de sangre periférica estimulados a través de CD43 fue ligeramente diferente a la observada en células Jurkat. La cadena ζ está fosforilada desde el minuto de estímulo y alcanzó una fosforilación máxima a los 5 minutos de estímulo (Fig 11B). Las dos proteínas fosforiladas asociadas con la cadena ζ en respuesta al entrecruzamiento de CD43 también se identificaron como ZAP-70 y Vav (Fig 11B). La fosforilación de estas dos proteínas se observó solo a los 5 minutos de estimulación, coincidiendo con la fosforilación máxima de la cadena ζ . En su conjunto, estos resultados sugieren que tanto en células Jurkat como en linfocitos T aislados de sangre periférica, las señales mediadas por CD43 inducen un incremento en la fosforilación de tirosinas de la cadena ζ , lo que permite el reclutamiento de las proteínas ZAP-70 y Vav.

II CD43 recluta a la cinasa ZAP-70

La fosforilación en residuos de tirosina de la cadena ζ permite el reclutamiento de proteínas con dominios SH2 tales como ZAP-70, una de las principales proteínas que, a través de sus dominios SH2, se asocia a las tirosinas fosforiladas de los ITAMs de la cadena ζ [Weiss, 1992]. A su vez, la asociación de ZAP-70 con la cadena ζ permite que ZAP-70 sea fosforilada y activada por Lck, iniciándose una cascada de eventos de fosforilación a través de los cuales se reclutan distintas proteínas de señalización como LAT y SLP-76 (66).

La asociación entre la cadena ζ y la cinasa ZAP-70 que observamos en respuesta al entrecruzamiento de CD43 nos llevo a evaluar si el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular induce un aumento en la actividad de cinasa asociada a la cadena ζ . Para ello, se realizaron ensayos de cinasa *in vitro* a partir de inmunoprecipitados de ζ aislados de células estimuladas a través de CD43 por distintos tiempos. Los complejos inmunes se separaron por SDS-PAGE en geles al 12%, y se transfirieron a membranas de

nitrocelulosa. La incorporación *in vitro* de ^{32}P en proteínas presentes en el complejo inmune se evaluó por autoradiografía. Estos experimentos revelaron que a diferencia de las células sin estimular, las señales mediadas por CD43 inducen un incremento en la fosforilación *in vitro* de tres proteínas con pesos moleculares de ~23, ~50 y ~70 kDa (Fig 12A). Mediante inmunoblot, la proteína de ~23 kDa se identificó como la cadena ζ y la proteína de 70 kDa como la cinasa ZAP-70. La proteína de ~50 kDa probablemente corresponde a las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas o a una proteína aún no identificada. Un blot anti-cadena- ζ muestra que cantidades equivalentes de proteína fueron inmunoprecipitadas en cada uno de los carriles. Estos datos sugieren que el reclutamiento de ZAP-70 a la cadena ζ induce la activación de ZAP-70, y que la actividad de cinasa asociada a ζ observada en respuesta a señales mediadas por CD43, puede reflejar esta activación.

Para sustentar con mayor certeza la participación de la cinasa ZAP-70 en la vía de señalización de CD43, se realizaron inmunoprecipitados de ZAP-70 de células Jurkat estimuladas a través de CD43 por distintos tiempos y se evaluó el estado de fosforilación en residuos de tirosina de ZAP-70. Los resultados mostrados en la Fig 12B, demuestran que a diferencia de lo que se observa en células sin estimular, las señales mediadas por CD43 inducen un aumento transitorio en la fosforilación en residuos de tirosinas de ZAP-70. Este evento de fosforilación fue máximo a los tres minutos de estímulo y regresó a niveles basales a los cinco min. Un blot anti-ZAP-70 sobre la misma membrana, demuestra cantidades equivalentes de proteína inmunoprecipitada en todos los carriles.

Una vez fosforilada y activada, la cinasa ZAP-70 induce la fosforilación en tirosinas de distintas proteínas. Entre las principales proteínas que son blanco de fosforilación por ZAP-70 se encuentra la proteína adaptadora LAT (66). Para corroborar la participación de la cinasa ZAP-70 en la vía de señalización de CD43, decidimos evaluar el estado de fosforilación de LAT en respuesta al entrecruzamiento de CD43. Con este objetivo, células Jurkat se estimularon a través de CD43 por distintos tiempos y el estado de fosforilación de LAT se evaluó mediante un blot anti-fosfotirosinas sobre lisados totales. En la Fig 12C se muestra un aumento en la fosforilación de tirosinas de una proteína de 36/38 kDa con respecto a células sin estimular. Este aumento en la fosforilación se observó desde el minuto de estímulo y se mantuvo por lo menos hasta los

10 minutos. Mediante inmunoblot, la proteína de 36/38 kDa se identificó como LAT a la vez que se verifica el cargado equivalente de proteína en cada uno de los carriles. En conjunto, estos resultados sugieren la participación de la proteína adaptadora LAT en la vía de señalización mediada por CD43, probablemente como resultado de su fosforilación mediada por ZAP-70.

III Las señales mediadas por CD43 inducen la actividad de cinasa de Lck y Fyn

En linfocitos T, la fosforilación en residuos de tirosina de la cadena ζ está mediada por las cinasas Lck y Fyn. Resultados previos de nuestro laboratorio así como otros reportados (38, 201) han demostrado una asociación de las cinasas Fyn y Lck con el dominio intracelular de CD43. Sin embargo, la actividad de cinasa de estas dos proteínas en respuesta a CD43 no ha sido determinada. Para evaluar la participación de las cinasas Lck y Fyn en la vía de señalización de CD43 se hicieron ensayos de cinasa *in vitro* de inmunoprecipitados de Fyn o Lck de células Jurkat estimuladas a través de CD43 por distintos tiempos. Para este tipo de ensayos, se utilizó enolasa, un sustrato exógeno cuyo estado de fosforilación refleja el estado activo de la enzima. En la Fig 13 se observa que las señales mediadas por CD43 inducen un aumento en la fosforilación de la enolasa mediada por Fyn. A los tres minutos de estímulo, Lck registró un primer pico de actividad; a los cinco minutos, la fosforilación de la enolasa fue semejante a la basal y a los diez minutos se observó un nuevo pico de fosforilación. Para el caso de Lck, la cinética de fosforilación de enolasa también mostró un comportamiento bifásico en respuesta a las señales mediadas por CD43. El primer pico de actividad de Lck se observó al minuto de activación, mientras que a los cinco minutos la fosforilación de enolasa fue comparable a la basal. Finalmente a los diez minutos Lck presentó un segundo pico de actividad reflejada por un incremento en la fosforilación de enolasa (Fig 13). Una tinción con azul de Coomassie muestra cantidades equivalentes del sustrato en los distintos carriles, por lo que las diferencias observadas en los niveles de fosforilación de la enolasa reflejan la actividad enzimática de Lck o Fyn. Adicionalmente, los inmunoblots anti-Fyn y -Lck muestran cantidades similares de proteína en cada uno de los carriles. Estos resultados sugieren la participación de las cinasas de la familia Src, Lck y Fyn en las señales mediadas por CD43.

IV Lck media la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ mediada por CD43

Para determinar si las cinasas Lck y Fyn reclutadas por la vía de señalización de CD43 son redundantes en mediar la fosforilación de la cadena ζ inducida por las señales de CD43, se utilizó una línea celular derivada de células Jurkat deficiente en la expresión de Lck (JCaM) (Fig 14). Evaluamos la contribución de Lck en mediar la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ mediante inmunoprecipitados de la cadena ζ de células JCaM (mutante) y Jurkat (silvestre) estimuladas a través de CD43 por distintos tiempos. En la Fig 14 se observa que en células JCaM, la fosforilación en tirosinas de ζ así como de sus proteínas asociadas es prácticamente nula durante toda la cinética de activación que abarco de los 30 seg a 10 min. Por otro lado, en células Jurkat la fosforilación de ζ y de sus proteínas asociadas aumentó de manera dependiente del estímulo recibido a través de CD43 como se observó anteriormente. El blot anti-cadena ζ muestra que tanto células JCaM como Jurkat expresan niveles semejantes de la cadena ζ . Estos resultados sugieren que Lck es la cinasa responsable de mediar la fosforilación en residuos de tirosina de la cadena ζ inducida por CD43 y que en ausencia de Lck, la cinasa Fyn no parece ser suficiente para llevar a cabo este evento.

V CD43 induce la polarización de la cadena ζ pero no del complejo TCR-CD3

La activación de linfocitos T conduce frecuentemente a la redistribución de distintas proteínas de superficie así como intracelulares, dando lugar a la formación de una estructura denominada "cap". Esta redistribución molecular es un evento dinámico y altamente regulado, precedido por y dependiente de cascadas de fosforilación. Se sugiere que la formación de un "cap" permite estabilizar eventos de señalización necesarios para inducir respuestas tardías. La aplicación de un estímulo focal mediado por el contacto entre los linfocitos y las esferas de latex, permite evaluar la polarización celular de una proteína. Para evaluar si el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular induce la polarización de la cadena ζ , se estimularon linfocitos T con esferas de latex recubiertas con mAbs anti-CD43, anti-CD3, RaMIG o recubiertas de BSA en una relación de 2:1 en un volumen de 50 μ l. La mezcla se centrifugó por 5 min a 700 rpm y se incubó por

distintos tiempos a 37°C. Los conjugados esfera:célula se fijaron por 10 min a temperatura ambiente con paraformaldehído al 2%, y mediante microscopía confocal se evaluó la distribución celular de ζ y del complejo TCR/CD3.

En la Fig. 15A, se observa que el entrecruzamiento de CD43 con esferas de latex recubiertas con L10 induce la polarización de ζ hacia los sitios de contacto entre linfocito T y esfera, comparado con la distribución homogénea de ζ en la superficie celular de las células control. La polarización de ζ se observó desde los 2 min de estímulo y se mantuvo por lo menos hasta los 30 min. El porcentaje de polarización inducida por L10 fue del $76\% \pm 12$ vs $27\% \pm 8$ en células incubadas con esferas de latex-RaMIG. Interesantemente, las señales mediadas por CD43 no tuvieron efecto sobre la distribución celular del complejo TCR/CD3 en ninguno de los tiempos de activación evaluados (Fig. 15A).

Estos resultados sugieren que el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular induce la redistribución de la cadena ζ hacia los sitios de contacto establecidos por CD43 y corroboran la participación de la cadena ζ como componente en la vía de señalización mediada por CD43. El hecho de que el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular no afecte la distribución del complejo TCR/CD3 hacia los sitios de contacto célula-esfera o algún punto distal, sugiere que la distribución celular de la cadena ζ y del complejo TCR/CD3 puede estar regulada independientemente por distintas moléculas.

En cambio, cuando los linfocitos se estimulan con esferas de latex recubiertas con anticuerpos anti-CD3 ϵ , se observa una exclusión de CD43 de la interfase entre célula y esfera como se ha descrito previamente (Fig 15B) y (189). Por último, como era de esperarse cuando los linfocitos T son estimulados con esferas de latex recubiertas con anticuerpos anti-CD43, se observa una concentración de CD43 hacia el sitio de contacto entre la célula y la esfera mientras que se observa una distribución homogénea de CD43 en la superficie celular de linfocitos T estimulados con esferas de latex recubiertas con RaMIG. Estos resultados sugieren que contrario a lo que ocurre con las señales generadas a través del TCR, las señales mediadas por CD43 no parecen afectar la distribución del complejo CD3.

VI CD43 también recluta a la cadena ζ en células NK

Las células NK son leucocitos que no expresan un receptor para el antígeno como los linfocitos B y T. Sin embargo, expresan receptores que reconocen los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas. Uno de ellos, CD16, es un receptor de baja afinidad para el dominio Fc de inmunoglobulinas. La forma transmembranal de CD16 se asocia de manera no covalente con la cadena ζ , la cual constituye parte importante del aparato de señalización en estas células (27, 226). CD43 es una proteína que desempeña distintas funciones en las diferentes células hematopoyéticas que regulan su expresión. En células NK, el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular activa cascadas de fosforilación que a su vez inducen síntesis de quimiocinas, actividad citotóxica y proliferación celular (3, 4). De acuerdo a lo anterior, se evaluó si en células NK, CD43 fosforila a la cadena ζ en residuos de tirosinas. Se realizaron inmunoprecipitados de la cadena ζ a partir de células NK estimuladas por tres minutos con anticuerpos anti-CD3 como control negativo, anti-CD16 o anti-CD43. El estado de fosforilación de la cadena ζ se evaluó mediante un blot anti-fosfotirosinas. Los resultados obtenidos muestran un incremento en la fosforilación en residuos de tirosina de la cadena ζ en células estimuladas a través de CD43 con respecto a células estimuladas con OKT3 (Fig 16A carriles 1 y 3). Las células estimuladas a través de CD16 (control positivo) mostraron también un incremento en la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ comparada con el efecto del anticuerpo anti-CD3 (Fig 16A carriles 1 y 2). Interesantemente, la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ en respuesta a CD43 resultó ser mayor a la inducida por el entrecruzamiento de CD16 (Fig 16A carriles 2 y 3). Un blot anti-cadena ζ muestra cantidades equivalentes de proteína inmunoprecipitada en cada uno de los carriles. Estos resultados sigieren que en células NK, CD43 también induce la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ .

Por otro lado, decidimos evaluar si las señales de CD43 inciden también sobre la distribución de la cadena ζ en la superficie celular de células NK. Con este objetivo, células NK se estimularon con esferas de latex de 3 μm recubiertas con el mAb L10 o con RaMIG como control negativo. Las células se incubaron por distintos tiempos a 37°C y mediante microscopía confocal se evaluó las distribución celular de la cadena ζ . En la Fig. 16B, se observa que el entrecruzamiento de CD43 con esferas de latex recubiertas

con L10 indujo la redistribución celular de ζ hacia los sitios de contacto entre células NK y esfera a los 30 min de estímulo. Por otro lado, la distribución de la cadena ζ en la superficie celular no parece afectarse en células estimuladas con esferas de latex recubiertas con RaMIG. A diferencia de lo observado en linfocitos T, en donde la redistribución de ζ en respuesta a CD43 fue observada desde los 2 min de estímulo, la polarización de ζ hacia los sitios de contacto esfera y células se observó solo a partir de los 30 min de estímulo. Estos resultados sugieren que en células NK, además de inducir la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ , CD43 también regula su redistribución en la superficie celular.

VII La coestimulación a través de CD43 y del TCR estabiliza la fosforilación de ZAP-70

El hecho de que CD43 reclute a la cadena ζ como componente de su vía de señalización, nos llevo a evaluar el efecto de la coestimulación a través del TCR y CD43 sobre la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ . Para ello se realizaron inmunoprecipitados de la cadena ζ de células Jurkat estimuladas simultáneamente a través del TCR y CD43 por distintos tiempos, y el grado de fosforilación de la cadena ζ se comparó con aquel inducido solo a través del TCR. Los datos mostraron un incremento en la fosforilación de tirosinas de ζ en respuesta al TCR con respecto al nivel de fosforilación de ζ en células sin estimular (Fig 17, carriles 1 vs 2-5). Adicionalmente, también se observó un aumento en la fosforilación de la cinasa ZAP-70 asociada a la cadena ζ . La fosforilación en tirosinas del binomio ζ /ZAP-70 en respuesta al TCR fue máxima al minuto de estímulo y permaneció estable hasta los cinco minutos de estímulo. A los 15 minutos, la fosforilación de la cadena ζ y de la cinasa ZAP-70 disminuyó, alcanzado niveles basales a los 30 minutos en respuesta al TCR. Interesantemente, cuando las células se estimulan simultáneamente a través del TCR y CD43, se observó que el grado de fosforilación de ZAP-70 asociada a la cadena ζ es mayor a los 15 y 30 min de estímulo comparada con la fosforilación observada en células estimuladas solo a través del TCR (Fig 17, carriles 2-5 vs 8-9). Sin embargo, a lo largo de la cinética de activación, la fosforilación de la cadena ζ no parece ser diferente en células estimuladas solo a través del TCR o estimuladas

simultáneamente a través del TCR y CD43. El blot anti- ζ demuestra cantidades equivalentes de proteína inmunoprecipitada en los distintos carriles. Estos resultados sugieren que cuando las células son estimuladas a través del TCR y CD43, la fosforilación de ZAP-70 es más estable a los 15 y 30 min de estímulo, mientras que la fosforilación de la cadena ζ parece ser similar a la observada en células estimuladas solo a través del TCR.

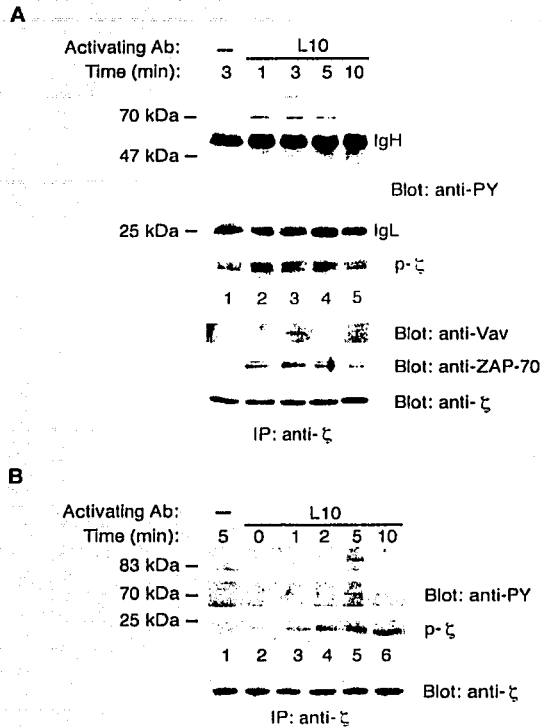


Figura 11. Las señales mediadas por CD43 inducen la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ. Células Jurkat J22 (2×10^7) (A) o linfocitos T humanos normales de sangre periférica (B) se estimularon con el mAb anti-CD43, L10 por diferentes tiempos a 37°C. Las células se lisaron y los lisados preclarificados con proteína A se incubaron con un mAb anti-cadena ζ. Los complejos inmunes se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con un mAb anti-fosfotirosina (4G10), y posteriormente con anticuerpos anti-ζ, -ZAP-70 y -Vav. Los marcadores de peso molecular (MW) se indican a la izquierda. Los datos son representativos de por lo menos cinco experimentos.

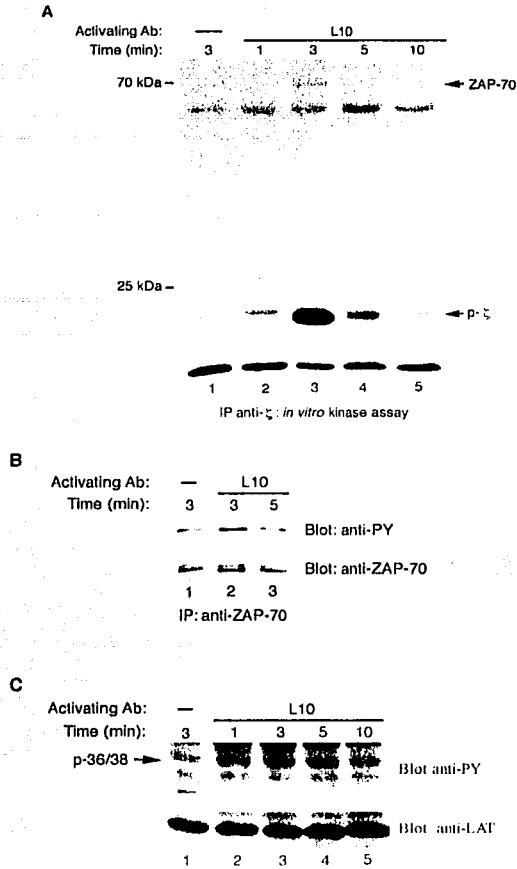


Figura 12. Las señales mediadas por CD43 inducen el reclutamiento de la cinasa ZAP-70. (A) Se realizaron ensayos de cinasa *in vitro* (IVK) de inmunoprecipitados de la cadena ζ de células Jurkat no estimuladas (carril 1) o estimuladas con el mAb anti-CD43, L10 (carriles 2-5). Los complejos inmunes se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se analizaron por autoradiografía. Las membranas se incubaron con los anticuerpos indicados. (B) Células Jurkat (2×10^7) se estimularon como se describió anteriormente y los lisados preclarificados se incubaron con un anticuerpo un mAb anti-fosfotirosina (4G10). Las mismas membranas se incubaron con un anticuerpo anti-ZAP-70. (C) Los lisados de células Jurkat estimuladas o no se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y la membrana se incubó con un mAb anti-fosfotirosina (4G10) previo a la incubación con un anticuerpo anti-LAT.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

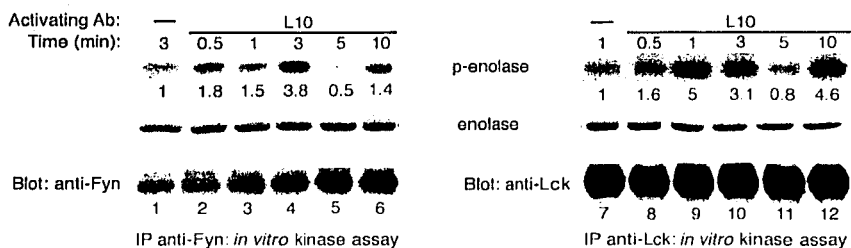


Figura 13. Las señales mediadas por CD43 inducen la actividad de las cinasas *Lck* y *Fyn*. Células Jurkat J22 (2×10^7) se estimularon con el mAb anti-CD43, L10 por diferentes tiempos a 37°C. Se realizaron ensayos de cinasa *in vitro* (IVK) de *Fyn* (carriles 1-6) o *Lck* (carriles 7-12) a partir de inmunoprecipitados purificados de lisados celulares. Los complejos inmunes se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se analizaron por autoradiografía. Las membranas se incubaron con anticuerpos anti-*Lck* o anti-*Fyn*. El sustrato (enolasa) contenido en los sobrenadantes se separaron por SDS-PAGE y la fosforilación *in vitro* se evaluó por autoradiografía. La tinción con azul de oomassie muestra cantidades equivalentes de enolasa en los ditintos carriles. Los datos son representativos de por lo menos cuatro experimentos.

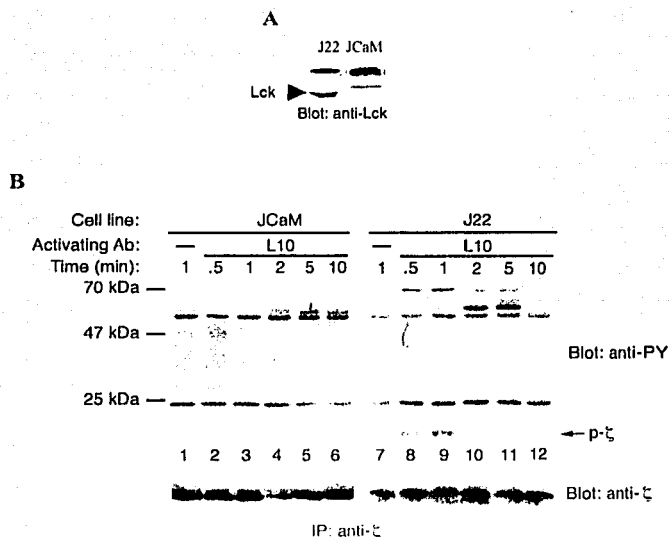


Figura 14. (A) Blot anti-Lck de lisados totales de células J22 y JCaM **(B)** Lck induce la fosforilación en residuos de tirosina de la cadena ζ mediada por CD43. Células JCaM (carriles 1-5) o J22 (carriles 6-10) se estimularon con el mAb anti-CD43, L10 por diferentes tiempos a 37°C. Los lisados preclarificados con proteína A se incubaron con un mAb anti-cadena ζ . Los complejos inmunes se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que se incubaron con un mAb anti-fosfotirosina y posteriormente con un mAb anti-cadena ζ . Los datos son representativos de por lo menos cuatro experimentos.

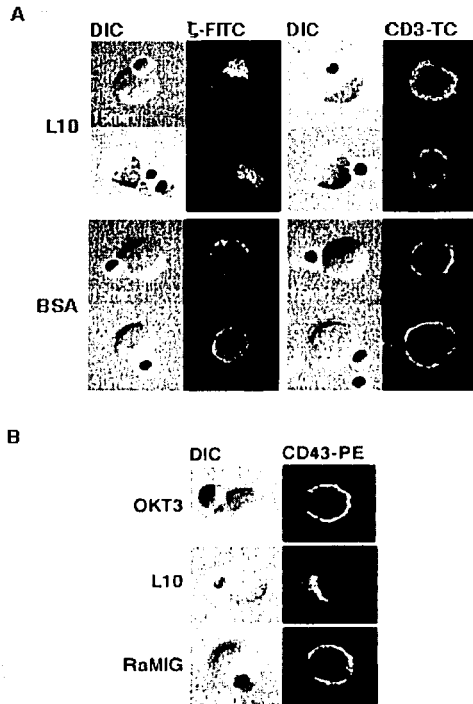


Figura 15. Las señales mediadas por CD43 inducen la redistribución de la cadena ζ en linfocitos T. Los linfocitos T se incubaron con esferas de latex recubiertas con L10, un mAb anti-CD43 (A) o alternativamente con esferas de latex recubiertas con OKT3 (anti-CD3), L10 (anti-CD43), RaMIG.

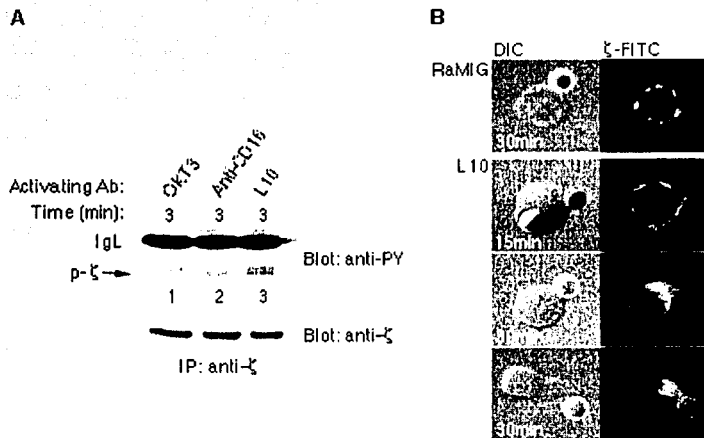


Figura 16. Las señales mediadas por CD43 inducen el reclutamiento de la cadena ζ en células NK. (A) Células NK (2×10^7) humanas normales de sangre periférica se estimularon con el mAb anti-CD43, L10 por tres minutos a 37°C . Las células se lisaron y los lisados preclarificados con proteína A se incubaron con un mAb anti-cadena ζ . Los complejos inmunes se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con un mAb anti-fosfo tirosina (4G10) y luego con un mAb anti- ζ (B) Las células NK se incubaron con esferas de latex recubiertas con L10, un mAb anti-CD43 o alternativamente con esferas de latex recubiertas con RaMIG.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

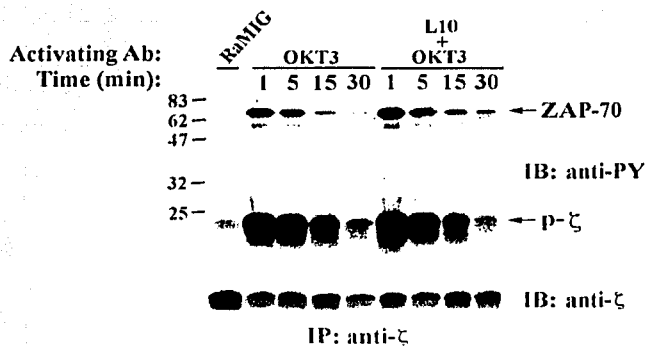


Figura 17. Las señales mediadas por CD43 estabilizan la fosforilación en tirosinas de ZAP-70 mediada por el TCR. Células Jurkat J22 (2×10^7) se estimularon con el mAb anti-CD43, L10, con el mAb anti-CD3, OKT3 o ambos por diferentes tiempos a 37°C. Las células se lisaron y los lisados preclarificados con proteína A se incubaron con un mAb anti-cadena ζ. Los complejos inmunes se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con un mAb anti-fosfotirosina (4G10). Las mismas membranas se incubaron con anticuerpos anti-ζ. Los datos son representativos de por lo menos cinco experimentos.

TESIS CON
PALETA DE ORIGEN

VIII DISCUSIÓN

CD43 es una molécula coreceptora que regula distintas funciones celulares como adhesión, activación o muerte celular en linfocitos T (1), células dendríticas (2), células NK (3, 4), monocitos (5), así como neutrófilos (6, 7). El hecho de que se expresen diferentes isoformas de esta molécula y que se hayan descrito varios ligandos sugiere que cada una de las funciones reguladas por CD43 depende del ensamblaje de distintos complejos que activan distintas cascadas de señalización. A la fecha, los reportes de la literatura señalan que el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular induce el reclutamiento de una variedad de proteínas de señalización tales como miembros de la familia de cinasas de Src y de Syk, la cinasa de adhesión PYK2, proteínas adaptadoras como Shc y SLP-76, el GEF Vav, las MAPK cinasas ERK1/2 y p38, así como los factores transcripcionales NF-AT y NF- κ B (201, 204, 205, 222). Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos tempranos de señalización a través de los cuales CD43 conlleva al reclutamiento de toda esta gama de proteínas de señalización.

La fosforilación en residuos de tirosinas de la cadena ζ es uno de los eventos más tempranos de señalización que ocurre en respuesta al entrecruzamiento del complejo TCR en la superficie celular. La fosforilación en tirosinas de la cadena ζ conlleva al reclutamiento de proteínas con dominios SH2 tales como ZAP-70 y la subunidad p85 de PI3-K. La formación de este complejo constituye el primer punto de diversificación de la cascada de señalización en respuesta al TCR.

En este trabajo demostramos que el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular de linfocitos y de células Jurkat induce la fosforilación de la cadena ζ en residuos de tirosina. La cinética de fosforilación de la cadena ζ en respuesta a señales mediadas por CD43 se observó desde los 30 seg de estímulo y se mantuvo por lo menos hasta lo diez min. Estos resultados sugieren que la fosforilación de la cadena ζ es un evento temprano en la vía de señalización de CD43.

La fosforilación de la cadena ζ mediada por CD43 resultó en el reclutamiento y fosforilación de dos proteínas con masas moleculares de 70 y 95 kDa asociadas a la cadena ζ . Estas dos proteínas se identificaron respectivamente como la cinasa ZAP-70 y

el factor intercambiador de nucleótidos de guanina Vav. La fosforilación de ZAP-70 se observó a lo largo de toda la cinética de estímulo a través de CD43 y fué semejante a la de la cadena ζ . Por su parte, la fosforilación y asociación de Vav con la cadena ζ en respuesta a las señales mediadas por CD43 solo se observaron a los cinco min de estímulo. Estos resultados sugieren que a diferencia de ZAP-70, el reclutamiento de Vav a la vía de señalización de CD43 es un evento que parece estar más restringido en el tiempo. Las distintas cinéticas de fosforilación de la cadena ζ así como de sus proteínas asociadas observadas entre células Jurkat y linfocitos T de sangre periférica pueden deberse a diferencias intrínsecas entre ambos tipos celulares así como a diferencias entre los mismos donadores.

Si bien ZAP-70 puede asociarse directamente con las tirosinas fosforiladas de los ITAMs a través de sus dominios SH2, la asociación de Vav con la cadena ζ es indirecta y puede ser mediada por proteínas que se asocian directamente con la cadena ζ tales como la proteína adaptadora Shc o la cinasa ZAP-70 (117). Trabajos de nuestro laboratorio han reportado que en linfocitos T humanos, el entrecruzamiento de CD43 induce la fosforilación de la proteína Shc en residuos de tirosina, promoviendo la formación de complejos Shc/Grb2/Vav (204). De acuerdo a esto, sería posible que la proteína Shc estuviese mediando la asociación de Vav con la cadena ζ observada en células estimuladas a través de CD43. Sin embargo, no detectamos una asociación de Shc con la cadena ζ en respuesta a las señales mediadas por CD43. Alternativamente, otra posibilidad sería que la cinasa ZAP-70 asociada a la cadena ζ sirva como puente para mediar la asociación entre Vav y la cadena ζ . En apoyo a esta idea, se ha reportado que la fosforilación de la Tyr³¹⁵ de ZAP-70 permite el reclutamiento y asociación de Vav (117). Experimentos en células deficientes en la expresión de ZAP-70, así como la valoración de la fosforilación de la Tyr³¹⁵ de ZAP-70 mediante anticuerpos específicos para esta pTyr permitirán dar una conclusión al respecto.

El fenotipo inmunodeficiente de ratones que carecen de la expresión de ZAP-70 debido, en gran parte, a una reducción dramática en el número de linfocitos T maduros en la periferia resalta la importancia de esta cinasa en la señalización intracelular de células T (111). Por otra parte, Vav es un intercambiador de nucleótidos de guanina implicado en la activación de GTPasas de la familia Rho, regulando el citoesqueleto de actina y

parece ser indispensable en la formación de agregados moleculares del TCR (caps) (113, 114). Un análisis más detallado de la participación de estas moléculas en la vía de señalización de CD43 proporcionara más información acerca de las funciones precisas de ZAP-70 y Vav en la vía de señalización de CD43.

En este trabajo también demostramos que en linfocitos T y en células Jurkat, las señales mediadas por CD43 inducen un incremento en la actividad de cinasa asociada a la cadena ζ . Esta actividad de cinasa asociada a la cadena ζ se vio reflejada por un incremento en la fosforilación *in vitro* de tres proteínas presentes en los inmunoprecipitados de la cadena ζ . Estas proteínas de ~23 kDa, 55 kDa y 70 kDa se identificaron como las formas fosforiladas de la cadena ζ , las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas y la cinasa ZAP-70 respectivamente. La ausencia de las cinasas Lck y Fyn en los inmunoprecipitados de la cadena ζ sugiere que ZAP-70 es la única cinasa presente en los inmunoprecipitados de la cadena ζ de células estimuladas a través de CD43 y que las señales mediadas por CD43 inducen la formación de un complejo de señalización activo formado por el binomio cadena ζ /ZAP-70 que permite iniciar distintas cascadas de señalización intracelular.

Para corroborar la participación de ZAP-70 en la vía de señalización de CD43, se evaluó el estado de fosforilación de ZAP-70 en respuesta al entrecruzamiento de CD43 en inmunoprecipitados de ZAP-70. Los resultados mostraron que las señales mediadas por CD43 inducen un incremento en la fosforilación en residuos de tirosina de ZAP-70. Sin embargo, ZAP-70 es una proteína que tiene cinco residuos de tirosina fosforilables, de los cuales dos regulan positivamente la función de ZAP-70. Entre las tirosinas que regulan de manera positiva la actividad de ZAP-70 se encuentran las Tyr³¹⁵, la cual recluta a Vav, y la Tyr³¹⁹ cuya mutación inhibe la actividad catalítica de ZAP-70 (66, 117). El reclutamiento de Lck, a través de su dominio SH2, a esta tirosina es crucial para estimular la actividad de cinasa de ZAP-70. En contraste, la Tyr²⁹² regula de manera negativa la actividad de ZAP-70 al favorecer el reclutamiento de Cbl, una molécula adaptadora que controla negativamente la señalización a través del TCR. La actividad de ZAP-70 es además regulada negativamente por fosforilación de la Tyr⁴⁹², la cual afecta la actividad de cinasa de ZAP-70, y por fosforilación de la Tyr⁵⁹⁸, en el extremo carboxilo

terminal de ZAP-70 (66). De acuerdo a lo anterior será interesante determinar que tirosinas de ZAP-70 son fosforiladas en respuesta a la vía de señalización de CD43.

La proteína adaptadora LAT representa uno de los principales blancos de fosforilación de ZAP-70. La fosforilación de LAT crea sitios de reclutamiento para dominios SH2 presentes en proteínas como PLC γ , la subunidad p85 de PI3-K, la proteínas adaptadoras Shc y Gads, lo cual resulta en la formación de complejos de señalización que se diversifican en distintas cascadas de fosforilación (231-234). Para corroborar la participación de ZAP-70 en la vía de señalización de CD43, se evaluó la fosforilación de LAT en respuesta al entrecruzamiento de CD43. Los resultados mostraron que las señales mediadas por CD43 inducen un incremento en la fosforilación en residuos de tirosina de LAT, sugiriendo la participación de LAT en la vía de señalización mediada por CD43. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que las señales mediadas por CD43 incrementan la actividad transcripcional de HIV y su replicación en respuesta a estímulos mediados por el TCR. Interesantemente, en este mismo trabajo, se reporta que la cinasa Lck y las proteínas adaptadoras LAT y SLP-76 son necesarias para lograr el papel coestimulador de CD43 (167). Estos resultados confirman que las proteínas adaptadoras LAT y SLP-76 juegan un papel clave en el ensamblado de complejos de señalización de a partir de los cuales se propagan distintas señales intracelulares mediadas por CD43 (204).

Hasta el momento se considera que ZAP-70 es la única cinasa que induce la fosforilación de LAT en respuesta al entrecruzamiento del TCR (231-234) por lo que los datos que reportamos, sugieren que la cinasa ZAP-70 forma parte importante de la vía de señalización mediada por CD43. Adicionalmente, el incremento en la fosforilación en tirosinas de ZAP-70 sustentan la idea de que la cinasa ZAP-70 es activada cuando los linfocitos T son estimulados a través de CD43. LAT es una proteína que presenta nueve tirosinas potencialmente fosforilables, por lo que será interesante determinar cuantas y que tirosinas son fosforiladas en respuesta a las señales mediadas por CD43.

La participación de ZAP-70 en la vía de señalización de CD43 parece no ser el único ejemplo del reclutamiento de cinasas de la familia Syk por la vía de CD43, ya que

en células hematopoyéticas inmaduras, CD43 induce la fosforilación en residuos de tirosina de la cinasa Syk (223, 235). Interesantemente, en linfocitos T de sangre periférica de humanos sanos, las señales mediadas por CD43 también inducen la fosforilación y activación de la cinasa Syk (Layseca et al., 2003, en prensa). Estos datos nos llevan al planteamiento de si las cinasas Syk y ZAP-70 desempeñan funciones redundantes o diferenciales en la vía de señalización de CD43 en linfocitos T. En este sentido cabe mencionar que estas cinasas muestran distintos mecanismos de activación. Mientras la activación de ZAP-70 es dependiente de la presencia de cinasas de la familia Src, la activación de Syk puede ser independiente de estas, ya que la interacción de Syk con la cadena ζ parece ser suficiente para estimular la actividad de cinasa de Syk (66, 109, 236). Estos datos sugieren que Syk puede tener funciones independientes de la participación de cinasas de la familia de Src en la vía de señalización mediada por CD43.

Las cinasas de la familia Src juegan un papel clave en la señalización no solo a través del TCR sino que también son importantes para la señalización de distintas moléculas de superficie de linfocitos T (29, 30, 35, 36, 224, 237, 238). Uno de los eventos clave en el cual participan estas enzimas es la fosforilación de los ITAMs. El reclutamiento de miembros de la familia de cinasas de Src como Lck y Fyn a través de las señales de CD43 se ha demostrado anteriormente (38, 201). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se evaluó la actividad de cinasa de estas dos proteínas en respuesta a las señales de CD43. Mediante ensayos de cinasa *in vitro*, en este trabajo que el entrecruzamiento de CD43 en la superficie de células T induce un aumento en la actividad de cinasa de Lck y Fyn. Es interesante hacer notar que a los cinco minutos de estímulo se observa una disminución en la actividad de cinasa tanto de Lck y Fyn, volviendo a registrarse un segundo pico de actividad enzimática a los diez minutos, lo que refleja un comportamiento bifásico de la activación de Lck y Fyn en respuesta a señales mediadas por CD43. La ausencia de incrementos en los niveles de fosforilación de Fyn y Lck en los ensayos de cinasa realizados a partir de inmunoprecipitados de Lck y Fyn de lisados de células activadas a través de CD43, puede deberse a una fosforilación elevada de estas cinasas en estado basal como se ha reportado previamente (239), o alternativamente, a la comigración de las cadenas pesadas de las inmonuglobulinas con

las cinasas Lck y Fyn. Sin embargo, cuando los inmunoprecipitados de Lck o Fyn de células estimuladas a través de CD43 se analizaron mediante un blot anti-PY, pudo observarse un aumento en los niveles de fosforilación de Lck y Fyn. Sin embargo, el mecanismo exacto a través del cual las señales mediadas por CD43 regulan la actividad enzimática de Lck y Fyn se desconoce.

Debido a que tanto Lck como Fyn pueden inducir la fosforilación *in vitro* de los ITAMs presentes en el complejo CD3- ζ (108), evaluamos la capacidad de cada una de estas cinasas de inducir la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ en respuesta a las señales dependientes de CD43. Los experimentos realizados en células Jurkat deficientes en la expresión de Lck (células JCaM) muestran que Lck es necesaria para mediar la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ y permitir la asociación subsecuente de las proteínas ZAP-70 y Vav. Estos datos sugieren entonces que Lck y Fyn desempeñan papeles diferenciales en la vía de señalización mediada por CD43, por lo menos al nivel de la fosforilación de la cadena ζ .

En células deficientes en la expresión de Lck, la fosforilación de la proteína adaptadora SLP-76, la activación de la vía de las MAP cinasas y de los fosfoinosítidos así como la activación de NF-AT y la expresión de CD69 parecen ser normales (107), lo que sugiere que en respuesta a las señales del TCR, Fyn puede mediar una vía de señalización alternativa, independiente de la fosforilación de la cadena ζ y de la cinasa ZAP-70. Es interesante hacer notar que la fosforilación de SLP-76, de las MAP cinasas así como la activación de NF-AT, AP-1 y NF κ B y la expresión de CD69, así como la producción de IL-2 y rearrreglos del citoesqueleto son también eventos inducidos por CD43 (201, 204, 205), por lo que será importante valorar la participación de Fyn en estos eventos.

La participación de cinasas de la familia Src en la vía de señalización de CD43 no es exclusiva de linfocitos T, ya que en células hematopoyéticas el entrecruzamiento de CD43 induce la fosforilación en residuos de tirosina de la cinasa Lyn (223). Estos resultados sugieren que las cinasas de la familia Src son parte importante en la vía de señalización mediada por CD43 en distintas células hematopoyéticas y habrá que evaluar si la participación de cinasas de la familia Src en otras células hematopoyéticas conlleva también a la fosforilación de dominios ITAMs en estas células.

La redistribución de proteínas intracelulares tiene un papel activo en darle lugar y forma a las distintas cascadas de señalización intracelular (240-242). La redistribución de la cadena ζ hacia microdominios membranales denominados “rafts” regula positivamente la fosforilación de la cadena ζ (239), mientras que la exclusión de la fosfatasa SHP-1 de complejos de señalización ricos en fosfotirosina proporciona estabilidad temporal a las cascadas de fosforilación (243, 244). Estos datos sugieren que la redistribución de ciertas proteínas juega un papel importante en la regulación de las cascadas de señalización intracelular. En este sentido decidimos evaluar si las señales mediadas por CD43 regulan la distribución celular de la cadena ζ .

Utilizando esferas de latex recubiertas con anticuerpos anti-CD43 (L10), encontramos que las señales mediadas por CD43 inducen la redistribución de la cadena ζ hacia las zonas de contacto establecidas entre linfocito y esfera. Esta polarización es rápida ya que se detectó desde los cinco min de estímulo y se mantuvo por lo menos durante 30 min. Interesantemente, la distribución del complejo CD3 no se modificó en respuesta al entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular, contrariamente a lo que sucede cuando las células son estimuladas a través del TCR (186, 187, 189). Estos resultados sugieren que la distribución celular de la cadena ζ y del complejo TCR-CD3 puede ser regulada independientemente, por lo menos en respuesta al entrecruzamiento de CD43. El hecho de que las señales mediadas por CD43 no afecten la distribución del complejo CD3 puede deberse a que estas no inciden sobre la fosforilación de residuos de tirosina del complejo CD3, por lo que determinar si las señales mediadas por CD43 inducen la fosforilación del complejo CD3 permitirá dar una conclusión al respecto. Por otro lado, se sabe que la fosforilación de la cadena ζ se favorece cuando esta se recluta a microdominios membranales en los que las cinasas Lck y Fyn son abundantes (239). Si bien demostramos que la cadena ζ se fosforila en respuesta a las señales de CD43, con los estudios realizados en este trabajo no podemos determinar si las señales mediadas por CD43 inducen la redistribución de la cadena ζ hacia microdominios lipídicos, favoreciendo su fosforilación.

La participación de la proteína Vav es esencial en el reclutamiento de la cadena ζ hacia el citoesqueleto de actina necesario para permitir su redistribución en respuesta a señales mediadas por el TCR (114). En este trabajo hemos puesto en evidencia una

asociación de la cadena ζ con Vav en respuesta a las señales mediadas por CD43. De acuerdo a lo anterior, es posible que a través de la asociación entre Vav y la cadena ζ , las señales mediadas por CD43 promuevan en reclutamiento de la cadena ζ hacia las fibras de actina, para inducir la redistribución de la cadena ζ . Experimentos llevados a cabo en células deficientes en la expresión de Vav permitirían evaluar el papel de Vav en la regulación de la redistribución de la cadena ζ en respuesta a señales CD43-específicas.

Por otro lado, es interesante hacer notar que, a diferencia de la redistribución de CD43 mediada por señales dependientes del TCR (186, 187, 189), las señales mediadas por CD43 parecen afectar únicamente la distribución de la cadena ζ , y no la del complejo CD3. Debido a que la cadena ζ forma también parte importante del aparato de señalización del TCR, resultará interesante determinar si la fosforilación de la cadena ζ inducida por las señales de CD43 afecta a aquella inducida en respuesta al entrecruzamiento del TCR. Así mismo será necesario evaluar la distribución de la cadena ζ respecto a CD43 y al TCR en condiciones de coestimulación a través de ambas moléculas.

Como mencionamos anteriormente, CD43 es una sialoglucoproteína expresada en la superficie celular de todas las células de origen hematopoyético exceptuando, linfocitos B no activados y eritrocitos (123-126). En células NK, las señales mediadas por CD43 además de incrementar su actividad citotóxica y proliferación (4), estimulan la secreción de distintas quimiocinas como RANTES y la proteína inflamatoria de macrófagos (195), lo que sugiere que en células NK, CD43 es una molécula que participa en la regulación de funciones importantes. Sin embargo, poco se sabe de las señales intracelulares a través de las cuales CD43 regula estos procesos.

En células NK, la cadena ζ forma parte importante del aparato de señalización de CD16 y CD2 (27, 224), y a través de su reclutamiento, estos receptores son capaces de inducir cascadas de señalización que conllevan a distintas respuestas celulares (27). En este trabajo mostramos que en células NK, la cadena ζ es fosforilada en residuos de tirosina en respuesta a señales mediadas por CD43. Además, a semejanza de lo que se observó en linfocitos T, las señales mediadas por CD43 inducen la redistribución de la cadena ζ hacia los sitios de contacto establecidos entre célula y esfera. Estos resultados

sugieren que en células NK, la cadena ζ forma también parte del aparato de señalización de CD43. Será interesante determinar si la fosforilación de la cadena ζ en células NK en respuesta al entrecruzamiento de CD43 permite también el reclutamiento de la cinasa ZAP-70 y de proteínas adaptadoras como LAT, ya que sabe que estas dos proteínas juegan igualmente un papel importante en la señalización en células NK (245, 246).

Los resultados que reportamos en este trabajo sugieren que las proteínas de andamiaje tales como la cadena ζ y LAT son elementos importantes de la vía de CD43. Se sabe que una de las funciones centrales de estas moléculas es la de servir como centros organizadores a partir de los cuales se favorece el ensamblaje de complejos de señalización que, a su vez, permiten la diversificación de las cascadas de señalización (231-234). La función de la cadena ζ como principal módulo de reclutamiento de la cinasa ZAP-70 no parece ser esencial en la vía de señalización del TCR ya que el complejo CD3 parece sustituir gran parte de las funciones de la cadena ζ , lo cual puede verse reflejado por el fenotipo aparentemente normal de los ratones deficientes en la expresión de la cadena ζ (59). Sin embargo, en el caso de otras moléculas coreceptoras como CD43, donde la posible redundancia en los ITAMs del complejo CD3- ζ no parece aplicar, será interesante determinar si las funciones mediadas por CD43 se ven afectadas por la ausencia de la cadena ζ . Otras moléculas coreceptoras tales como CD2, CD5, CD16, CD26, CD38, CD71 (27, 35, 224, 227, 238, 247, 248) reclutan a la cadena ζ . Esto sugiere que el reclutamiento de la cadena ζ como parte de la maquinaria de señalización de una proteína de superficie celular es un mecanismo recurrente, a partir del cual distintas moléculas coreceptoras pueden generar cascadas de señalización intracelular. Sin embargo, hasta el momento se desconoce como todas ellas inciden al nivel de la fosforilación de la cadena ζ y como esta integra la información proveniente de distintas moléculas de superficie celular.

En linfocitos T, CD43 induce un aumento en los niveles de fosfatos de inositol y de diacilglicerol, lo que conlleva a la movilización de Ca^{2+} intracelular y a la activación de la proteína cinasa C (PKC) (203, 249). Así mismo, el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular induce la fosforilación en residuos de tirosina de distintas proteínas

como la cinasa Fyn, PLC- γ , Syk, y los complejos macromoleculares Shc/Grb2/SLP-76 y SLP-76/Vav (201, 204, 223, 235). Si bien es cierto que las cinasas de la familia Src, Lck y Fyn se encuentran asociadas a la cola citoplasmática de CD43, no se ha propuesto un mecanismo a través del cual CD43 reclute y active a las distintas proteínas que participan su vía de señalización intracelular. Un mecanismo general en la regulación de estas proteínas de señalización es su redistribución hacia distintos compartimentos celulares, lo que permite que enzimas como PLC- γ tengan accesibilidad a sus sustratos o bien quedan accesibles a ser fosforiladas o desfosforiladas por proteínas que se ubican en la membrana celular (242).

Los datos presentados en este trabajo nos permiten proponer que a través de la cadena ζ , CD43 induce el reclutamiento a la membrana de proteínas clave como la cinasa ZAP-70, con lo que se inicia una diversificación de cascadas señalización intracelular. Una vez ZAP-70 asociada a ζ , esta es activada e induce la fosforilación de LAT, y a través de LAT, PLC- γ , PI3-K, la vía de las MAP cinasas y distintas isoformas de PKC son activadas (66). El hecho de que la cadena ζ se concentre en las mismas regiones que CD43 en respuesta al enrecruzamiento de CD43 en la superficie celular sugiere una participación clave de esta molécula en la vía de señalización de CD43. Proponemos que en la vía de CD43, el reclutamiento de proteínas adaptadoras como ζ y LAT genera el ensamblado de complejos de señalización que a su vez activan cascadas de fosforilación río abajo.

CAPITULO III

PARTICIPACIÓN DE LA MOLECULA ADAPTADORA Cbl EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE CD43

En esta sección hemos extraído los datos de dos manuscritos (uno publicado y otro en preparación) referente a la participación de la molécula adaptadora Cbl en la vía de señalización de CD43. Los artículos se encuentran en el apéndice número I

I Las señales coestimuladoras mediadas por CD43 reclutan a la molécula adaptadora Cbl.

El entrecruzamiento del TCR en la superficie celular de linfocitos T induce la fosforilación en tirosinas de ZAP-70 y su activación, lo que permite diversificar la cascada de señalización (66, 250). La señalización a través del TCR también resulta en un incremento en la fosforilación en residuos de tirosina de Cbl y su subsecuente asociación con las cinasas Syk y ZAP-70 (208, 209). A su vez, la interacción de Cbl con Syk y ZAP-70 conlleva a un decremento en la actividad de cinasa de estas enzimas así como a una disminución en sus niveles de expresión como consecuencia de su degradación en un proceso dependiente de ubiquitinación (251).

Debido a que la coestimulación de linfocitos T a través de CD43 y el TCR induce una fosforilación estable y prolongada de ZAP-70 comparada con la de linfocitos T estimulados solo a través del TCR (capítulo II, Fig. 7), evaluamos la asociación de ZAP-70 con Cbl en respuesta a las señales mediadas a través de CD43, TCR o ambas. El entrecruzamiento de CD43 en la superficie de linfocitos T indujo un modesto incremento en la asociación entre ZAP-70 y Cbl; esta asociación se sostuvo hasta los cinco minutos de estímulo (Fig. 18A panel superior, carriles 2-5). Como ya ha sido reportado, las señales mediadas por el TCR también resultaron en un aumento transitorio en la asociación de ZAP-70 con Cbl (Fig. 18A, panel superior, carriles 6-9). Interesantemente, la coactivación de los linfocitos a través del TCR y CD43 resultó en un claro aumento en la interacción de ZAP-70 con Cbl, mayor al observado en células estimuladas solo a través del TCR o CD43 (Fig. 18A, panel superior, carriles 10-13). Un inmunoblot anti-Cbl muestra cantidades similares de proteína inmunoprecipitada en los distintos carriles (Fig. 18A, panel inferior). Estos resultados sugieren que la coestimulación a través de CD43 y el TCR prolonga la interacción de ZAP-70 con Cbl.

Recientemente se ha demostrado que la asociación de ZAP-70 con la cadena ζ y Cbl, juega un papel importante en la ubiquitinación dependiente de Cbl y la subsecuente

degradación del complejo TCR en respuestas a señales mediadas por este inmunoreceptor (252). De acuerdo a esto, evaluamos si las señales coestimuladoras de CD43 previenen la degradación de la cadena ζ fosforilada en residuos de tirosina. Inmunoprecipitados de la cadena ζ de linfocitos T estimulados a través de CD43 y/o el TCR se analizaron por inmunoblot anti-fosfotirosinas. Como se observa en la fig 18B, las células cuando son estimuladas a través del TCR por diez minutos hay un incremento en la fosforilación en tirosinas de la cadena de ζ . En linfocitos T estimulados a través de CD43 y TCR se observa que ésta es mayor que a la observada en células estimuladas solo a través del TCR (comparar carriles 3 y 4). Cuando las células son estimuladas unicamente a través de CD43 no se observó este incremento a lo diez minutos de estímulo, lo que concuerda con la fosforilación transitorio de la cadena ζ en respuesta a las señales de CD43 (capítulo II, Fig 9). Estos resultados sugieren que la coestimulación de linfocitos T a través de CD43 y TCR induce una mayor fosforilación de la cadena ζ que la inducida por el entrecruzamiento del TCR u que esta se prolonga por más tiempo.

Los resultados anteriores indican que la molécula adaptadora Cbl es reclutada por la vía de señalización de CD43. Por otra parte se ha reportado que la fosforilación en residuos de tirosina de Cbl juega un papel importante en mediar las funciones de esta proteína ya que permite regular su interacción con otras proteínas. Sin embargo, se ignora como el entrecruzamiento de CD43 lleva al reclutamiento de Cbl. Para abordar esta pregunta, se evaluó el estado de fosforilación en residuos de tirosina de Cbl en células estimuladas a través de CD43 o el TCR como control positivo. Como se muestra en la Fig 18C, en células estimuladas a través del TCR, se observó un incremento en la fosforilación de Cbl en residuos de tirosina desde el minuto de estímulo, alcanzando niveles máximos de fosforilación a los cinco min. En cambio, solo se detectaron niveles basales de fosforilación en residuos de tirosina en células estimuladas a través de CD43, aún al tiempo 5 min. Un blot anti-Cbl de la misma membrana muestra cantidades de proteína similar en los distintos carriles. Estos resultados sugieren que a diferencia de las señales mediadas por el TCR, las señales de CD43 no inducen la fosforilación de Cbl en residuos de tirosina.

La fosforilación en residuos de tirosina de Cbl favorece la asociación de esta molécula con los dominios SH2 de la subunidad p85 de PI3-K así como con el GEF Vav en respuesta a las señales de numerosos receptores. Los datos que mostramos en el presente trabajo, así como datos previos de nuestro laboratorio, indican que las señales de CD43 inducen la fosforilación en tirosinas de Vav y de p85 así como la coprecipitación de Vav y de ZAP-70 con la cadena- ζ . Por otra parte, los datos que presentamos en la Fig 18C indican que en respuesta a las señales de CD43 la fosforilación en tirosinas de Cbl no aumenta a diferencia de lo que ocurre cuando las señales son proporcionadas por el TCR (Fig 18C). Para evaluar con mayor precisión el mecanismo de reclutamiento de Cbl en respuesta a las señales de CD43, nos preguntamos si la fosforilación en residuos de serina de Cbl pudiera también favorecer la interacción de Cbl con Vav. Para ello, hicimos inmunoprecipitados de Cbl a partir de linfocitos T activados a través del TCR o de CD43, y los complejos inmunes se trataron con fosfatasa alcalina o con una fosfatasa específica de tirosinas (fosfatasa de Yersinia). Como se observa en la Fig18D, a pesar de no inducir la fosforilación en residuos de tirosina de Cbl (carril 2, panel superior), la activación de linfocitos T humanos de sangre periférica a través de CD43 por cinco min promovió la asociación de Cbl con Vav (comparar carriles 1 y 2, panel intermedio). Como era de esperarse, la activación a través del TCR resultó en un incremento en la fosforilación en tirosinas de Cbl así como de su asociación con Vav (comparar carriles 1 y 7, paneles superior e intermedio respectivamente).

El tratamiento de los inmunoprecipitados de Cbl con fosfatasa alcalina provocó la desfosforilación completa de las moléculas de Cbl inmunoprecipitadas a partir de células estimuladas a través de CD43 (comparar carriles 2 y 3, panel superior) o del TCR (comparar carriles 7 y 8, panel superior). La adición de β -glicerolfosfato (inhibidor de fosfatasas) previno este efecto (carriles 4 y 9) bloqueando parcialmente la interacción de Cbl con Vav. La adición de NaVO_4 reestableció esta asociación (comparar carriles 3 y 4, panel de intermedio). El tratamiento con fosfatasa alcalina tuvo un efecto menor sobre las interacciones de Cbl-Vav inducida por el TCR comparado con los inmunoprecipitados de Cbl en presencia de inhibidores de fosfatasa (carriles 8 y 9). El tratamiento con fosfatasa de Yersinia también resultó en una desfosforilación total de Cbl en células estimuladas a través del TCR o CD43 (carriles 5 y 10), mientras que la desfosforilación

se previno en presencia de NaVO_4 (carriles 6 y 11). Se observaron niveles equivalentes de las interacciones entre Cbl y Vav en los inmunoprecipitados de Cbl de células T estimuladas a través de CD43 después del tratamiento con PTPasa de Yersinia en presencia o ausencia de NaVO_4 (carriles 5 y 6); lo mismo se observó en inmunoprecipitados de Cbl de células T estimuladas a través del TCR (carriles 10 y 11). Un blot anti-Cbl muestra las cantidades de proteína en todos los carriles (Fig 18D panel inferior). Estos resultados sugieren que las interacciones entre Cbl y Vav mediadas por CD43 son independientes de la fosforilación en residuos de tirosina de Cbl. El dominio PTB de Cbl no se une a Vav fosforilada en tirosinas en respuesta al entrecruzamiento de CD43, excluyendo la posibilidad de que la interacción de Cbl con Vav pueda estar mediada por el dominio PTB de Cbl y los residuos de tirosina de Vav. En conjunto, estos datos sugieren que la asociación de Cbl y Vav puede estar mediada parcialmente por la fosforilación en residuos de serina o treonina de Cbl.

La proteína adaptadora Cbl es fosforilada en residuos de tirosina en respuesta a distintos estímulos extracelulares, lo que favorece su asociación con otras proteínas. En linfocitos T primarios así como en células Jurkat, la fosforilación en tirosinas de Cbl en residuos de tirosina resulta en su asociación con distintas proteínas como son ZAP-70, Syk, Fyn, la cinasa de lípidos PI3-K, el GEF Vav y la molécula adaptadora Crk (210-214). Se ha propuesto que una de las consecuencias de la interacción de Cbl con proteínas tales como ZAP-70 o la cadena ζ es la de mediar su degradación en un proceso dependiente de ubiquitinación (252). La ubiquitinación y degradación de la cadena ζ y de ZAP-70 mediada por Cbl puede explicar la sobreexpresión de estas dos proteínas en los timocitos del ratón deficiente en Cbl (220, 253, 254). Estos resultados sugieren que Cbl regula la expresión de las subunidades del complejo CD3 y de la cinasa ZAP-70 en linfocitos T, lo que a su vez influencia las cascadas de señalización a través del TCR. Una mayor fosforilación de ZAP-70 y de otras proteínas en general en los timocitos del ratón $\text{Cbl}^{-/-}$ apoyan esta idea (220, 253, 254). En conjunto, estos resultados han llevado a proponer que Cbl es una molécula que regula negativamente la señalización a través del TCR (251).

En este trabajo mostramos que las señales mediadas por CD43, inducen la asociación transitoria de ZAP-70 con Cbl. Si la asociación entre Cbl y ZAP-70 observada

en respuesta a las de CD43 resulta en la ubiquitinación de ZAP-70 y subsecuente degradación es algo que deberá determinarse. Por su parte y como era de esperarse, las señales mediadas por el TCR resultaron también en la asociación de ZAP-70 con Cbl, pero con una cinética distinta a la observada para CD43. La asociación de ZAP-70 con Cbl es respuesta a las señales mediadas por el TCR solo se observaron al min y a los dos min de estímulo, en una cinética de cinco min. Interesantemente, cuando los linfocitos T se estimulan a través de CD43 y el TCR, la asociación de ZAP-70 con Cbl se observó desde el min de estímulo hasta los cinco min. Estos datos sugieren que la coestimulación a través de CD43 y el TCR hacen más estable la asociación entre ZAP-70 y Cbl. Habrá que evaluar si esta estabilidad es resultado de un retardamiento en la degradación del complejo ZAP-70/Cbl.

En este trabajo también mostramos que la coestimulación a través de CD43 y el TCR por diez min induce niveles de fosforilación de la cadena ζ mayor a los observados en respuesta al TCR. Interesantemente, estas diferencias solo se observaron en la isoforma p23 de la cadena ζ que corresponde a la forma fosforilada en las seis tirosinas de los tres ITAMs. A diferencia de los resultados reportados en el capítulo II de este trabajo y obtenidos con cinéticas de hasta cinco min, este efecto solo se evaluó a los diez minutos por lo que es probable que la ausencia de la isoforma de 23 kDa de la cadena ζ en células estimuladas a través de CD43 se deba a que a este tiempo las señales mediadas por CD43 no inducen la fosforilación en tirosinas de la cadena ζ (Fig 19C). Estos resultados sugieren que la coestimulación a través de CD43 y el TCR induce una mayor fosforilación de la cadena ζ comparado la observada en respuesta al TCR. La mayor fosforilación de la cadena ζ podría resultar de diferencias en el grado de fosforilación o bien de desfosforilación de la cadena ζ , y esto de alguna manera podría prevenir o retardar la activación de una fosfatasa que mediara la desfosforilación de la cadena ζ . Alternativamente, las señales mediadas por CD43 podrían retardar la degradación de la cadena ζ mediada por Cbl en respuesta a las señales mediadas por TCR. En conjunto, estos resultados sugieren que la molécula adaptadora Cbl es reclutada por la vía de señalización de CD43 a través de un mecanismo dependiente de la fosforilación en residuos de serina, lo que a su vez podría constituir un mecanismo importante a través del cual las señales mediadas por CD43 regulen las cascadas de señalización en linfocitos T.

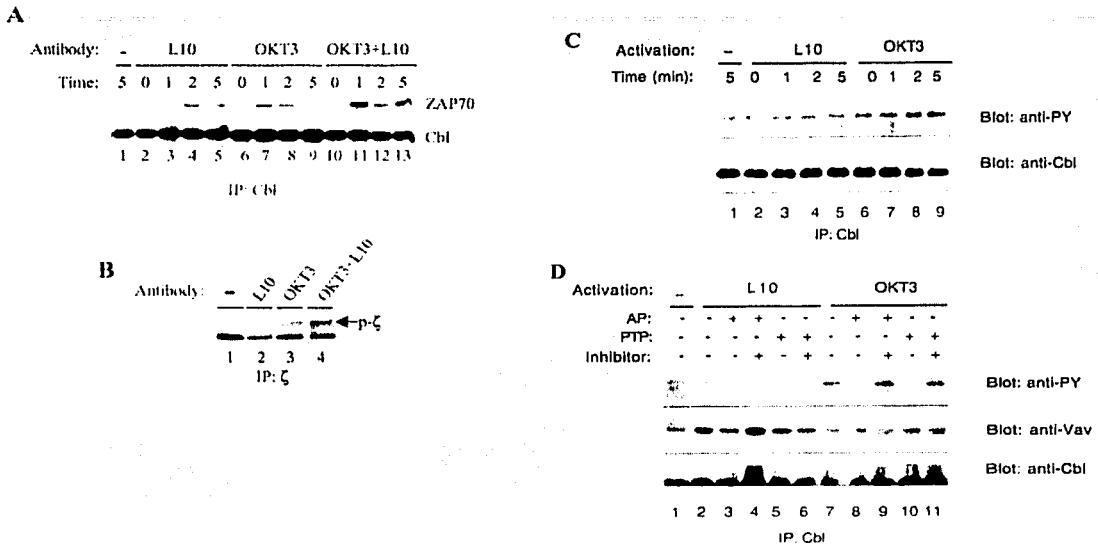


Figura 18. Las señales mediadas por CD43 inducen el reclutamiento de la proteína adaptadora Cbl. (A) Linfocitos T humanos normales (2×10^7) se estimularon con L10, OKT3 o ambos por diferentes tiempos a 37°C . Las células se lisaron y los lisados preclarificados con proteína A se incubaron con un mAb anti-Cbl. Los complejos inmunes se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, que se incubaron con un mAb anti-ZAP-70 y posteriormente con anticuerpos anti-Cbl. **(B)** Linfocitos T humanos normales (2×10^7) se estimularon con L10, OKT3 o ambos por diez minutos a 37°C . Los lisados celulares se preclarifican con proteína A e incubaron con un mAb anti-cadena ζ . Los complejos inmunes se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con un mAb anti-cadena ζ . **(C)** Linfocitos T humanos normales (2×10^7) se estimularon como en A. Los lisados preclarificados con proteína A se incubaron con un mAb anti-Cbl. Los complejos inmunes se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con un mAb anti-PY y posteriormente con anticuerpos anti-Cbl. **(D)** Linfocitos T humanos (2×10^7) se estimularon como en A. Los inmunoprecipitados de Cbl obtenidos a partir de lisados celulares se incubaron con fosfatasa alcalina en presencia o ausencia de β -glicerofosfato, o con fosfatasa de Yersinia en ausencia o presencia de NaVO_4 . Los complejos inmunes se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con un mAb anti-PY, y luego con anticuerpos anti-Cbl.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

¿Cuál es entonces la función de CD43 en la fisiología de un linfocito T? La respuesta a esta pregunta es complicada ya que CD43 parece regular distintas facetas de la respuesta inmune de un linfocito T. El hallazgo de que las proteínas ERM son importantes organizadores en la formación de un nuevo complejo proteico, distal a aquel formado en la interfase de una célula T con su APC, ha permitido proponer una posible función de este complejo en la fisiología de los linfocitos T (186, 255). CD43 fue el primer componente descrito de este complejo proteico denominado DPC por sus siglas en inglés (distal pole complex), pero en él se han localizado otras proteínas como son . La sobreexpresión de mutantes de las proteínas ERM que no pueden ser fosforiladas en residuos de serina y que funcionan como dominantes negativas, imposibilita la exclusión de CD43 del sitio de contacto entre célula T y APC (186, 255), mientras que la redistribución de PKC- θ o talina hacia el sitio de contacto así como la expresión de CD69 no parecen verse afectados (187), lo que sugiere que las cascadas de fosforilación tempranas en respuesta al TCR ocurren de manera normal. Sin embargo, la producción de IL-2 e INF- γ parecen verse afectadas por la sobreexpresión de dominantes negativas de ERM, aunque no todas las citocinas parecen afectarse de igual manera, ya que la expresión de IL-5 o TNF- α es aparentemente normal (186, 187, 255). Estos resultados indican que por un lado, las proteínas ERM participan de manera importante en la activación celular normal de linfocitos T, y por otra parte que, moléculas coreceptoras como CD43 parecen regular diferencialmente la producción de citocinas. En este sentido, se podría pensar que la redistribución diferencial de CD43 en la superficie celular juega un papel importante en la producción diferencial de citocinas durante distintas respuestas inmunes, y que la permanencia de CD43 en el sitio de contacto entre célula T y APC podría inhibir la producción de IL-2 e INF- γ sin afectar la secreción de IL-5 o TNF- α .

Aunque poco se sabe acerca de las señales tempranas que determinan la respuesta diferencial de los linfocitos T en respuesta a la estimulación antigénica, se han reportado diferencias en la participación y los niveles de activación de distintas proteínas que participan en la señalización temprana del TCR. Por ejemplo, la diferenciación de linfocitos T hacia un fenotipo Th2 correlaciona con con bajos niveles de activación de ZAP-70 y una ausencia de fosforilación de LAT [Boutin et al., 1997]. La participación de las proteínas ZAP-70 y LAT en la vía de señalización de CD43 podría contribuir con

esta señalización diferencial observada en distintos fenotipos celulares [Balamuth et al., 2001; Tanaka et al., 2003]. En apoyo a esta idea, el entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular induce la producción de INF- γ pero no de IL-4, lo que sugiere la participación de CD43 en favorecer respuestas celulares del tipo Th1 (Olivares, datos no publicados). Alternativamente, la fosforilación diferencial de LAT podría también contribuir con el establecimiento de distintas respuestas celulares. Ratones deficientes en la expresión de LAT que son reconstituidos con una mutante de LAT, en donde la Tyr¹³⁶ es sustituida por un residuo de fenilalanina imposibilitando su asociación con PLC- γ , contribuye con una diferenciación anormal hacia respuestas celulares del tipo Th2 [Aguado et al., 2002]. La valoración de cuales residuos de tirosina de LAT son fosforilados en respuesta al entrecruzamiento de CD43 podra darnos una mejor idea al respecto. En este sentido el reclutamiento del binomio molecular cadena ζ /ZAP-70 por la vía de CD43 podria conllevar al ensamblado de complejos moleculares que participen de manera diferencial en la señalización de linfocitos T. Por lo que será interesante determinar la contribución de moléculas como la cadena ζ , ZAP-70 o LAT en las respuestas celulares mediadas por CD43 y su contribución en la producción diferencial de citocinas.

Otro punto importante de resaltar es que la mayoría de los ligandos de CD43, son también reconocidos por otras moléculas. Por ejemplo, ICAM-1 es además ligando de LFA-1 (256), MHC-I de CD8 y el TCR (257) y Galectina-1 de CD45 (147). Un ejemplo interesante en donde una molécula es reconocida por más de un ligando lo constituye la molécula B71/2. B71/2 se espresa constitutivamente en la superficie de células presentadoras de antígeno pero su expresión aumenta en respuesta a señales mediadas por receptores TLRs (receptores semejantes a Toll) (258). En el caso de las interacciones entre un linfocito T y una APC, la molécula B7 es reconocida por CD28, una molécula coreceptora de linfocitos T (259). La interacción de CD28 con B7 desencadena señales coestimuladoras que comprometen al linfocito con el inicio de una repuesta inmune (260, 261). Además de la expresión de distintos genes para citocinas, CTLA-4 es una molécula cuya expresión en la superficie celular del linfocito T aumenta como resultado de la activación celular (262). CTLA-4 regula negativamente las señales intracelulares

emanadas del TCR, debido a su asociación con la fosfatasa de tirosinas Syp (230, 263). CTLA-4 compite con CD28 por la interacción con B7 ya que la afinidad entre CTLA-4 y B7 es mayor que la de CD28 con B7 (261). Esta interacción secuencial de B7 con CD28 y CTLA-4 constituye un mecanismo de regulación de la respuesta inmune en donde la interacción de CD28 con B7 genera señales de activación mientras que la interacción de CTLA-4 con B7 genera señales de atenuación (261). Interesantemente la ausencia de expresión de CTLA-4 en linfocitos T conlleva a un fenotipo de hiper reactividad que puede desencadenar en autoinmunidad (264). Este equilibrio entre las señales positivas y negativas asegura que un linfocito T no permanezca activado por un tiempo indefinido. Como B7, CD43 es una molécula que comparte sus ligandos con otras moléculas. Así por ejemplo, ICAM-1 es un ligando de CD43 (145) y de LFA-1 (256), MHC es ligando de CD43 (148) y de CD8 . Haciendo una analogía en el caso de B7/1/2 y CD28/CTLA-4, resulta atractivo pensar que CD43 pudiera competir con otras moléculas coreceptoras por la interacción con ligandos comunes y que las señales resultantes de estas interacciones fueran opuestas. En este sentido, será interesante evaluar las cinéticas de interacción de estas moléculas así como el tipo de señales intracelulares que resultan de cada interacción y sus consecuencias sobre la fisiología de un linfocito T. Si bien en este trabajo hemos reportado la participación de la cadena ζ en la vía de señalización de CD43 en respuesta a su entrecruzamiento con un mAb, será interesante determinar si la interacción de CD43 con sus respectivos ligandos naturales conlleva también al reclutamiento de la cadena ζ o alternativamente, si existen vías alternativas a través de las cuales CD43 induzca cascadas de señalización.

Con el panorama descrito anteriormente es claro que atribuirle una función a CD43 dentro de la fisiología de un linfocito T parece ser poco acertado, por lo que un papel multifacético de la molécula de acuerdo al tipo de isoforma expresada, al estadio de diferenciación celular y al tipo de ligando involucrado parece ser el más apropiado. Debera establecerse si la participación de la cadena ζ en la vía de CD43 es importante en el papel multifacético de la molécula.

CAPITULO V

MATERIALES
Y
MÉTODOS

1. Anticuerpos y Reactivos.

Como anticuerpos activadores, se utilizaron el anticuerpo monoclonal L10, una IgG1 que reconoce a la molécula CD43, y el anticuerpo monoclonal anti-CD3 ϵ , OKT3, una IgG2a (American Type Culture Collection). Como anticuerpos entrecruzadores, se utilizó el anticuerpo anti-monoclonal, RaMIG. Los anticuerpos anti- ζ , anti- ζ -FITC, anti-ZAP-70, anti-Lck, anti-Fyn, anti-Vav, anti-Cbl, anti-ERK y anti-pERK son de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos secundarios para inmunoblot son de Biomeda. Los anticuerpos L10-PE y OKT3-TC son de Caltag. Los inhibidores de proteasas y fosfatasa: [PMSF (1mM), β GP (10mM), NaF (10mM), DTT (0.5 mM), Na₃VO₄ (200 mM), antipaina (50 μ g/ml), leupeptina (1 μ g/ml) y aprotinina (10 μ g/ml) son de Sigma.

2. Líneas celulares y purificación de linfocitos T y NK cells de sangre periférica.

Las líneas celulares Jurkat (J22) y JCaM (Células Jurkat deficientes en Lck), se mantuvieron en fase de crecimiento logarítmico a 37°C, 5% CO₂ en RPMI completo. Antes de cada experimento las células se incubaron por 24 hrs a 37°C, 5% CO₂ en RPMI 2% FCS con el propósito de mantener a las células en estado no activado.

Los linfocitos T se purificaron de concentrados linfocitarios de sangre humana obtenida de donadores voluntarios, adultos sanos. El aislamiento de los linfocitos se hizo sobre un colchón de ficoll-hypaque. El ficoll permite, en base a la densidad de eritrocitos y linfocitos, separar ambas poblaciones. Los concentrados celulares diluidos, volumen / volumen en PBS 1X (amortiguador de fosfatos salino: NaCl 137 mM, KCL 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 15 mM pH 7.3), se depositan lentamente sobre un colchón de ficoll-hypaque y se centrifugan a 350 x g por 30 min. Los linfocitos quedan en la interfase entre el PBS y el ficoll, de donde se extraen. Estos se lavan dos veces con PBS, centrifugándose a 350 x g por 15 min, para eliminar el exceso de ficoll. Una vez lavados, los linfocitos se resuspenden en medio de cultivo RPMI 1640 (Hyclone) completo [5% de suero fetal bovino (FCS) (Hyclone), 5% de suero bovino de recién nacido, (BCS) (Hyclone, UT), 2 mM de L-glutamina, 100 U de penicilina, 50 μ g/ml de estreptomina y 50 μ M de β -mercaptoetanol] y se dejan a una concentración de 8x10⁷ cel/ml en cajas de Petri toda la noche a 37°C, 5% CO₂ para permitir la adhesión de células monocíticas. Las

células no adherentes a las placas de cultivo se cosecharon y se centrifugaron a 350 x g por 7 min, se resuspendieron en RPMI completo y se incubaron por 1 h a 37°C, 5% CO₂ en columnas de lana de nylon. Posteriormente las células T se eluyeron de las columnas con RPMI 1640 completo a 37°C. Los linfocitos B permanecen pegados a lana de nylon. Con el propósito de tener linfocitos no activados, las células T se incubaron por 24 h a 37°C, 5% CO₂ en RPMI 2% FCS. El grado de pureza de las células obtenidas se analizó por citometría de flujo (Fig. 19A)

Las células NK humanas se purificaron a partir de células polimorfonucleares de sangre periférica por selección negativa utilizando el kit para purificación de células NK (Miltenyi Biotec). Para la depleción de linfocitos T, B, monocitos, basófilos, células dendríticas, plaquetas y eritrocitos, se utilizó un coctel de anticuerpos anti- CD3, -CD14, -CD19, -CD36 y -IgE conjugados a un hapteno. Posteriormente los complejos se incubaron con microsferas magnéticas acopladas a un anticuerpo monoclonal anti-hapteno. Finalmente las células marcadas magnéticamente se depletaron reteniéndolas en una columna magnética. El grado de pureza de las células obtenidas se analizó por citometría de flujo (Fig. 19B)

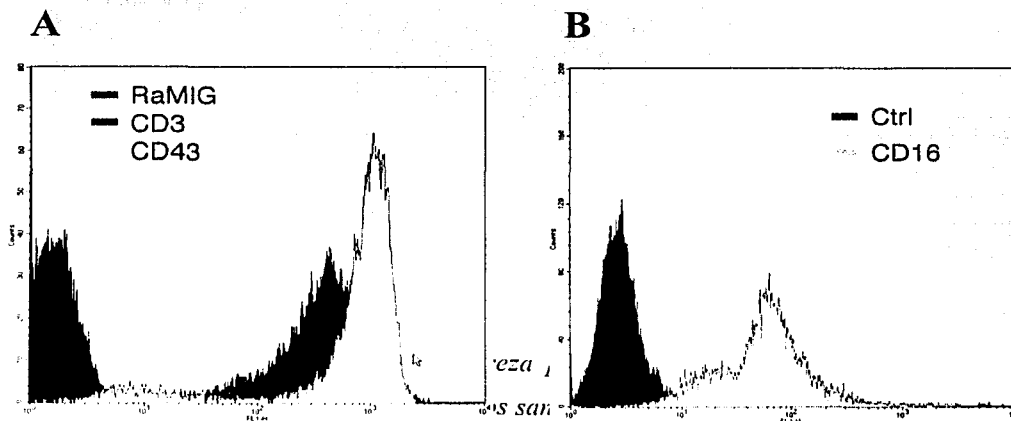


Fig 19. Grado de pureza de linfocitos T (A) o células NK (B)

3. Activación celular

Para semejar la interacción de CD43 y el TCR con sus respectivos ligandos, las moléculas fueron entrecruzadas con anti-CD43 (L10), anti TCR (OKT3) y el anti-IgG (RaMIG), estos se utilizaron a una concentración de 4 µg/ml. Este procedimiento ha sido validado en varios trabajos para diferentes moléculas de superficie y se sabe que las señales intracelulares que se generan de esta manera son equivalentes a aquellas resultantes de la interacción receptor-ligando (De Smet et al. 1993; Jonson et al. 1999). En general, 2×10^7 de células se incubaron durante 15 min a 4°C con el anticuerpo anti-CD43 (L10), o con el anticuerpo anti-CD3ε (OKT3). El entrecruzamiento de L10 (CD43) o del TCR (OKT3) se realizó con la adición de un anticuerpo policlonal anti-IgGs de ratón y la cinética de activación se inició incubando las células por diferentes periodos de tiempo a 37°C. Posteriormente, las células se lavaron con PBS frío con el propósito de eliminar el exceso de anticuerpo (10 sec a 14000 x g). Se desechó el sobrenadante y las células se lisaron en 100 µl de buffer de lisis (Hepes 25 mM pH 7.5, Tritón x-100/5%, MgCl₂ 1.5 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.2 mM en presencia de los inhibidores PMSF 1 mM, βGP 10 mM, NaF 10 mM, NaVO₄ 200 µM, leupeptina 1 mg/ml, antipaina 5 mg/ml, aprotinina 10 mg/ml, DTT 0.5 mM) durante 30 min a 4°C en agitación. Los lisados celulares se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se conservó para su análisis subsecuente o bien para inmunoprecipitación.

4. Inmunoprecipitados

Como resultado de la activación, los complejos inmunes presentes en los lisados celulares de células activadas se eliminaron por incubación con 20 µl de esferas de Proteína A sefarosa a 4°C por 1 h. La mezcla se centrifugó por 10 segundos a 14,000 rpm a 4°C y el sobrenadante se incubó con el anticuerpo indicado en agitación a 4°C. Después de 2 h de incubación con el anticuerpo primario, se adicionaron 20 µl de una mezcla 1:1 de proteína A sefarosa 4B:PBS a los lisados y se incubó por 2h adicionales a 4°C y en agitación. Las esferas se lavaron dos veces con TNE-T (Tris/HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 140 mM, EDTA 5 mM, Triton x 100 1%), dos veces con TNE (Tris/HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 140 mM, EDTA 5 mM) y una vez con agua bidistilada. Los complejos inmunes asociados a la

Proteína A sefarosa 4B se desnaturalizaron en presencia de buffer de muestra 2x (Tris/HCl 625 mM pH 6.8, 15% de glicerol, 2% de SDS, 0.001% de azul de bromofenol, 5% de β -mercaptoetanol), para luego ser separados por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE).

5. Immunoblots

Las proteínas se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 0.22 μ m previamente humedecidas en buffer de transferencia (Tris/HCl 48 mM y glicina 39 mM, pH 7.4). La transferencia de proteínas a la membrana se realizó a 120 mAmp por 1h, utilizando una cámara de transferencia semi-seca (BioRad). Para blots, las membranas se bloquearon con leche descremada o BSA al 5% en TBS-T (Tris/HCl 200mM pH 7.5, NaCl 1.5 M) durante 1h a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo correspondiente, por lo general a una concentración de 1 μ g/ml diluido en TBS-T por 1 h a TA o toda la noche a 4⁰C. Después de lavar las membranas tres veces (10 min c/u) con TBS-T, se agregó el anticuerpo secundario acoplado a HRP a una dilución de 1:5000 en TBS-T. Por último, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y se revelaron por el método de quimioluminiscencia (ECL, Amersham), el cual es un método no radioactivo que detecta la luz emitida por la reacción de la peroxidasa con su sustrato en presencia de luminol. Los fenoles presentes en la reacción aumentan la intensidad de emisión luminosa de las muestras hasta 1000 veces por 5-20 min hasta decaer después de 1h (Witthehead, 1979).

6. Ensayo de cinasa in vitro

Para realizar los ensayos de cinasa, los complejos inmunes se purificaron a partir de los lisados celulares adicionando 20 μ l de proteína A-sefarosa. Estos complejos se lavaron dos veces con TNE-T, una vez con TNE y una vez con buffer de cinasa (Hepes 20mM, NaCl 160mM, MgCl₂ 5mM y MnCl₂ 5mM). Después, los complejos inmunes se incubaron con 50 μ l del buffer de cinasa por 30 min a TA en la presencia de 20 μ M de (γ -³²P) ATP y enolasa como sustrato exógeno cuando se indica. Al finalizar el tiempo de incubación, los tubos se centrifugaron a 14 000 x g por diez seg, se tomó el sobrenadante (50 μ l) y se le adicionó un volúmen igual de buffer de muestra 2X, mientras que las

esferas se lavaron 2 veces con TNE-T, una vez con TNE y una vez con agua antes de agregar 20 μ l de buffer de muestra 2X. Las muestras se corrieron en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). La cantidad de proteína presente en los distintos carriles se evaluó con una tinción con azul de Coomassie y los complejos inmunes se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. El grado de fosforilación de las proteínas se evaluó mediante autoradiografía, y en el caso de las membranas de nitrocelulosa se realizaron ensayos de inmunoblot cuando procedía.

7. Recubrimiento de esferas de latex polistireno con anticuerpos

Una suspensión acuosa de esferas de polistireno al 2.5% se mezcló con una solución de glutaraldehído al 8% durante 4-6 horas a TA. Las esferas se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 200-400 μ g de L10 (anti-CD43), OKT3 (anti-CD3) o RaMIG. La mezcla se incubó toda la noche a TA. Las esferas se centrifugaron por diez minutos a 12000 x g y la pastilla se resuspendió en 1 ml de etanolamina 0.2 M para bloquear sitios inespecíficos. Después de 30 minutos de incubación, las esferas se centrifugaron por seis minutos a 12000 x g y se resuspendieron en una solución de BSA. La suspensión se incubó por 30 min a TA. Finalmente las esferas se centrifugaron por seis min y se resuspendieron en 1 ml de buffer de almacenamiento. El grado de unión del anticuerpo a las esferas se determinó por citometría de flujo (Fig. 20)

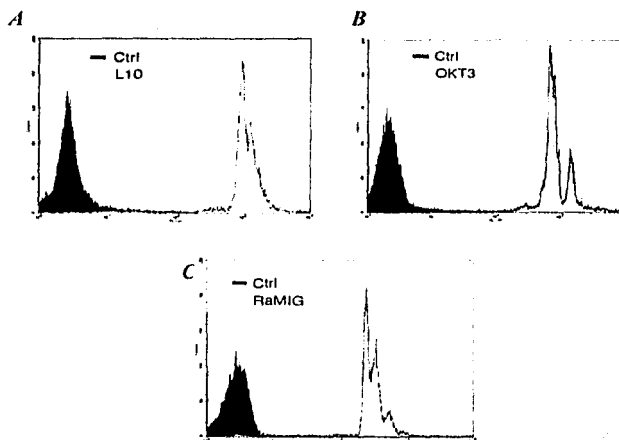


Fig 20. Perfiles de citometría de flujo de esferas recubiertas con L10 (A), OKT3 (B) o RaMIG (C)

8. Inmunotinción y microscopía confocal.

Linfocitos T o NKs de sangre periférica se incubaron con esferas de latex acopladas a anticuerpos anti-CD43, anti-CD3, RaMIG o BSA, en una relación de 1:2. Después de centrifugar la mezcla células-esferas por 5 min a 700 rpm, los conjugados se incubaron a 37^oC por diferentes tiempos. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFD) al 2% a TA por 10 minutos, posteriormente, las células se incubaron por 1h a 4^oC con solución de FACS (PBS, FCS 2% y NaN₃ 0.02%) en presencia de saponina al 0.05% y uno de los siguientes anticuerpos anticuerpos: anti- ζ FITC, anti-CD43-PE o anti CD3-TC. Al final, las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con PFD al 2% por 10 min a TA. Los conjugados se montaron sobre laminillas de vidrio en medio de montaje (PBS 50%: glicerol 50%). Las muestras se analizaron utilizando un microscopio confocal MRC-600 equipado con una láser de krypton/argon (Bio-Rad) acoplado a un microscopio Axioscopio (Zeiss, Germany) con un objetivo PlanNeofluar 40X (apertura 0.75) o un objetivo PlanApochromatico 63X W Korr (apertura 1.2).

REFERENCIAS

1. Rosenstein, Y., A. Santana, and G. Pedraza-Alva. 1999. CD43, a molecule with multiple functions. *Immunol Res* 20:89.
2. Corinti, S., E. Fanales-Belasio, C. Albanesi, A. Cavani, P. Angelisova, and G. Girolomoni. 1999. Cross-linking of membrane CD43 mediates dendritic cell maturation. *J Immunol* 162:6331.
3. Aguado, E., M. Santamaria, M. D. Gallego, J. Pena, and I. J. Molina. 1999. Functional expression of CD43 on human natural killer cells. *J Leukoc Biol* 66:923.
4. Nieto, M., J. L. Rodriguez-Fernandez, F. Navarro, D. Sancho, J. M. Frade, M. Mellado, A. C. Martinez, C. Cabanas, and F. Sanchez-Madrid. 1999. Signaling through CD43 induces natural killer cell activation, chemokine release, and PYK-2 activation. *Blood* 94:2767.
5. Nong, Y. H., E. Remold-O'Donnell, T. W. LeBien, and H. G. Remold. 1989. A monoclonal antibody to sialophorin (CD43) induces homotypic adhesion and activation of human monocytes. *J Exp Med* 170:259.
6. Kuijpers, T. W., M. Hoogerwerf, K. C. Kuijpers, B. R. Schwartz, and J. M. Harlan. 1992. Cross-linking of sialophorin (CD43) induces neutrophil aggregation in a CD18-dependent and a CD18-independent way. *J Immunol* 149:998.
7. Skubitz, K. M., K. D. Campbell, and A. P. Skubitz. 1998. CD43 is associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 64:800.
8. Fanger, N. A., L. Borges, and D. Cosman. 1999. The leukocyte immunoglobulin-like receptors (LIRs): a new family of immune regulators. *J Leukoc Biol* 66:231.
9. Diefenbach, A., and D. H. Raulet. 2003. Innate immune recognition by stimulatory immunoreceptors. *Curr Opin Immunol* 15:37.
10. Parkman, R., E. Remold-O'Donnell, D. M. Kenney, S. Perrine, and F. S. Rosen. 1981. Surface protein abnormalities in lymphocytes and platelets from patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* 2:1387.
11. Derry, J. M., H. D. Ochs, and U. Francke. 1994. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 79:following 922.
12. Weissman, A. M. 1994. The T-cell antigen receptor: a multisubunit signaling complex. *Chem Immunol* 59:1.
13. Borst, J., M. A. Prendiville, and C. Terhorst. 1983. The T3 complex on human thymus-derived lymphocytes contains two different subunits of 20 kDa. *Eur J Immunol* 13:576.
14. Samelson, L. E., J. B. Harford, and R. D. Klausner. 1985. Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* 43:223.
15. van den Elsen, P., B. A. Shepley, M. Cho, and C. Terhorst. 1985. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the murine homologue of the human 20K T3/T-cell receptor glycoprotein. *Nature* 314:542.
16. Gold, D. P., J. M. Puck, C. L. Pettey, M. Cho, J. Coligan, J. N. Woody, and C. Terhorst. 1986. Isolation of cDNA clones encoding the 20K non-glycosylated polypeptide chain of the human T-cell receptor/T3 complex. *Nature* 321:431.
17. Weissman, A. M., L. E. Samelson, and R. D. Klausner. 1986. A new subunit of the human T-cell antigen receptor complex. *Nature* 324:480.

18. Weissman, A. M., M. Baniyash, D. Hou, L. E. Samelson, W. H. Burgess, and R. D. Klausner. 1988. Molecular cloning of the zeta chain of the T cell antigen receptor. *Science* 239:1018.
19. Peter, M. E., C. Hall, A. Ruhlmann, J. Sancho, and C. Terhorst. 1992. The T-cell receptor zeta chain contains a GTP/GDP binding site. *Embo J* 11:933.
20. Orloff, D. G., C. S. Ra, S. J. Frank, R. D. Klausner, and J. P. Kinet. 1990. Family of disulphide-linked dimers containing the zeta and eta chains of the T-cell receptor and the gamma chain of Fc receptors. *Nature* 347:189.
21. Jin, Y. J., L. K. Clayton, F. D. Howard, S. Koyasu, M. Sieh, R. Steinbrich, G. E. Tarr, and E. L. Reinherz. 1990. Molecular cloning of the CD3 eta subunit identifies a CD3 zeta-related product in thymus-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3319.
22. Clayton, L. K., L. D'Adamio, F. D. Howard, M. Sieh, R. E. Hussey, S. Koyasu, and E. L. Reinherz. 1991. CD3 eta and CD3 zeta are alternatively spliced products of a common genetic locus and are transcriptionally and/or post-transcriptionally regulated during T-cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5202.
23. Orloff, D. G., S. J. Frank, F. A. Robey, A. M. Weissman, and R. D. Klausner. 1989. Biochemical characterization of the eta chain of the T-cell receptor. A unique subunit related to zeta. *J Biol Chem* 264:14812.
24. Lerner, A., A. C. Diener, E. L. Reinherz, and L. K. Clayton. 1992. Human genomic sequences corresponding to murine CD3 eta-related transcripts: lack of conservation or expression of homologous human products. *Eur J Immunol* 22:2135.
25. Le Coniat, M., J. P. Kinet, and R. Berger. 1990. The human genes for the alpha and gamma subunits of the mast cell receptor for immunoglobulin E are located on human chromosome band 1q23. *Immunogenetics* 32:183.
26. Mizoguchi, H., J. J. O'Shea, D. L. Longo, C. M. Loeffler, D. W. McVicar, and A. C. Ochoa. 1992. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science* 258:1795.
27. Lanier, L. L., G. Yu, and J. H. Phillips. 1989. Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* 342:803.
28. Howard, F. D., H. R. Rodewald, J. P. Kinet, and E. L. Reinherz. 1990. CD3 zeta subunit can substitute for the gamma subunit of Fc epsilon receptor type I in assembly and functional expression of the high- affinity IgE receptor: evidence for interreceptor complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7015.
29. Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak, and J. B. Bolen. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 55:301.
30. Barber, E. K., J. D. Dasgupta, S. F. Schlossman, J. M. Trevillyan, and C. E. Rudd. 1989. The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:3277.
31. Veillette, A., J. C. Zuniga-Pflucker, J. B. Bolen, and A. M. Kruisbeek. 1989. Engagement of CD4 and CD8 expressed on immature thymocytes induces

- activation of intracellular tyrosine phosphorylation pathways. *J Exp Med* 170:1671.
32. Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak, L. E. Samelson, and J. B. Bolen. 1989. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Nature* 338:257.
 33. Veillette, A., and M. Fournel. 1990. The CD4 associated tyrosine protein kinase p56lck is positively regulated through its site of autophosphorylation. *Oncogene* 5:1455.
 34. Beyers, A. D., L. L. Spruyt, and A. F. Williams. 1992. Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4, or CD8 and CD5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2945.
 35. Burgess, K. E., M. Yamamoto, K. V. Prasad, and C. E. Rudd. 1992. CD5 acts as a tyrosine kinase substrate within a receptor complex comprising T-cell receptor zeta chain/CD3 and protein-tyrosine kinases p56lck and p59fyn. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9311.
 36. Stefanova, I., V. Horejsi, I. J. Ansotegui, W. Knapp, and H. Stockinger. 1991. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science* 254:1016.
 37. Deckert, M., M. Ticchioni, B. Mari, D. Mary, and A. Bernard. 1995. The glycosylphosphatidylinositol-anchored CD59 protein stimulates both T cell receptor zeta/ZAP-70-dependent and -independent signaling pathways in T cells. *Eur J Immunol* 25:1815.
 38. Alvarado, M., C. Klassen, J. Cerny, V. Horejsi, and R. E. Schmidt. 1995. MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation. *Eur J Immunol* 25:1051.
 39. Kaye, J., G. Kersh, I. Engel, and S. M. Hedrick. 1991. Structure and specificity of the T cell antigen receptor. *Semin Immunol* 3:269.
 40. Manolios, N., F. Letourneur, J. S. Bonifacino, and R. D. Klausner. 1991. Pairwise, cooperative and inhibitory interactions describe the assembly and probable structure of the T-cell antigen receptor. *Embo J* 10:1643.
 41. Frank, S. J., I. Engel, T. M. Rutledge, and F. Letourneur. 1991. Structure/function analysis of the invariant subunits of the T cell antigen receptor. *Semin Immunol* 3:299.
 42. Alarcon, B., S. C. Ley, F. Sanchez-Madrid, R. S. Blumberg, S. T. Ju, M. Fresno, and C. Terhorst. 1991. The CD3-gamma and CD3-delta subunits of the T cell antigen receptor can be expressed within distinct functional TCR/CD3 complexes. *Embo J* 10:903.
 43. Carson, G. R., R. E. Kuestner, A. Ahmed, C. L. Pettey, and M. F. Concino. 1991. Six chains of the human T cell antigen receptor.CD3 complex are necessary and sufficient for processing the receptor heterodimer to the cell surface. *J Biol Chem* 266:7883.
 44. Sussman, J. J., J. S. Bonifacino, J. Lippincott-Schwartz, A. M. Weissman, T. Saito, R. D. Klausner, and J. D. Ashwell. 1988. Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell* 52:85.

45. Minami, Y., L. E. Samelson, and R. D. Klausner. 1987. Internalization and cycling of the T cell antigen receptor. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 262:13342.
46. Minami, Y., A. M. Weissman, L. E. Samelson, and R. D. Klausner. 1987. Building a multichain receptor: synthesis, degradation, and assembly of the T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2688.
47. Stafford, F. J., and J. S. Bonifacino. 1991. A permeabilized cell system identifies the endoplasmic reticulum as a site of protein degradation. *J Cell Biol* 115:1225.
48. Reth, M. 1989. Antigen receptor tail clue. *Nature* 338:383.
49. Cambier, J. C. 1995. New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL). *Immunol Today* 16:110.
50. Isakov, N., R. L. Wange, W. H. Burgess, J. D. Watts, R. Aebersold, and L. E. Samelson. 1995. ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: the tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J Exp Med* 181:375.
51. Backstrom, B. T., U. Muller, B. Hausmann, and E. Palmer. 1998. Positive selection through a motif in the alphabeta T cell receptor. *Science* 281:835.
52. Weiss, A., A. C. Chan, M. Iwashima, D. Straus, and B. A. Irving. 1992. Regulation of protein tyrosine kinase activation by the T-cell antigen receptor zeta chain. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 57:107.
53. Love, P. E., E. W. Shores, M. D. Johnson, M. L. Tremblay, E. J. Lee, A. Grinberg, S. P. Huang, A. Singer, and H. Westphal. 1993. T cell development in mice that lack the zeta chain of the T cell antigen receptor complex. *Science* 261:918.
54. Love, P. E., J. Lee, and E. W. Shores. 2000. Critical relationship between TCR signaling potential and TCR affinity during thymocyte selection. *J Immunol* 165:3080.
55. Exley, M., L. Varticovski, M. Peter, J. Sancho, and C. Terhorst. 1994. Association of phosphatidylinositol 3-kinase with a specific sequence of the T cell receptor zeta chain is dependent on T cell activation. *J Biol Chem* 269:15140.
56. Nel, A. E., S. Gupta, L. Lee, J. A. Ledbetter, and S. B. Kanner. 1995. Ligation of the T-cell antigen receptor (TCR) induces association of hSos1, ZAP-70, phospholipase C-gamma 1, and other phosphoproteins with Grb2 and the zeta-chain of the TCR. *J Biol Chem* 270:18428.
57. Osman, N., H. Turner, S. Lucas, K. Reif, and D. A. Cantrell. 1996. The protein interactions of the immunoglobulin receptor family tyrosine-based activation motifs present in the T cell receptor zeta subunits and the CD3 gamma, delta and epsilon chains. *Eur J Immunol* 26:1063.
58. Liu, X., S. R. Brodeur, G. Gish, Z. Songyang, L. C. Cantley, A. P. Laudano, and T. Pawson. 1993. Regulation of c-Src tyrosine kinase activity by the Src SH2 domain. *Oncogene* 8:1119.
59. Lin, S. Y., L. Ardouin, A. Gillet, M. Malissen, and B. Malissen. 1997. The single positive T cells found in CD3-zeta/eta-/- mice overtly react with self-major histocompatibility complex molecules upon restoration of normal surface density of T cell receptor-CD3 complex. *J Exp Med* 185:707.

60. Ardouin, L., C. Boyer, A. Gillet, J. Trucy, A. M. Bernard, J. Nunes, J. Delon, A. Trautmann, H. T. He, B. Malissen, and M. Malissen. 1999. Crippling of CD3-zeta ITAMs does not impair T cell receptor signaling. *Immunity* 10:409.
61. Romeo, C., M. Amiot, and B. Seed. 1992. Sequence requirements for induction of cytolysis by the T cell antigen/Fc receptor zeta chain. *Cell* 68:889.
62. Haks, M. C., E. Pepin, J. H. van den Brakel, S. A. Smeele, S. M. Belkowski, H. W. Kessels, P. Krimpenfort, and A. M. Kruisbeek. 2002. Contributions of the T cell receptor-associated CD3gamma-ITAM to thymocyte selection. *J Exp Med* 196:1.
63. Delgado, P., E. Fernandez, V. Dave, D. Kappes, and B. Alarcon. 2000. CD3delta couples T-cell receptor signalling to ERK activation and thymocyte positive selection. *Nature* 406:426.
64. Werlen, G., B. Hausmann, and E. Palmer. 2000. A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* 406:422.
65. Gil, D., W. W. Schamel, M. Montoya, F. Sanchez-Madrid, and B. Alarcon. 2002. Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* 109:901.
66. van Leeuwen, J. E., and L. E. Samelson. 1999. T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* 11:242.
67. Mustelin, T., and K. Tasken. 2003. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem J* 371:15.
68. Cooper, J. A. 1989. Related proteins are phosphorylated at tyrosine in response to mitogenic stimuli and at meiosis. *Mol Cell Biol* 9:3143.
69. Sudol, M., H. Greulich, L. Newman, A. Sarkar, J. Sukegawa, and T. Yamamoto. 1993. A novel Yes-related kinase, Yrk, is expressed at elevated levels in neural and hematopoietic tissues. *Oncogene* 8:823.
70. Timson Gauen, L. K., A. N. Kong, L. E. Samelson, and A. S. Shaw. 1992. p59fyn tyrosine kinase associates with multiple T-cell receptor subunits through its unique amino-terminal domain. *Mol Cell Biol* 12:5438.
71. Samelson, L. E., A. F. Phillips, E. T. Luong, and R. D. Klausner. 1990. Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4358.
72. Rudd, C. E. 1990. CD4, CD8 and the TCR-CD3 complex: a novel class of protein-tyrosine kinase receptor. *Immunol Today* 11:400.
73. Pawson, T., P. Olivier, M. Rozakis-Adcock, J. McGlade, and M. Henkemeyer. 1993. Proteins with SH2 and SH3 domains couple receptor tyrosine kinases to intracellular signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 340:279.
74. Veillette, A., and D. Davidson. 1992. Src-related protein tyrosine kinases and T-cell receptor signalling. *Trends Genet* 8:61.
75. Ledbetter, J. A., J. P. Deans, A. Aruffo, L. S. Grosmaire, S. B. Kanner, J. B. Bolen, and G. L. Schieven. 1993. CD4, CD8 and the role of CD45 in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 5:334.
76. Cahir McFarland, E. D., T. R. Hurley, J. T. Pingel, B. M. Sefton, A. Shaw, and M. L. Thomas. 1993. Correlation between Src family member regulation by the

- protein-tyrosine-phosphatase CD45 and transmembrane signaling through the T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1402.
77. D'Oro, U., K. Sakaguchi, E. Appella, and J. D. Ashwell. 1996. Mutational analysis of Lck in CD45-negative T cells: dominant role of tyrosine 394 phosphorylation in kinase activity. *Mol Cell Biol* 16:4996.
 78. Cooper, J. A., and B. Howell. 1993. The when and how of Src regulation. *Cell* 73:1051.
 79. Gjorloff-Wingren, A., M. Saxena, S. Williams, D. Hammi, and T. Mustelin. 1999. Characterization of TCR-induced receptor-proximal signaling events negatively regulated by the protein tyrosine phosphatase PEP. *Eur J Immunol* 29:3845.
 80. Plas, D. R., and M. L. Thomas. 1998. Negative regulation of antigen receptor signaling in lymphocytes. *J Mol Med* 76:589.
 81. Takeuchi, M., S. Kuramochi, N. Fusaki, S. Nada, J. Kawamura-Tsuzuku, S. Matsuda, K. Semba, K. Toyoshima, M. Okada, and T. Yamamoto. 1993. Functional and physical interaction of protein-tyrosine kinases Fyn and Csk in the T-cell signaling system. *J Biol Chem* 268:27413.
 82. Zenner, G., J. Dirk zur Hausen, P. Burn, and T. Mustelin. 1995. Towards unraveling the complexity of T cell signal transduction. *Bioessays* 17:967.
 83. Baldari, C. T., M. M. Di Somma, E. Milia, M. Bergman, and J. L. Telford. 1995. Interactions between the tyrosine kinases p56lck, p59fyn and p50csk in CD4 signaling in T cells. *Eur J Immunol* 25:919.
 84. Peri, K. G., F. G. Gervais, R. Weil, D. Davidson, G. D. Gish, and A. Veillette. 1993. Interactions of the SH2 domain of lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck with phosphotyrosine-containing proteins. *Oncogene* 8:2765.
 85. Veillette, A., L. Caron, M. Fournel, and T. Pawson. 1992. Regulation of the enzymatic function of the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck by the non-catalytic SH2 and SH3 domains. *Oncogene* 7:971.
 86. Seidel-Dugan, C., B. E. Meyer, S. M. Thomas, and J. S. Brugge. 1992. Effects of SH2 and SH3 deletions on the functional activities of wild-type and transforming variants of c-Src. *Mol Cell Biol* 12:1835.
 87. Marth, J. D., R. Peet, E. G. Krebs, and R. M. Perlmutter. 1985. A lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase gene is rearranged and overexpressed in the murine T cell lymphoma LSTRA. *Cell* 43:393.
 88. Einspahr, K. J., R. T. Abraham, C. J. Dick, and P. J. Leibson. 1990. Protein tyrosine phosphorylation and p56lck modification in IL-2 or phorbol ester-activated human natural killer cells. *J Immunol* 145:1490.
 89. Taieb, J., I. Vitte-Mony, M. T. Auffredou, O. Dorseuil, G. Gacon, J. Bertoglio, and A. Vazquez. 1993. Regulation of p56lck kinase expression and control of DNA synthesis in activated human B lymphocytes. *J Biol Chem* 268:9169.
 90. Trowbridge, I. S., P. Johnson, H. Ostergaard, and N. Hole. 1992. Regulation and structure-function relationship of CD45. *Biochem Soc Trans* 20:174.
 91. Brickell, P. M. 1992. The p60c-src family of protein-tyrosine kinases: structure, regulation, and function. *Crit Rev Oncog* 3:401.
 92. Fischer, S., A. Marie-Cardine, F. Ramos-Morales, C. Bougeret, M. Soula, I. Maridonneau-Parini, and R. Benarous. 1994. P56lck A lymphocyte specific

- protein tyrosine kinase: activation, regulation and signal transduction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 40:605.
93. Sicheri, F., and J. Kuriyan. 1997. Structures of Src-family tyrosine kinases. *Curr Opin Struct Biol* 7:777.
 94. Sieh, M., J. B. Bolen, and A. Weiss. 1993. CD45 specifically modulates binding of Lck to a phosphopeptide encompassing the negative regulatory tyrosine of Lck. *Embo J* 12:315.
 95. Dornan, S., Z. Sebestyen, J. Gamble, P. Nagy, A. Bodnar, L. Alldridge, S. Doe, N. Holmes, L. K. Goff, P. Beverley, J. Szollosi, and D. R. Alexander. 2002. Differential association of CD45 isoforms with CD4 and CD8 regulates the actions of specific pools of p56lck tyrosine kinase in T cell antigen receptor signal transduction. *J Biol Chem* 277:1912.
 96. Guttinger, M., M. Gassmann, K. E. Amrein, and P. Burn. 1992. CD45 phosphotyrosine phosphatase and p56lck protein tyrosine kinase: a functional complex crucial in T cell signal transduction. *Int Immunol* 4:1325.
 97. Hermiston, M. L., Z. Xu, and A. Weiss. 2003. CD45: A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells. *Annu Rev Immunol* 21:107.
 98. Justement, L. B. 1997. The role of CD45 in signal transduction. *Adv Immunol* 66:1.
 99. Ashwell, J. D., and U. D'Oro. 1999. CD45 and Src-family kinases: and now for something completely different. *Immunol Today* 20:412.
 100. Cooke, M. P., and R. M. Perlmutter. 1989. Expression of a novel form of the fyn proto-oncogene in hematopoietic cells. *New Biol* 1:66.
 101. Cooke, M. P., K. M. Abraham, K. A. Forbush, and R. M. Perlmutter. 1991. Regulation of T cell receptor signaling by a src family protein- tyrosine kinase (p59fyn). *Cell* 65:281.
 102. Appleby, M. W., J. A. Gross, M. P. Cooke, S. D. Levin, X. Qian, and R. M. Perlmutter. 1992. Defective T cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of p59fyn. *Cell* 70:751.
 103. Stein, P. L., H. M. Lee, S. Rich, and P. Soriano. 1992. pp59fyn mutant mice display differential signaling in thymocytes and peripheral T cells. *Cell* 70:741.
 104. Veillette, A. 2002. The SAP family: a new class of adaptor-like molecules that regulates immune cell functions. *Sci STKE* 2002:E8.
 105. Hall, C. G., J. Sancho, and C. Terhorst. 1993. Reconstitution of T cell receptor zeta-mediated calcium mobilization in nonlymphoid cells. *Science* 261:915.
 106. Straus, D. B., and A. Weiss. 1992. Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70:585.
 107. Denny, M. F., B. Patai, and D. B. Straus. 2000. Differential T-cell antigen receptor signaling mediated by the Src family kinases Lck and Fyn. *Mol Cell Biol* 20:1426.
 108. Chan, A. C., D. M. Desai, and A. Weiss. 1994. The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu Rev Immunol* 12:555.
 109. Chan, A. C., N. S. van Oers, A. Tran, L. Turka, C. L. Law, J. C. Ryan, E. A. Clark, and A. Weiss. 1994. Differential expression of ZAP-70 and Syk protein

- tyrosine kinases, and the role of this family of protein tyrosine kinases in TCR signaling. *J Immunol* 152:4758.
110. Law, C. L., S. P. Sidorenko, K. A. Chandran, K. E. Draves, A. C. Chan, A. Weiss, S. Edelhoff, C. M. Disteché, and E. A. Clark. 1994. Molecular cloning of human Syk. A B cell protein-tyrosine kinase associated with the surface immunoglobulin M-B cell receptor complex. *J Biol Chem* 269:12310.
 111. Negishi, I., N. Motoyama, K. Nakayama, S. Senju, S. Hatakeyama, Q. Zhang, A. C. Chan, and D. Y. Loh. 1995. Essential role for ZAP-70 in both positive and negative selection of thymocytes. *Nature* 376:435.
 112. Turner, M., P. J. Mee, P. S. Costello, O. Williams, A. A. Price, L. P. Duddy, M. T. Furlong, R. L. Geahlen, and V. L. Tybulewicz. 1995. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 378:298.
 113. Fischer, K. D., K. Tedford, and J. M. Penninger. 1998. Vav links antigen-receptor signaling to the actin cytoskeleton. *Semin Immunol* 10:317.
 114. Fischer, K. D., Y. Y. Kong, H. Nishina, K. Tedford, L. E. Marengere, I. Koziaradzki, T. Sasaki, M. Starr, G. Chan, S. Gardener, M. P. Nghiem, D. Bouchard, M. Barbacid, A. Bernstein, and J. M. Penninger. 1998. Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T- cell receptor. *Curr Biol* 8:554.
 115. Bustelo, X. R., and M. Barbacid. 1992. Tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product in activated B cells. *Science* 256:1196.
 116. Crespo, P., K. E. Schuebel, A. A. Ostrom, J. S. Gutkind, and X. R. Bustelo. 1997. Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* 385:169.
 117. Wu, J., Q. Zhao, T. Kurosaki, and A. Weiss. 1997. The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor- mediated signal transduction. *J Exp Med* 185:1877.
 118. Wu, J., D. G. Motto, G. A. Koretzky, and A. Weiss. 1996. Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* 4:593.
 119. Wu, J., S. Katzav, and A. Weiss. 1995. A functional T-cell receptor signaling pathway is required for p95vav activity. *Mol Cell Biol* 15:4337.
 120. Bretscher, P., and M. Cohn. 1970. A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 169:1042.
 121. Bretscher, P. 1992. The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later. *Immunol Today* 13:74.
 122. Lafferty, K. J., S. J. Prowse, C. J. Simeonovic, and H. S. Warren. 1983. Immunobiology of tissue transplantation: a return to the passenger leukocyte concept. *Annu Rev Immunol* 1:143.
 123. Axelsson, B., S. Hammarstrom, E. S. Robertsson, P. Aman, P. Perlmann, and H. Mellstedt. 1985. The large sialoglycoprotein of human lymphocytes. I. Distribution on T and B lineage cells as revealed by a monospecific chicken antibody. *Eur J Immunol* 15:417.
 124. Fukuda, M., S. R. Carlsson, J. C. Klock, and A. Dell. 1986. Structures of O-linked oligosaccharides isolated from normal granulocytes, chronic myelogenous leukemia cells, and acute myelogenous leukemia cells. *J Biol Chem* 261:12796.

125. Remold-O'Donnell, E., C. Zimmerman, D. Kenney, and F. S. Rosen. 1987. Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 70:104.
126. Remold-O'Donnell, E., and F. S. Rosen. 1990. Sialophorin (CD43) and the Wiskott-Aldrich syndrome. *Immunodefic Rev* 2:151.
127. Carlsson, S. R., and M. Fukuda. 1986. Isolation and characterization of leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes. *J Biol Chem* 261:12779.
128. Fukuda, M. 1991. Leukosialin, a major O-glycan-containing sialoglycoprotein defining leukocyte differentiation and malignancy. *Glycobiology* 1:347.
129. Maemura, K., and M. Fukuda. 1992. Poly-N-acetyllactosaminyl O-glycans attached to leukosialin. The presence of sialyl Le(x) structures in O-glycans. *J Biol Chem* 267:24379.
130. Pallant, A., A. Eskenazi, M. G. Mattei, R. E. Fournier, S. R. Carlsson, M. Fukuda, and J. G. Frelinger. 1989. Characterization of cDNAs encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1328.
131. Shelley, C. S., E. Remold-O'Donnell, F. S. Rosen, and A. S. Whitehead. 1990. Structure of the human sialophorin (CD43) gene. Identification of features atypical of genes encoding integral membrane proteins. *Biochem J* 270:569.
132. Cyster, J., C. Somoza, N. Killeen, and A. F. Williams. 1990. Protein sequence and gene structure for mouse leukosialin (CD43), a T lymphocyte mucin without introns in the coding sequence. *Eur J Immunol* 20:875.
133. Yonemura, S., A. Nagafuchi, N. Sato, and S. Tsukita. 1993. Concentration of an integral membrane protein, CD43 (leukosialin, sialophorin), in the cleavage furrow through the interaction of its cytoplasmic domain with actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol* 120:437.
134. Yonemura, S., M. Hirao, Y. Doi, N. Takahashi, T. Kondo, and S. Tsukita. 1998. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol* 140:885.
135. Serrador, J. M., M. Nieto, J. L. Alonso-Lebrero, M. A. del Pozo, J. Calvo, H. Furthmayr, R. Schwartz-Albiez, F. Lozano, R. Gonzalez-Amaro, P. Sanchez-Mateos, and F. Sanchez-Madrid. 1998. CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* 91:4632.
136. Piller, F., V. Piller, R. I. Fox, and M. Fukuda. 1988. Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J Biol Chem* 263:15146.
137. Ellies, L. G., A. T. Jones, M. J. Williams, and H. J. Ziltener. 1994. Differential regulation of CD43 glycoforms on CD4+ and CD8+ T lymphocytes in graft-versus-host disease. *Glycobiology* 4:885.
138. Jones, A. T., B. Federspiel, L. G. Ellies, M. J. Williams, R. Burgener, V. Duronio, C. A. Smith, F. Takei, and H. J. Ziltener. 1994. Characterization of the activation-associated isoform of CD43 on murine T lymphocytes. *J Immunol* 153:3426.

139. Ellies, L. G., W. Tao, W. Fellinger, H. S. Teh, and H. J. Ziltener. 1996. The CD43 130-kD peripheral T-cell activation antigen is downregulated in thymic positive selection. *Blood* 88:1725.
140. Higgins, E. A., K. A. Siminovitch, D. L. Zhuang, I. Brockhausen, and J. W. Dennis. 1991. Aberrant O-linked oligosaccharide biosynthesis in lymphocytes and platelets from patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Biol Chem* 266:6280.
141. Baecher-Allan, C. M., J. D. Kemp, K. S. Dorfman, R. K. Barth, and J. G. Frelinger. 1993. Differential epitope expression of Ly-48 (mouse leukosialin). *Immunogenetics* 37:183.
142. Brown, T. J., W. W. Shuford, W. C. Wang, S. G. Nadler, T. S. Bailey, H. Marquardt, and R. S. Mittler. 1996. Characterization of a CD43/leukosialin-mediated pathway for inducing apoptosis in human T-lymphoblastoid cells. *J Biol Chem* 271:27686.
143. Giordanengo, V., M. Limouse, J. F. Peyron, and J. C. Lefebvre. 1995. Lymphocytic CD43 and CD45 bear sulfate residues potentially implicated in cell to cell interactions. *Eur J Immunol* 25:274.
144. Tedder, T. F., D. A. Steeber, A. Chen, and P. Engel. 1995. The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J* 9:866.
145. Rosenstein, Y., J. K. Park, W. C. Hahn, F. S. Rosen, B. E. Bierer, and S. J. Burakoff. 1991. CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* 354:233.
146. Nathan, C., Q. W. Xie, L. Halbwachs-Mecarelli, and W. W. Jin. 1993. Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43 (sialophorin, leukosialin). *J Cell Biol* 122:243.
147. Baum, L. G., M. Pang, N. L. Perillo, T. Wu, A. Delegeane, C. H. Uittenbogaart, M. Fukuda, and J. J. Seilhamer. 1995. Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J Exp Med* 181:877.
148. Stockl, J., O. Majdic, P. Kohl, W. F. Pickl, J. E. Menzel, and W. Knapp. 1996. Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation. *J Exp Med* 184:1769.
149. van den Berg, T. K., D. Nath, H. J. Ziltener, D. Vestweber, M. Fukuda, I. van Die, and P. R. Crocker. 2001. Cutting edge: CD43 functions as a T cell counterreceptor for the macrophage adhesion receptor sialoadhesin (Siglec-1). *J Immunol* 166:3637.
150. Marlin, S. D., and T. A. Springer. 1987. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 51:813.
151. Diamond, M. S., D. E. Staunton, A. R. de Fougères, S. A. Stacker, J. Garcia-Aguilar, M. L. Hibbs, and T. A. Springer. 1990. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* 111:3129.
152. Park, J. K., Y. J. Rosenstein, E. Remold-O'Donnell, B. E. Bierer, F. S. Rosen, and S. J. Burakoff. 1991. Enhancement of T-cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Nature* 350:706.

153. Barondes, S. H., V. Castronovo, D. N. Cooper, R. D. Cummings, K. Drickamer, T. Feizi, M. A. Gitt, J. Hirabayashi, C. Hughes, K. Kasai, and et al. 1994. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76:597.
154. Barondes, S. H., D. N. Cooper, M. A. Gitt, and H. Leffler. 1994. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 269:20807.
155. Zhou, Q., and R. D. Cummings. 1993. L-14 lectin recognition of laminin and its promotion of in vitro cell adhesion. *Arch Biochem Biophys* 300:6.
156. Cooper, D. N., S. M. Massa, and S. H. Barondes. 1991. Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. *J Cell Biol* 115:1437.
157. van den Berg, T. K., J. J. Breve, J. G. Damoiseaux, E. A. Dopp, S. Kelm, P. R. Crocker, C. D. Dijkstra, and G. Kraal. 1992. Sialoadhesin on macrophages: its identification as a lymphocyte adhesion molecule. *J Exp Med* 176:647.
158. Fratazzi, C., N. Manjunath, R. D. Arbeit, C. Carini, T. A. Gerken, B. Ardman, E. Remold-O'Donnell, and H. G. Remold. 2000. A macrophage invasion mechanism for mycobacteria implicating the extracellular domain of CD43. *J Exp Med* 192:183.
159. Abramson, J. S., and H. R. Hudnor. 1995. Role of the sialophorin (CD43) receptor in mediating influenza A virus- induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction. *Blood* 85:1615.
160. Hartshorn, K. L., L. S. Liou, M. R. White, M. M. Kazhdan, J. L. Tauber, and A. I. Tauber. 1995. Neutrophil deactivation by influenza A virus. Role of hemagglutinin binding to specific sialic acid-bearing cellular proteins. *J Immunol* 154:3952.
161. Philips, M. R., S. B. Abramson, S. L. Kolasinski, K. A. Haines, G. Weissmann, and M. G. Rosenfeld. 1991. Low molecular weight GTP-binding proteins in human neutrophil granule membranes. *J Biol Chem* 266:1289.
162. Rottenberg, M. E., A. Riarte, L. Sporrang, J. Altcheh, P. Petray, A. M. Ruiz, H. Wigzell, and A. Orn. 1995. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunol Lett* 45:53.
163. Todeschini, A. R., M. F. Girard, J. M. Wieruszeski, M. P. Nunes, G. A. DosReis, L. Mendonca-Previato, and J. O. Previato. 2002. trans-Sialidase from *Trypanosoma cruzi* binds host T-lymphocytes in a lectin manner. *J Biol Chem* 277:45962.
164. Schenkman, S., M. S. Jiang, G. W. Hart, and V. Nussenzweig. 1991. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* 65:1117.
165. Giordanengo, V., M. Limouse, L. Desroys du Roure, J. Cottalorda, A. Doglio, A. Passeron, J. G. Fuzibet, and J. C. Lefebvre. 1995. Autoantibodies directed against CD43 molecules with an altered glycosylation status on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)- infected CEM cells are found in all HIV-1+ individuals. *Blood* 86:2302.
166. Ardman, B., M. A. Sikorski, M. Settles, and D. E. Staunton. 1990. Human immunodeficiency virus type 1-infected individuals make autoantibodies that bind to CD43 on normal thymic lymphocytes. *J Exp Med* 172:1151.

167. Barat, C., and M. J. Tremblay. 2002. Engagement of CD43 Enhances Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcriptional Activity and Virus Production That Is Induced upon TCR/CD3 Stimulation. *J Biol Chem* 277:28714.
168. Manjunath, N., M. Correa, M. Ardman, and B. Ardman. 1995. Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature* 377:535.
169. Thurman, E. C., J. Walker, S. Jayaraman, N. Manjunath, B. Ardman, and J. M. Green. 1998. Regulation of in vitro and in vivo T cell activation by CD43. *Int Immunol* 10:691.
170. Carlow, D. A., S. Y. Corbel, and H. J. Ziltener. 2001. Absence of CD43 fails to alter T cell development and responsiveness. *J Immunol* 166:256.
171. Teh, H. S., P. Kisielow, B. Scott, H. Kishi, Y. Uematsu, H. Bluthmann, and H. von Boehmer. 1988. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T- cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 335:229.
172. Kisielow, P., H. S. Teh, H. Bluthmann, and H. von Boehmer. 1988. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335:730.
173. Onami, T. M., L. E. Harrington, M. A. Williams, M. Galvan, C. P. Larsen, T. C. Pearson, N. Manjunath, L. G. Baum, B. D. Pearce, and R. Ahmed. 2002. Dynamic regulation of T cell immunity by CD43. *J Immunol* 168:6022.
174. Stockton, B. M., G. Cheng, N. Manjunath, B. Ardman, and U. H. von Andrian. 1998. Negative regulation of T cell homing by CD43. *Immunity* 8:373.
175. Woodman, R. C., B. Johnston, M. J. Hickey, D. Teoh, P. Reinhardt, B. Y. Poon, and P. Kubes. 1998. The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice. *J Exp Med* 188:2181.
176. Campanero, M. R., R. Pulido, J. L. Alonso, J. P. Pivel, F. X. Pimentel-Muinos, M. Fresno, and F. Sanchez-Madrid. 1991. Down-regulation by tumor necrosis factor- α of neutrophil cell surface expression of the sialophorin CD43 and the hyaluronate receptor CD44 through a proteolytic mechanism. *Eur J Immunol* 21:3045.
177. Bazil, V., and J. L. Strominger. 1993. CD43, the major sialoglycoprotein of human leukocytes, is proteolytically cleaved from the surface of stimulated lymphocytes and granulocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3792.
178. Weber, S., M. Babina, B. Hermann, and B. M. Henz. 1997. Leukosialin (CD43) is proteolytically cleaved from stimulated HMC-1 cells. *Immunobiology* 197:82.
179. Schmid, K., M. A. Hediger, R. Brossmer, J. H. Collins, H. Haupt, T. Marti, G. D. Offner, J. Schaller, K. Takagaki, M. T. Walsh, and et al. 1992. Amino acid sequence of human plasma galactoglycoprotein: identity with the extracellular region of CD43 (sialophorin). *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:663.
180. Babina, M., S. Weber, K. Mammeri, and B. M. Henz. 1998. Signal transduction via CD43 (leukosialin, sialophorin) and associated biological effects in human mast cell line (HMC-1). *Biochem Biophys Res Commun* 243:163.
181. Fanales-Belasio, E., G. Zambruno, A. Cavani, and G. Girolomoni. 1997. Activation of immature dendritic cells via membrane sialophorin (CD43). *Adv Exp Med Biol* 417:207.

182. Kyriakou, D., M. G. Alexandrakis, E. S. Kyriakou, D. Liapi, T. V. Kourelis, M. Mavromanolakis, I. Vlachonikolis, and P. Eliakis. 2001. Reduced CD43 expression on the neutrophils of MDS patients correlates with an activated phenotype of these cells. *Int J Hematol* 73:483.
183. Dragone, L. L., R. K. Barth, K. L. Sitar, G. L. Disbrow, and J. G. Frelinger. 1995. Disregulation of leukosialin (CD43, Ly48, sialophorin) expression in the B-cell lineage of transgenic mice increases splenic B-cell number and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:626.
184. Ostberg, J. R., L. L. Dragone, M. A. Borrello, R. P. Phipps, R. K. Barth, and J. G. Frelinger. 1997. Expression of mouse CD43 in the B cell lineage of transgenic mice causes impaired immune responses to T-independent antigens. *Eur J Immunol* 27:2152.
185. Strasser, A., A. W. Harris, and S. Cory. 1991. bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 67:889.
186. Allenspach, E. J., P. Cullinan, J. Tong, Q. Tang, A. G. Tesciuba, J. L. Cannon, S. M. Takahashi, R. Morgan, J. K. Burkhardt, and A. I. Sperling. 2001. ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* 15:739.
187. Delon, J., K. Kaibuchi, and R. N. Germain. 2001. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* 15:691.
188. Roumier, A., J. C. Olivo-Marin, M. Arpin, F. Michel, M. Martin, P. Mangeat, O. Acuto, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 2001. The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation. *Immunity* 15:715.
189. Sperling, A. I., J. R. Sedy, N. Manjunath, A. Kupfer, B. Ardman, and J. K. Burkhardt. 1998. TCR signaling induces selective exclusion of CD43 from the T cell-antigen-presenting cell contact site. *J Immunol* 161:6459.
190. Sanchez-Madrid, F., and M. A. del Pozo. 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *Embo J* 18:501.
191. Seveau, S., S. Lopez, P. Lesavre, J. Guichard, E. M. Cramer, and L. Halbwachs-Mecarelli. 1997. Leukosialin (CD43, sialophorin) redistribution in uropods of polarized neutrophils is induced by CD43 cross-linking by antibodies, by colchicine or by chemotactic peptides. *J Cell Sci* 110:1465.
192. Savage, N. D., S. L. Kimzey, S. K. Bromley, K. G. Johnson, M. L. Dustin, and J. M. Green. 2002. Polar redistribution of the sialoglycoprotein CD43: implications for T cell function. *J Immunol* 168:3740.
193. de Smet, W., H. Walter, and L. van Hove. 1993. A new CD43 monoclonal antibody induces homotypic aggregation of human leucocytes through a CD11a/CD18-dependent and -independent mechanism. *Immunology* 79:46.
194. Cyster, J. G., and A. F. Williams. 1992. The importance of cross-linking in the homotypic aggregation of lymphocytes induced by anti-leukosialin (CD43) antibodies. *Eur J Immunol* 22:2565.
195. del Pozo, M. A., P. Sanchez-Mateos, M. Nieto, and F. Sanchez-Madrid. 1995. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution

- during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol* 131:495.
196. Cermak, L., S. Simova, A. Pintzas, V. Horejsi, and L. Andera. 2002. Molecular mechanisms involved in CD43-mediated apoptosis of TF-1 cells. Roles of transcription Daxx expression, and adhesion molecules. *J Biol Chem* 277:7955.
 197. Mukasa, R., T. Homma, T. Ohtsuki, O. Hosono, A. Souta, T. Kitamura, M. Fukuda, S. Watanabe, and C. Morimoto. 1999. Core 2-containing O-glycans on CD43 are preferentially expressed in the memory subset of human CD4 T cells. *Int Immunol* 11:259.
 198. He, Y. W., and M. J. Bevan. 1999. High level expression of CD43 inhibits T cell receptor/CD3-mediated apoptosis. *J Exp Med* 190:1903.
 199. Sperling, A. I., J. M. Green, R. L. Mosley, P. L. Smith, R. J. DiPaolo, J. R. Klein, J. A. Bluestone, and C. B. Thompson. 1995. CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28. *J Exp Med* 182:139.
 200. Bagriacik, E. U., M. Tang, H. C. Wang, and J. R. Klein. 2001. CD43 potentiates CD3-induced proliferation of murine intestinal intraepithelial lymphocytes. *Immunol Cell Biol* 79:303.
 201. Pedraza-Alva, G., L. B. Merida, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein. 1996. CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase. *J Biol Chem* 271:27564.
 202. Axelsson, B., and P. Perlmann. 1989. Persistent superphosphorylation of leukosialin (CD43) in activated T cells and in tumour cell lines. *Scand J Immunol* 30:539.
 203. Wong, R. C., E. Remold-O'Donnell, D. Vercelli, J. Sancho, C. Terhorst, F. Rosen, R. Geha, and T. Chatila. 1990. Signal transduction via leukocyte antigen CD43 (sialophorin). Feedback regulation by protein kinase C. *J Immunol* 144:1455.
 204. Pedraza-Alva, G., L. B. Merida, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein. 1998. T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation. *J Biol Chem* 273:14218.
 205. Santana, M. A., G. Pedraza-Alva, N. Olivares-Zavaleta, V. Madrid-Marina, V. Horejsi, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein. 2000. CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NFkappa B transcription factors in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 275:31460.
 206. Todeschini, A. R., M. P. Nunes, R. S. Pires, M. F. Lopes, J. O. Previato, L. Mendonca-Previato, and G. A. DosReis. 2002. Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal trans-sialidase: involvement of CD43 signaling. *J Immunol* 168:5192.
 207. Liu, Y. C., and A. Altman. 1998. Cbl: complex formation and functional implications. *Cell Signal* 10:377.
 208. Fournel, M., D. Davidson, R. Weil, and A. Veillette. 1996. Association of tyrosine protein kinase Zap-70 with the protooncogene product p120c-cbl in T lymphocytes. *J Exp Med* 183:301.
 209. Feshchenko, E. A., W. Y. Langdon, and A. Y. Tsygankov. 1998. Fyn, Yes, and Syk phosphorylation sites in c-Cbl map to the same tyrosine residues that become phosphorylated in activated T cells. *J Biol Chem* 273:8323.

210. Lupher, M. L., Jr., K. A. Reedquist, S. Miyake, W. Y. Langdon, and H. Band. 1996. A novel phosphotyrosine-binding domain in the N-terminal transforming region of Cbl interacts directly and selectively with ZAP-70 in T cells. *J Biol Chem* 271:24063.
211. Tsygankov, A. Y., S. Mahajan, J. E. Fincke, and J. B. Bolen. 1996. Specific association of tyrosine-phosphorylated c-Cbl with Fyn tyrosine kinase in T cells. *J Biol Chem* 271:27130.
212. Kanagasundaram, V., A. Jaworowski, and J. A. Hamilton. 1996. Association between phosphatidylinositol-3 kinase, Cbl and other tyrosine phosphorylated proteins in colony-stimulating factor-1-stimulated macrophages. *Biochem J* 320:69.
213. Matsuo, T., K. Hazeki, O. Hazeki, T. Katada, and M. Ui. 1996. Specific association of phosphatidylinositol 3-kinase with the protooncogene product Cbl in Fc gamma receptor signaling. *FEBS Lett* 382:11.
214. Hartley, D., and S. Corvera. 1996. Formation of c-Cbl.phosphatidylinositol 3-kinase complexes on lymphocyte membranes by a p56lck-independent mechanism. *J Biol Chem* 271:21939.
215. Reedquist, K. A., T. Fukazawa, B. Druker, G. Panchamoorthy, S. E. Shoelson, and H. Band. 1994. Rapid T-cell receptor-mediated tyrosine phosphorylation of p120, an Fyn/Lck Src homology 3 domain-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4135.
216. Marengere, L. E., C. Mirtsos, I. Kozieradzki, A. Veillette, T. W. Mak, and J. M. Penninger. 1997. Proto-oncoprotein Vav interacts with c-Cbl in activated thymocytes and peripheral T cells. *J Immunol* 159:70.
217. Ribon, V., J. A. Printen, N. G. Hoffman, B. K. Kay, and A. R. Saltiel. 1998. A novel, multifunctional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 18:872.
218. Liu, Y. C., Y. Liu, C. Elly, H. Yoshida, S. Lipkowitz, and A. Altman. 1997. Serine phosphorylation of Cbl induced by phorbol ester enhances its association with 14-3-3 proteins in T cells via a novel serine-rich 14-3-3-binding motif. *J Biol Chem* 272:9979.
219. Rellahan, B. L., L. J. Graham, B. Stoica, K. E. DeBell, and E. Bonvini. 1997. Cbl-mediated regulation of T cell receptor-induced AP1 activation. Implications for activation via the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 272:30806.
220. Murphy, M. A., R. G. Schnall, D. J. Venter, L. Barnett, I. Bertoncetto, C. B. Thien, W. Y. Langdon, and D. D. Bowtell. 1998. Tissue hyperplasia and enhanced T-cell signalling via ZAP-70 in c-Cbl-deficient mice. *Mol Cell Biol* 18:4872.
221. Zell, T., C. S. Warden, A. S. Chan, M. E. Cook, C. L. Dell, S. W. Hunt, 3rd, and Y. Shimizu. 1998. Regulation of beta 1-integrin-mediated cell adhesion by the Cbl adaptor protein. *Curr Biol* 8:814.
222. Pedraza-Alva, G., S. Sawasdikosol, Y. C. Liu, L. B. Merida, M. E. Cruz-Munoz, F. Ocegueda-Yanez, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein. 2001. Regulation of Cbl molecular interactions by the co-receptor molecule CD43 in human T cells. *J Biol Chem* 276:729.

223. Tada, J., M. Omine, T. Suda, and N. Yamaguchi. 1999. A common signaling pathway via Syk and Lyn tyrosine kinases generated from capping of the sialomucins CD34 and CD43 in immature hematopoietic cells. *Blood* 93:3723.
224. Gassmann, M., K. E. Amrein, N. A. Flint, B. Schraven, and P. Burn. 1994. Identification of a signaling complex involving CD2, zeta chain and p59fyn in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 24:139.
225. Moingeon, P., J. L. Lucich, D. J. McConkey, F. Letourneur, B. Malissen, J. Kochan, H. C. Chang, H. R. Rodewald, and E. L. Reinherz. 1992. CD3 zeta dependence of the CD2 pathway of activation in T lymphocytes and natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1492.
226. Lanier, L. L., G. Yu, and J. H. Phillips. 1991. Analysis of Fc gamma RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 zeta and Fc epsilon RI-gamma by site-directed mutation. *J Immunol* 146:1571.
227. Mittrucker, H. W., C. Steeg, B. Malissen, and B. Fleischer. 1995. The cytoplasmic tail of the T cell receptor zeta chain is required for signaling via CD26. *Eur J Immunol* 25:295.
228. Leitenberg, D., Y. Boutin, D. D. Lu, and K. Bottomly. 1999. Biochemical association of CD45 with the T cell receptor complex: regulation by CD45 isoform and during T cell activation. *Immunity* 10:701.
229. Veillette, A., D. Soussou, S. Latour, D. Davidson, and F. G. Gervais. 1999. Interactions of CD45-associated protein with the antigen receptor signaling machinery in T-lymphocytes. *J Biol Chem* 274:14392.
230. Lee, K. M., E. Chuang, M. Griffin, R. Khattri, D. K. Hong, W. Zhang, D. Straus, L. E. Samelson, C. B. Thompson, and J. A. Bluestone. 1998. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* 282:2263.
231. Peterson, E. J., J. L. Clements, N. Fang, and G. A. Koretzky. 1998. Adaptor proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 10:337.
232. Kennedy, J. S., M. Raab, and C. E. Rudd. 1999. Signaling scaffolds in immune cells. *Cell Calcium* 26:227.
233. Clements, J. L., N. J. Boerth, J. R. Lee, and G. A. Koretzky. 1999. Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins. *Annu Rev Immunol* 17:89.
234. Wang, R. L. 2000. LAT, the linker for activation of T cells: a bridge between T cell-specific and general signaling pathways. *Sci STKE* 2000:RE1.
235. Anzai, N., A. Gotoh, H. Shibayama, and H. E. Broxmeyer. 1999. Modulation of integrin function in hematopoietic progenitor cells by CD43 engagement: possible involvement of protein tyrosine kinase and phospholipase C-gamma. *Blood* 93:3317.
236. Latour, S., and A. Veillette. 2001. Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling. *Curr Opin Immunol* 13:299.
237. Stefanova, I., and V. Horejsi. 1991. Association of the CD59 and CD55 cell surface glycoproteins with other membrane molecules. *J Immunol* 147:1587.
238. Salmeron, A., A. Borroto, M. Fresno, M. J. Crumpton, S. C. Ley, and B. Alarcon. 1995. Transferrin receptor induces tyrosine phosphorylation in T cells and is physically associated with the TCR zeta-chain. *J Immunol* 154:1675.

239. Xavier, R., T. Brennan, Q. Li, C. McCormack, and B. Seed. 1998. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8:723.
240. Germain, R. N. 1997. T-cell signaling: the importance of receptor clustering. *Curr Biol* 7:R640.
241. Krawczyk, C., and J. M. Penninger. 2001. Molecular motors involved in T cell receptor clusterings. *J Leukoc Biol* 69:317.
242. Krummel, M. F., and M. M. Davis. 2002. Dynamics of the immunological synapse: finding, establishing and solidifying a connection. *Curr Opin Immunol* 14:66.
243. Su, M. W., C. L. Yu, S. J. Burakoff, and Y. J. Jin. 2001. Targeting Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase (SHP-1) into lipid rafts inhibits CD3-induced T cell activation. *J Immunol* 166:3975.
244. Kosugi, A., J. Sakakura, K. Yasuda, M. Ogata, and T. Hamaoka. 2001. Involvement of SHP-1 tyrosine phosphatase in TCR-mediated signaling pathways in lipid rafts. *Immunity* 14:669.
245. Campbell, K. S., M. Cella, M. Carretero, M. Lopez-Botet, and M. Colonna. 1998. Signaling through human killer cell activating receptors triggers tyrosine phosphorylation of an associated protein complex. *Eur J Immunol* 28:599.
246. Jevremovic, D., D. D. Billadeau, R. A. Schoon, C. J. Dick, B. J. Irvin, W. Zhang, L. E. Samelson, R. T. Abraham, and P. J. Leibson. 1999. Cutting edge: a role for the adaptor protein LAT in human NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 162:2453.
247. Gary-Gouy, H., V. Lang, S. Sarun, L. Boumsell, and G. Bismuth. 1997. In vivo association of CD5 with tyrosine-phosphorylated ZAP-70 and p21 phospho-zeta molecules in human CD3+ thymocytes. *J Immunol* 159:3739.
248. Zubiaur, M., M. Izquierdo, C. Terhorst, F. Malavasi, and J. Sancho. 1997. CD38 ligation results in activation of the Raf-1/mitogen-activated protein kinase and the CD3-zeta/zeta-associated protein-70 signaling pathways in Jurkat T lymphocytes. *J Immunol* 159:193.
249. Silverman, L. B., R. C. Wong, E. Remold-O'Donnell, D. Vercelli, J. Sancho, C. Terhorst, F. Rosen, R. Geha, and T. Chatila. 1989. Mechanism of mononuclear cell activation by an anti-CD43 (sialophorin) agonistic antibody. *J Immunol* 142:4194.
250. van Oers, N. S., P. E. Love, E. W. Shores, and A. Weiss. 1998. Regulation of TCR signal transduction in murine thymocytes by multiple TCR zeta-chain signaling motifs. *J Immunol* 160:163.
251. Liu, Y. C., and H. Gu. 2002. Cbl and Cbl-b in T-cell regulation. *Trends Immunol* 23:140.
252. Wang, H. Y., Y. Altman, D. Fang, C. Elly, Y. Dai, Y. Shao, and Y. C. Liu. 2001. Cbl promotes ubiquitination of the T cell receptor zeta through an adaptor function of Zap-70. *J Biol Chem* 276:26004.
253. Naramura, M., H. K. Kole, R. J. Hu, and H. Gu. 1998. Altered thymic positive selection and intracellular signals in Cbl-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15547.

254. Thien, C. B., D. D. Bowtell, and W. Y. Langdon. 1999. Perturbed regulation of ZAP-70 and sustained tyrosine phosphorylation of LAT and SLP-76 in c-Cbl-deficient thymocytes. *J Immunol* 162:7133.
255. Cullinan, P., A. I. Sperling, and J. K. Burkhardt. 2002. The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse. *Immunol Rev* 189:111.
256. Lederman, S., M. J. Yellin, G. Inghirami, J. J. Lee, D. M. Knowles, and L. Chess. 1992. Molecular interactions mediating T-B lymphocyte collaboration in human lymphoid follicles. Roles of T cell-B-cell-activating molecule (5c8 antigen) and CD40 in contact-dependent help. *J Immunol* 149:3817.
257. Udaka, K., T. J. Tsomides, and H. N. Eisen. 1992. A naturally occurring peptide recognized by alloreactive CD8+ cytotoxic T lymphocytes in association with a class I MHC protein. *Cell* 69:989.
258. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394.
259. Young, J. W., L. Koulova, S. A. Soergel, E. A. Clark, R. M. Steinman, and B. Dupont. 1992. The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4+ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. *J Clin Invest* 90:229.
260. Ward, S. G. 1996. CD28: a signalling perspective. *Biochem J* 318:361.
261. Greenfield, E. A., K. A. Nguyen, and V. K. Kuchroo. 1998. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol* 18:389.
262. Noel, P. J., L. H. Boise, and C. B. Thompson. 1996. Regulation of T cell activation by CD28 and CTLA4. *Adv Exp Med Biol* 406:209.
263. Guntermann, C., and D. R. Alexander. 2002. CTLA-4 suppresses proximal TCR signaling in resting human CD4(+) T cells by inhibiting ZAP-70 Tyr(319) phosphorylation: a potential role for tyrosine phosphatases. *J Immunol* 168:4420.
264. Perez, V. L., L. Van Parijs, A. Biuckians, X. X. Zheng, T. B. Strom, and A. K. Abbas. 1997. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 6:411.

APENDICE I

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

APENDICE I

Molécula	Tipo de molécula	Función
Actina	Proteína estructural del citoesqueleto	Rearreglos del citoesqueleto
CD2	Molécula de adhesión celular	Adhesión celular y coestimulación
CD4	Co-receptora	Coestimulación en linfocitos T
CD5	Glicoproteína de superficie celular	Regula la activación celular
CD8	Co-receptora	Coestimulación en linfocitos T
CD16	Receptor de baja afinidad para IgG agregadas	Media la fagocitosis y cototoxicidad celular
CD26	Glicoproteína transmembranal de tipo II	Proteasa de membrana celular, activación y adhesión celular
CD28	Co-receptora	Coestimulación de linfocitos T
CD38	Glicoproteína transmembranal de tipo II	Participa en la síntesis de ADP-ribosa cíclica; proliferación
CD45	Fosfatasa transmembranal	Necesaria para la señalización a través del TCR
CD56	Molécula de adhesión celular	Adhesión celular
CD71	Receptor para transferrina	Activación celular
Cbl	Proteína adaptadora (citósólica)	Regula negativamente la vía de señalización del TCR
Csk	Cinasa de tirosinas	Regula negativamente la función de Lck y Fyn
Ezrina	Proteína del citoesqueleto	Media la asociación de proteínas de superficie con el citoesqueleto de actina
ERK 1/2	Cinasa de tirosinas y treoninas	Fosforila factores de transcripción
Fak	Cinasa de tirosinas	Participa en rearreglos del citoesqueleto y adhesiones focales
Fyn	Cinasa de tirosinas	Fosforilación de los ITAMs y otras proteínas
Galectina-1	Lectina tipo S	Adhesión celular
Grb2	Proteína adaptadora (citósólica)	Regula la vía de MAP cinasas
LAT	Proteína adaptadora (transmembranal)	Participa en la señalización intracelular
Lck	Cinasa de tirosinas	Fosforilación de los ITAMs y otras proteínas
Lyn	Cinasa de tirosinas	Señalización intracelular
Moesina	Proteína del citoesqueleto	Media la asociación de proteínas de superficie con el citoesqueleto de actina

NF-AT	Factor de transcripción	Regula la transcripción de genes para citocinas
NFκB	Factor de transcripción	Regula la transcripción de genes Para citocinas
PI3-K	Cinasa de fosfoinositodos	Señalización intracelular
PKC	Cinasas de serina y treonina	Señalización intracelular
PLC-γ	Enzima de fosfolípidos	Degradación de PI 3,4 P ₂
PYK-2	Cinasa de tirosina	Rearreglos del citoesqueleto
Ras	GTPasa	Activa a ERK1/2
Rac	GTPasa	Rearreglos del citoesqueleto
Rho	GTPasa	Rearreglos del citoesqueleto
Shc	Proteína adaptadora (citosólica)	Señalización intracelular
SLP-76	Proteína adaptadora (citosólica)	Señalización intracelular
Sos	Factor intercambiador de nucleótidos de gunaina	Activador de Ras
Vav	Factor intercambiador de nucleótidos de gunaina	Señalización intracelular
ZAP-70	Cinasa de tirosinas	Señalización intracelular
Zyk	Cinasa de tirosinas	Señalización intracelular

APENDICE II

TESIS CON
FALSA FE ORCEN

The CD43 Coreceptor Molecule Recruits the ζ -Chain as Part of Its Signaling Pathway¹

Mario Ernesto Cruz-Muñoz,* Enrique Salas-Vidal,* Norma Salaiza-Suazo,[†] Ingeborg Becker,[†] Gustavo Pedraza-Alva,^{2*} and Yvonne Rosenstein^{3*}

CD43 is an abundant cell surface sialoglycoprotein implicated in hemopoietic cell adhesion and activation. Cell stimulation through CD43 results in recruitment of different signaling proteins, including members of the Src family kinases, Syk, phospholipase C γ 2, the adapter protein Shc, the guanine nucleotide exchange factor Vav, and activation of protein kinase C. In this study, we report that in human T lymphocytes, the ζ -chain is part of the CD43 signaling pathway. Upon CD43 engagement, the ζ -chain was tyrosine-phosphorylated, generating docking sites for tyrosine-phosphorylated ζ -associated protein of 70 kDa and Vav. In vitro kinase assays suggested that ζ -associated protein of 70 kDa could account for the kinase activity associated with the ζ -chain following CD43 engagement. Cross-linking CD43 on the surface of the Lck-deficient JCaM1 cells failed to phosphorylate the ζ -chain and associated proteins, suggesting that Lck is a key element in the CD43 signaling pathway leading to ζ phosphorylation. CD43 engagement with beads coated with anti-CD43 mAb resulted in concentration of the ζ -chain toward the bead attachment site, but interestingly, the distribution of the T cell Ag receptor complex remained unaffected. Recruitment of the ζ -chain through CD43-mediated signals was not restricted to T lymphocytes because phosphorylation and redistribution of the ζ -chain was also observed in NK cells. Our results provide evidence that the ζ -chain functions as a scaffold molecule in the CD43 signaling pathway, favoring the recruitment and formation of downstream signaling complexes involved in the CD43-mediated cell activation of T lymphocytes and other leukocytes such as NK cells. *The Journal of Immunology*, 2003, 171: 1901–1908.

To evoke an effective immune response, T lymphocytes respond to a variety of signals generated by coreceptor molecules, in addition to those of the T cell Ag receptor. Integration of that information will result in a particular intracellular signaling cascade, ultimately leading to a fully differentiated effector T cell. Coreceptor molecules provide the cells with the capacity to discriminate the context in which Ag is presented, regulating T cell-APC interactions as well as the threshold for T cell activation. In addition, signals generated through these molecules modulate other facets of the T cell response such as anergy or apoptosis (1, 2).

In conjunction with the CD3 γ -, δ -, ϵ -chains, the ζ -chain constitutes the signaling apparatus of the TCR. However, usage of the ζ -chain is not restricted to the TCR-CD3 signaling pathway. Coreceptor molecules, such as CD2, CD4, CD5, CD8, CD16, CD26, CD45, CD59, and CD71 (3–10) have been found to associate with the CD3- ζ complex as well as with members of the Src family kinases such as Lck and Fyn as part of their signaling pathways. The intracellular domains of ζ -chain include a signaling motif

called immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)⁴ that comprises the consensus sequence Yxx(L/I)_nxxYxx(L/I) (11). The cytoplasmic tail of the ζ -chain contains three ITAMs with six tyrosine phosphorylation sites. Lck and Fyn are responsible for phosphorylation of the tyrosine residues within the ITAMs of the ζ -chain, creating binding sites for the Syk family kinase members. ζ -associated protein of 70 kDa (ZAP-70) and Syk. Once ZAP-70 is recruited to the phosphorylated ITAMs, it is activated following phosphorylation by Src family kinases (2), leading to the recruitment of adapter proteins and effectors enzymes, such as linker for activation of T cells (LAT), Shc, growth factor bound protein (Grb2), phospholipase C (PLC) γ , Vav, and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa (SLP-76) (12).

CD43 is a sialoglycoprotein expressed on the surface of all hemopoietic cells except erythrocytes (13). It is a member of the growing family of cell surface-associated mucins, which are characterized by the presence of extensive O-linked glycan substitutions and an elongated structure (14, 15). This abundant glycoprotein seems to play multiple roles in regulating leukocyte migration and activation. Due to its extended structure that protrudes 45 nm from the cell surface and its highly glycosylated nature (16), it has been proposed that CD43 constitutes a functional barrier that negatively affects T cell interactions and functions. Lymphocytes from CD43-deficient mice were reported to have enhanced rolling and adhesion in response to chemotactic stimuli, as well as increased in vitro proliferation (17–19). However, using the same model, resulting of their inability to emigrate

*Instituto de Biotecnología and [†]Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

Received for publication March 17, 2003. Accepted for publication June 17, 2003.

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

¹ This work was supported by grants from Dirección General de Apoyo para el Personal Académico Universidad Nacional Autónoma de México and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México. M.E.C.-M. was the recipient of scholarships from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and Dirección General de Estudios de Posgrado Universidad Nacional Autónoma de México.

² Current address: Department of Medicine, University of Vermont, Given Building (32), Burlington, VT 05403.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. Yvonne Rosenstein, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3 Cuernavaca, Morelos 62250, México. E-mail address: yvonne@ibt.unam.mx

⁴ Abbreviations used in this paper: ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ZAP-70, ζ -associated protein of 70 kDa; LAT, linker for activation of T cells; Grb, growth factor bound protein; PLC, phospholipase C; SLP-76, Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa; MAPK, mitogen-activated protein kinase; GEF, guanine exchange factor; IVK, in vitro kinase assay; TC, tricolor; RaMIG, rabbit anti-mouse IgG.



out of the vasculature, CD43^{-/-} leukocytes were found to have an impaired capacity to infiltrate tissues (20).

CD43 can act as a coreceptor molecule on T cells, independently of CD28 expression (21). In human T lymphocytes, CD43 engagement leads to tyrosine phosphorylation and recruitment of the Src family kinases Lck and Fyn to the cytoplasmic tail of CD43 (22, 23). CD43-specific activation of T cells also results in tyrosine phosphorylation of the adapter proteins Shc and SLP-76, promoting the formation of the macromolecular complexes Shc/Grb2/Vav and Vav/SLP-76 and activation of the mitogen-activated protein kinase pathway (24), ultimately regulating gene expression by recruiting transcription factors such as AP-1, NF-AT, and NF- κ B (25). To generate intracellular signals, CD43 requires its intracytoplasmic domain (26). CD43 also transduces signals leading to dendritic cell maturation (27) and activation of NK cells (28). In immature hemopoietic cells, CD43 signals were found to increase the phosphorylation of the tyrosine kinases Syk and Lyn (29) as well as that of PLC γ 2 (30). However, the mechanisms through which CD43 leads to these events are partially understood.

In this report, we demonstrate that in normal human T lymphocytes as well as in Jurkat cells, CD43-specific signals resulted in tyrosine phosphorylation of the ζ -chain, leading to the subsequent association of tyrosine-phosphorylated ZAP-70 and Vav to the ζ -chain. Moreover, CD43-mediated signals induced Lck and Fyn kinase activity. Consistent with this, results of experiments conducted in JCaM.1 cells, a cell line deficient in Lck expression (31), suggested that CD43-dependent tyrosine phosphorylation of the ζ -chain and association of ZAP-70 and Vav to the ζ -chain were all dependent on the presence of Lck. By confocal microscopy, we show that the ζ -chain was recruited to the contact sites between human T lymphocytes and beads coated with a mAb specific for CD43. Interestingly, redistribution of the CD3 complex was unaffected in response to CD43 ligation. Recruitment of the ζ -chain through CD43-mediated signals was not restricted to T lymphocytes because phosphorylation and redistribution of the ζ -chain was also observed in NK cells. Taken together, these data suggest that the ζ -chain participates as a key component in the CD43 signaling pathway in T lymphocytes and other leukocytes such as NK cells.

Materials and Methods

Reagents

L10, an IgG1 mAb that recognizes CD43 (13), and OKT3 (anti-CD3, IgG2; American Type Culture Collection, Manassas, VA) were either purified from ascites on protein A-Sepharose columns or used as ascites. 3D6 is an IgG1 mAb that recognizes the VP7 protein from human rotavirus (32). Rabbit anti-mouse IgG (RaMIG) was generated by repeated immunization with purified mouse IgG and anti-mouse IgG Igs were affinity purified. The anti- ζ -chain, anti- ζ -FITC, anti-p ζ -chain, anti-ZAP-70, and anti-Vav Abs were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The anti-phosphotyrosine 4G10 was from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). The anti-CD3 tricolor (TC) and anti-CD43 PE were from Caltag Laboratories (Burlingame, CA). The polyclonal antisera directed against Lck and Fyn were a gift from Dr. C. Rudd (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA). Polystyrene latex microspheres (3- μ m diameter) were purchased from Polysciences (Warrington, PA), and mAbs were attached to the surface of the bead according to the manufacturer's protocol.

Cells

Jurkat and JCaM.1 cells were cultured in RPMI 1640 (HyClone Laboratories, Logan, UT) supplemented with 5% FCS (HyClone Laboratories) and 5% bovine iron supplemented calf serum (HyClone Laboratories), 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, and 50 μ M 2-ME. Human peripheral blood T cells were isolated from healthy adult donors by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. The buffy coat was washed three times with PBS and resuspended in supplemented RPMI 1640. Adherent cells were removed by plating the cells onto 100-mm Petri dishes (4×10^7 cells/plate) for at least

2 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Nonadherent cells were collected and loaded on nylon wool columns pre-equilibrated with supplemented RPMI 1640. The resultant purified cells were predominantly OKT3⁺ (>80%) and L10⁺ (>95%), as determined by FACS analysis. NK cells were isolated by negative selection using a NK Cell Isolation kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Before activation, all cells were arrested for 24 h in RPMI 1640 supplemented with 2% FCS.

Activation of cells and immunoprecipitation

Purified T lymphocytes, Jurkat cells, or NK cells (2×10^7) were incubated in 0.5 ml of cold RPMI 1640 for 15 min at 4°C with L10, OKT3, or anti-CD16 (1:500 dilution of ascites or 4 μ g/ml purified IgG when indicated). Additional cross-linking was achieved with RaMIG (4 μ g/ml), after which cells were activated by incubating them at 37°C for the indicated periods of time. Cells were then lysed in 25 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.5 mM DTT, 20 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₂VO₄, 5 mM NaF, 4 mM PMSE, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin for 30 min at 4°C. Lysates were spun at 14,000 \times g for 10 min at 4°C and supernatants were pre-cleared with protein A-Sepharose for 1 h at 4°C before immunoprecipitation with the indicated Ab for 2 h or overnight at 4°C. Immune complexes were harvested with protein A-Sepharose for 4 h at 4°C and washed twice with TNE-T (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5, 5 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100), once with TNE (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7.5, 5 mM EDTA) and once with H₂O. Immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted.

Immunoblotting

Proteins were transferred to 0.22- μ m nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Richmond, CA), blocked with 5% BSA or 5% nonfat milk in TBS-T (50 mM Tris, pH 7.5, 0.05% Tween 20) and incubated with the indicated Ab diluted in TBS-T. After three washes with TBS-T, membranes were incubated with the appropriate second Ab coupled to HRP and proteins were visualized by ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK), following the manufacturer's instructions.

In vitro kinase assays (IVKs)

For IVKs, Lck, Fyn, or the ζ -chain were precipitated as described above and immune complexes were washed twice with cold TNE-T, once with TNE and once with kinase buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂). Beads were then incubated at 30°C for 20 min with 50 μ l of the same kinase buffer containing 10 μ Ci [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol; NEN Life Sciences, Boston, MA) and 5 μ g of enzyme, as exogenous substrate. The supernatant was recovered and mixed with an equal volume of 2 \times loading buffer and beads were washed as described above. Proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Radiolabeled proteins were visualized by x-ray film exposure, and intensity of protein phosphorylation was quantitated with a Fluor-S MultiImager (Bio-Rad).

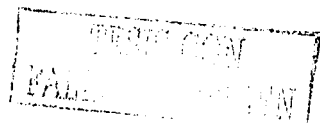
Conjugate formation and immunofluorescence microscopy

Cells were mixed with Ab-coated latex beads at a 1:2 ratio. After centrifugation for 5 min at 100 \times g, the cell-bead mixture was incubated at 37°C, 5% CO₂ for the indicated periods of time. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde at room temperature, permeabilized for 5 min with 0.5% saponin in PBS containing 2% FCS and stained for 30 min with anti- ζ -FITC, anti-CD43-PE, or anti-CD3-TC diluted in PBS/2% FCS. After washing twice with PBS, cells were mounted on glass slides. Samples were observed under an MRC-600 confocal laser scanning system equipped with a krypton argon laser (Bio-Rad) coupled to an Axiocscope microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) with a PlanNeofluar 40 \times (aperture 0.75) or a PlanApochromat 63 \times W Korr (aperture 1.2) objective.

Results

CD43-mediated signals induce the tyrosine phosphorylation of the ζ -chain

We have previously shown that CD43 ligation results in the tyrosine phosphorylation of the adapter proteins Shc, SLP-76, the guanine exchange factor (GEF) Vav, and members of the Src family kinases such as Lck and Fyn (23, 24, 33). In T lymphocytes, recruitment of most of these molecules is dependent on tyrosine phosphorylation of the ζ -chain, a target molecule through which several coreceptors have been found to signal (3, 6, 9, 10). We



investigated whether CD43 also recruited the ζ -chain as part of its signaling pathway. Jurkat cells were activated with the anti-CD43 mAb L10 for different periods of time and participation of the ζ -chain in the CD43-signaling pathway was evaluated. Compared with basal levels, CD43 ligation augmented tyrosine phosphorylation of the ζ -chain in a time-dependent manner, as visualized in the ζ -chain immunoprecipitates (Fig. 1A, lanes 1–5); maximum phosphorylation levels were reached within 1 min of stimulation and decreased after 5 min. No particular effect was detected when incubating the cells with the irrelevant Ab (3D6, IgG1) for up to 20 min; in experiments shown here, cells were treated with the irrelevant mAb for 1 or 5 min. In addition to phosphorylation of the ζ -chain, CD43-dependent signals resulted in enhanced tyrosine phosphorylation of additional proteins that coprecipitated with the ζ -chain. Predominant-associated proteins had molecular masses of 70 and 95 kDa. As was the case for the ζ -chain, maximal phosphorylation of these ζ -chain-associated proteins was observed after 1 and 3 min of stimulation, respectively. Phosphorylation of the 95-kDa protein was very transient (at time 3 min) while that of the 70-kDa protein was sustained for up to 5 min following CD43 engagement, decreasing thereafter. Overall, these data suggest that CD43-mediated signals are highly regulated.

By blotting with anti-Vav Abs, we confirmed that the 95-kDa phosphoprotein associated with the ζ -chain after 3 min of CD43 engagement was Vav (Fig. 1A), a molecule that is tyrosine-phosphorylated in response to CD43 engagement on human T lymphocytes (24). ZAP-70 has been reported as being an essential mole-

cule for carrying downstream signals from the ζ -chain. Blotting the membrane with anti-ZAP-70 Abs revealed that the ζ -chain immune complexes isolated from CD43-stimulated Jurkat cells contained ZAP-70 (Fig. 1A). The ZAP-70 molecules associated to ζ -chain were tyrosine-phosphorylated and association of ZAP-70 to the ζ -chain was dependent on phosphorylation of the ζ -chain itself. The anti- ζ -chain blot showed that comparable amounts of ζ were immunoprecipitated in all lanes (Fig. 1A). When these experiments were conducted on human peripheral blood T lymphocytes (Fig. 1B), an increase in ζ -chain phosphorylation in response to CD43 engagement was also observed, with cells showing an ~3-fold increase in tyrosine phosphorylation of the ζ -chain over basal levels as early as 1 min after stimulation (compare lane 3 vs lanes 1–2), reaching maximal levels (5-fold increase) at 5 min (lane 5), and decreasing slightly thereafter. Proteins associated to the ζ -chain immune complexes were also observed and these proteins were identified as ZAP-70 and Vav as well (data not shown). As was the case for Jurkat cells, association of PY-Vav and PY-ZAP-70 to the ζ -chain were dependent on tyrosine phosphorylation of the ζ -chain. However, this association was only detected at time 5 min, when maximal phosphorylation of the ζ -chain was registered. These results are consistent with previous reports that demonstrate that phosphorylated tyrosine residues of the ζ -chain constitute binding sites for proteins with SH2 domains such as ZAP-70 (12, 34). Altogether, these data suggest that ligating CD43 on the surface of T cells induces tyrosine phosphorylation of the ζ -chain, generating docking sites for tyrosine phosphorylated ZAP-70 and Vav.

The CD43-mediated signals recruit the ZAP-70 kinase

Association of ZAP-70 with the ζ -chain induces the kinase activity of this enzyme, leading to tyrosine phosphorylation of a number of downstream targets including Vav and LAT (35, 36). Because we found ZAP-70 associated with tyrosine-phosphorylated ζ -chain molecules in response to CD43 ligation, we evaluated the enzymatic activity present in ζ -chain immunoprecipitates from Jurkat cells activated with the anti-CD43 mAb L10. IVK activity was reflected on three protein bands (Fig. 2A), two of which were identified as ZAP-70 and the ζ -chain itself (data not shown). In vitro phosphorylation of the ζ -chain as well as that of ZAP-70 molecules was enhanced in response to CD43 ligation, as compared with control cells (compare lanes 2–4 with lane 1). Maximal phosphorylation for both molecules was observed at 3 min, decreasing thereafter (Fig. 2A, lane 3). Equivalent amounts of ζ -chain were immunoprecipitated in all cases (Fig. 2A, bottom panel). The third band (~50 kDa) is a yet unidentified protein (anti-Lck and anti-Fyn Abs did not blot). Altogether, these data suggest that the kinase activity associated with the ζ -chain immune complexes comes from ZAP-70 molecules associated to the ζ -chain.

To further evaluate the recruitment of ZAP-70 to the CD43 signaling pathway, ZAP-70 was immunoprecipitated from CD43-stimulated Jurkat cells and its level of tyrosine phosphorylation was evaluated by anti-phosphotyrosine blot. As shown in Fig. 2B CD43-mediated signals resulted in enhanced tyrosine phosphorylation of ZAP-70 as compared with control mAb-treated cells (compare lanes 1 vs 2–3, top panel); this phosphorylation was maximal at 3-min stimulation, and decreased thereafter. Equivalent amounts of ZAP-70 molecules were immunoprecipitated in all cases (Fig. 2B, bottom panel).

LAT is a transmembrane adapter protein expressed in T lymphocytes, NK cells, mast cells, and platelets, and it is efficiently tyrosine-phosphorylated by the ZAP-70/Syk family protein tyrosine kinases (12, 36). To corroborate that ZAP-70 was activated following CD43 engagement, we assessed LAT phosphorylation

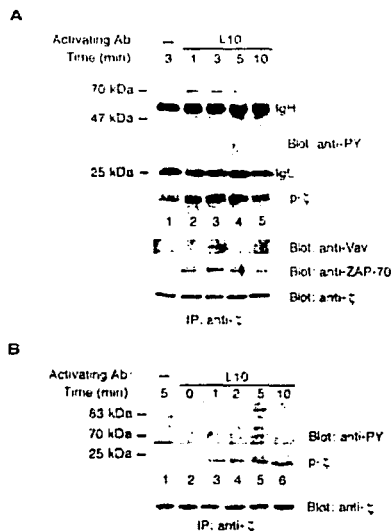


FIGURE 1. CD43-mediated signals induce ζ -chain phosphorylation. Jurkat cells (2×10^7) (A) or human normal peripheral T lymphocytes (B) were stimulated as described under *Materials and Methods* with anti-CD43 L10 mAb for the indicated times at 37°C. Cells were lysed and precleared lysates were immunoprecipitated (IP) with anti- ζ -chain mAb. Immune complexes were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and subjected to immunoblotting with the anti-phosphotyrosine (anti-PY) mAb 4G10 (left panel). Membranes were reprobed with anti- ζ -chain, anti-ZAP-70, or anti-Vav Abs. Migration of molecular mass markers is indicated. Data shown are representative of at least five independent experiments.

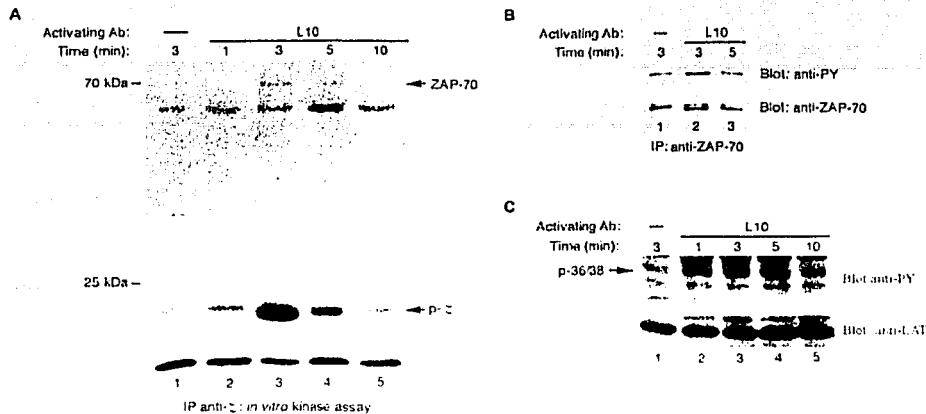


FIGURE 2. CD43-mediated signals induce the recruitment of the ZAP-70 kinase. *A*, ζ -chain immunoprecipitates from unstimulated (*lane 1*) or stimulated Jurkat cells with anti-CD43 L10 mAb (*lanes 2-5*) were subjected to IVKs as described in *Materials and Methods*. Proteins were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and visualized by autoradiography. Membranes were reprobed with the indicated Abs. *B*, Cells were stimulated as above and precleared lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-ZAP-70 mAb. Immune complexes were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and subjected to immunoblotting with the anti-phosphotyrosine (anti-PY) mAb 4G10. The same membranes were reprobed with anti-ZAP-70. *C*, Following stimulation of Jurkat cells with anti-CD43 L10 mAb, cell lysates were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and subjected to immunoblotting with the anti-phosphotyrosine (anti-PY) mAb 4G10. The same membrane was reprobed with anti-LAT Ab. Similar results were obtained in three independent experiments.

as a downstream substrate of ZAP-70. When cell lysates from Jurkat cells stimulated with the anti-CD43 mAb L10 were probed with anti-phosphotyrosine mAb, enhanced tyrosine phosphorylation of a 36/38 kDa protein was observed as compared with unstimulated cells (Fig. 2C). Phosphorylation of this protein was detected at 1 min of stimulation and remained so up to 10 min following activation (*lanes 2-5, top panel*). Reprobing the membrane with an anti-LAT mAb, suggested that the 36/38 kDa protein could be LAT and confirmed equivalent protein loading between lanes (Fig. 2C, *bottom panel*). Altogether, these data suggest that CD43-mediated signals resulted in tyrosine phosphorylation and recruitment of ZAP-70.

CD43 ligation results in Fyn and Lck kinase activity

Members of the Src family kinases such as Lck and Fyn phosphorylate tyrosine residues within the ITAMs of the ζ -chain (1, 2). Phosphorylation of these signaling motifs is necessary to initiate downstream signaling cascades, providing these kinases with a key role in starting and amplifying signals generated through the ζ -chain (12). Cross-linking CD43 on normal human T lymphocytes has been reported to result in Lck and Fyn tyrosine phosphorylation (22, 23). To evaluate the kinase activity of either enzyme, IVKs were conducted on Fyn and Lck immunoprecipitates from L10-stimulated Jurkat cells, using enolase as an exogenous substrate. CD43-mediated signals induced the kinase activity of these enzymes, as reflected by enhanced phosphorylation of enolase (Fig. 3A, *right and left panels*) as well as of additional proteins that coprecipitated with either one (data not shown). However, the kinetics of enolase phosphorylation was slightly different: while maximal phosphorylation by Fyn (3.8-fold over basal levels) was detected at 3 min (Fig. 3A, *left panel, lane 4*), Lck kinase activity reached its maximum (5-fold above basal levels) at 1 min (Fig. 3A, *right panel, lane 9*). Five minutes following CD43 ligation, the enzymatic activity of either kinase decreased (*lanes 5 and 11*),

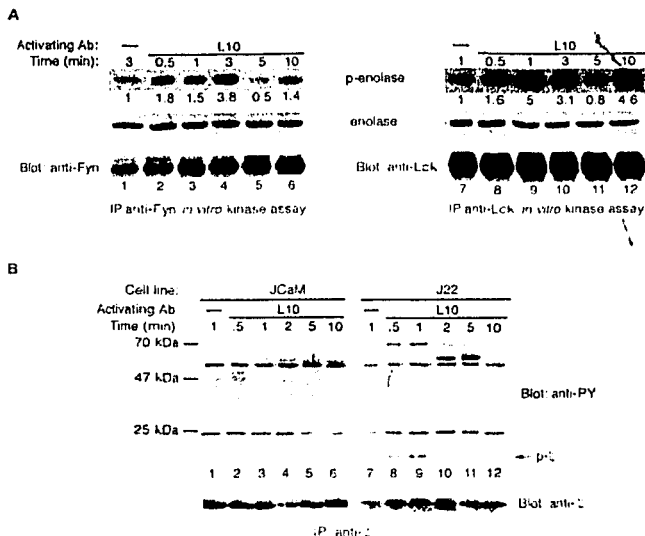
increasing again at 10 min of stimulation (*lanes 6 and 12*). Anti-Lck and anti-Fyn blots showed that similar amounts of protein were immunoprecipitated in all lanes (Fig. 3A, *bottom panels*). Equivalent amounts of enolase were added to each sample, as detected by Coomassie stain of the gel (Fig. 3A, *middle panel*); the densitometric values ((*p*-enolase/enolase)/Fyn or Lck) correct for the amount of Fyn/Lck kinase activity lead CD43-mediated signals downstream.

The fact that Lck and Fyn kinase activity were enhanced following CD43 engagement led us to investigate whether these kinases act indistinctly over the CD43-dependent ζ -chain phosphorylation. Despite the fact that similar amounts of the ζ molecule were immunoprecipitated in all lanes (Fig. 3B, *bottom panel*), cross-linking CD43 on the surface of the Lck-deficient JCaM.1 cells did not result in tyrosine phosphorylation of the ζ -chain, nor of those proteins found to associate with it (Fig. 3, *lanes 1-6*). As expected, in Jurkat cells, CD43 ligation resulted in enhanced phosphorylation of the ζ -chain molecules and association of phosphoproteins to immunoprecipitated ζ -chain molecules (Figs. 3, *lanes 7-12*, and 1). These data suggest that Lck is necessary to mediate the CD43-dependent tyrosine phosphorylation of the ζ -chain and subsequent association of phosphorylated ZAP-70 and Vav.

CD43 ligation leads to redistribution of the ζ -chain in T lymphocytes

Using T lymphocytes isolated from normal human peripheral blood activated with immobilized anti-CD43 mAb, we evaluated whether CD43-mediated signals resulted in relocation of the ζ -chain. Latex beads coated with the anti-CD43 mAb L10, anti-CD3e mAb OKT3, RaM11G, or BSA were mixed with T cells at a 2:1 ratio and incubated for different periods of time. Conjugates were fixed and stained for ζ , TCR-CD3, or CD43, and analyzed

FIGURE 3. Fyn and Lck kinases are activated in response to CD43 cross-linking on the T cell surface. *A*, Jurkat cells (2×10^7) were stimulated with the anti-CD43 mAb L10 for the indicated times. IVKs were performed on Fyn or Lck immune complexes isolated from cell lysates. Supernatants containing the substrate (enolase) were separated by SDS-PAGE and phosphorylation was visualized by x-ray film exposure; membranes were probed with anti-Fyn or Lck polyclonal Ab; Coomassie staining shows amounts of enolase loaded in each lane. *B*, JCaM1 cells (lanes 1–6) or Jurkat cells (lanes 7–12) were stimulated as described under *Materials and Methods* with anti-CD43 L10 mAb for the indicated times at 37°C. Pre-cleared lysates were immunoprecipitated (IP) with anti- ζ -chain mAb. Immune complexes were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and subjected to immunoblotting with anti-phosphotyrosine (anti-PY) mAb 4G10. Membranes were re-probed with anti- ζ -chain Abs. Equivalent results were obtained in three independent experiments.



under confocal microscopy. Most T cells (>90%) formed conjugates with anti-CD43 mAb-coated beads. Looking for those conjugates formed by one cell and one or two beads, we analyzed the redistribution of the ζ -chain and the CD3 complex. As shown in Fig. 4*A*, in the majority of conjugates ($76\% \pm 12$), the ζ -chain was polarized to the cell/bead site attachment at times evaluated (15 and 30 min). Interestingly, in most cases ($90 \pm 6\%$), the TCR-CD3 complex remained uniformly distributed on the cell surface. Only 5% of the cells formed conjugates with control beads (BSA-coated) and no redistribution of the ζ -chain or of the CD3 complex was observed. Consistent with what has been reported (21, 37, 38), when cells were incubated with OKT3-coated beads, CD43 was excluded from the cell/bead contact area (Fig. 4*B*). As expected, when cells were stimulated with L10-coated beads, CD43 was concentrated to the bead site attachment (Fig. 4*B*), and RaMIG-coated beads did not induce redistribution of CD43. Thus, following CD43 ligation there is a relocation of the ζ -chain to the contact sites between CD43 and anti-CD43-coated beads and, contrary to what has been described, when T cells are stimulated through the TCR (21, 37, 38), CD43 ligation does not induce the redistribution of the TCR-CD3 complex.

CD43-mediated signals recruit the ζ -chain in NK cells

In NK cells, CD43 has been reported to be a molecule that transduces activation signals resulting in tyrosine kinase activity, chemokine synthesis, proliferation, and cytotoxic activity (28, 39). The ζ -chain is also expressed on the surface of NK cells, where it associates with CD16 (40). When interacting with Ab-coated targets, CD16 signals through ITAM motifs of both the ζ -chain and the Fc ϵ R1 γ -chain (6, 40). To test whether CD43 also recruited the ζ -chain in NK cells, we evaluated phosphorylation of the ζ -chain in response to CD43 cross-linking on the cell surface of normal human NK cells. NK cells were stimulated for 3 min with the anti-CD43 mAb L10 or with an anti-CD16 mAb, as a positive control (6). As shown in Fig. 5*A*, CD43 ligation on NK cells resulted in enhanced ζ -chain tyrosine phosphorylation as compared

with control cells (compare lanes 1 and 3). As expected, CD16 ligation (lane 2) resulted in enhanced ζ -chain phosphorylation although to a lower extent than that induced through CD43, at least at that time point. The anti- ζ -chain blot shows that comparable amounts of ζ were immunoprecipitated in all lanes (bottom panel). These data suggest that the ζ -chain is also recruited in NK cells as a result of CD43-mediated signals.

Moreover, we evaluated whether CD43 ligation resulted in redistribution of the ζ -chain in NK cells. Latex beads coated with the anti-CD43 mAb L10 were mixed with human peripheral blood NK cells and incubated for different periods of time. Similar to what we found with T cells, but with different kinetics, we observed that at 30 min, the ζ -chain was concentrated toward the bead site contact. In the very few conjugates formed when cells were incubated with beads coated with RaMIG, no particular redistribution of the ζ -chain was observed (Fig. 5*B*). Altogether these data show that in NK cells, the ζ -chain is also recruited in response to CD43 ligation.

Discussion

CD43 is a coreceptor molecule thought to regulate numerous cellular functions in T lymphocytes (41), dendritic cells (27), NK cells (28), monocytes (42), as well as neutrophils (43, 44). In all these cells, CD43 recruits a variety of signaling molecules including members of the Src family kinases (22, 23, 29, 43), PLC γ 2 (30), the adhesion kinase proline-rich tyrosine kinase 2 (28), the GEF Vav, the adapter molecules Shc and Grb2, and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway (24). However, little is known about the early mechanisms through which CD43 recruits these molecules.

Phosphorylation of the ζ -chain on tyrosine residues creates docking sites for proteins with SH2 domains such as ZAP-70 and phosphatidylinositol 3-kinase, leading to the formation of active signaling complexes that allow for the diversification of the signaling pathways (12). Data reported here show that CD43 engagement on the surface of Jurkat as well as of normal human

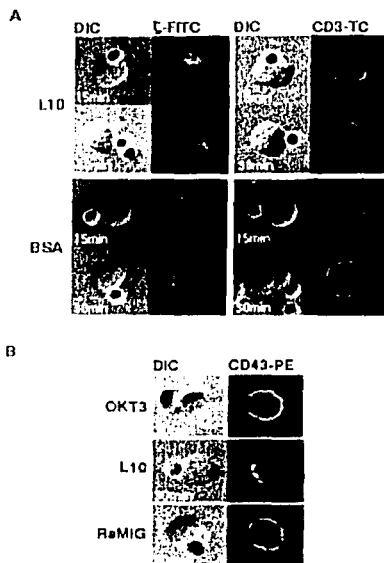


FIGURE 4. Anti-CD43 coated latex beads induce the redistribution of ζ -chain in T cells. T cells were mixed at a 1:2 ratio with anti-CD43- or BSA-coated latex beads (A) or alternatively with anti-CD3- or RaMIG-coated beads (B) and incubated at 37°C for the indicated times. Conjugates were washed with PBS containing 2% FCS and sodium azide. Cells were then fixed with 2% paraformaldehyde, permeabilized with 0.05% saponin in PBS, and were stained with the anti- ζ -chain-FITC mAb, anti-CD3 TC (A), or anti-CD43 PE (B). After washing with PBS, cells were mounted on glass slides using 50% PBS:50% glycerol.

peripheral blood T lymphocytes resulted in transient phosphorylation of the ζ -chain and enhanced association and phosphorylation of the tyrosine kinase ZAP-70 and the GEF Vav to the ζ -chain. We also show that in response to the CD43-mediated signals, there is tyrosine kinase activity associated to the ζ -chain. The fact that increased tyrosine phosphorylation of ZAP-70 was detected in ZAP-70 immunoprecipitates from CD43-stimulated cells together with the fact that we could not find Lck or Fyn associated to the ζ -chain of Jurkat cells or peripheral blood T lymphocytes suggests that ZAP-70 is a key molecule to recruit downstream effector molecules such as LAT and Vav to the CD43-specific signaling pathway. The different kinetics in ζ -chain phosphorylation we observed between Jurkat cells and T lymphocytes can result of the intrinsic differences between both cell types as well as of the fact that individual blood donors have slightly different kinetics and activation levels. In a previous report, we showed that in human T lymphocytes, CD43 cross-linking phosphorylated the adapter protein Shc, promoting the formation of Shc/Grb2/Vav complexes (24). Because we could not detect Shc in the ζ -chain immunoprecipitates isolated from CD43-stimulated cells, the presence of Vav molecules in the ζ -chain immune complexes may result of the interaction between ZAP-70 and Vav, suggesting that different pools of Vav can be recruited through the CD43-mediated signals. Additional experiments are required to clarify this point.

The Src family kinases play an essential role in leukocyte activation through several cell surface molecules including CD43 (3-5, 22, 23). These kinases phosphorylate tyrosine residues of

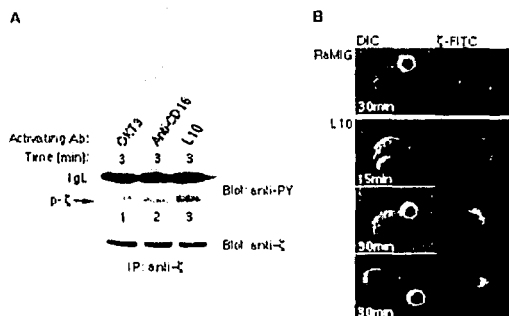


FIGURE 5. CD43-mediated signals recruit the ζ -chain in NK cells. A, NK cells (2×10^7) were stimulated as described under *Materials and Methods* with the indicated mAbs for 3 min at 37°C. Cells were lysed and precleared lysates were immunoprecipitated (IP) with anti- ζ -chain mAb. Immune complexes were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and subjected to immunoblotting with anti-phosphotyrosine (anti-PY) mAb 4G10. The same membranes were re-probed with anti- ζ -chain Abs. Data shown are representative of two independent experiments. B, NK cells were mixed at a 1:2 ratio with anti-CD43- or RaMIG-coated latex beads. After 15 or 30 min at 37°C, conjugates were washed with PBS containing 2% FCS and sodium azide, fixed, permeabilized, and stained with anti- ζ -chain-FITC. After washing with PBS, cells were mounted on glass slides using 50% PBS:50% glycerol.

numerous substrates, among which are the ITAM motifs. In this study, we show that CD43 engagement results in Fyn and Lck activation, as determined by *in vitro* phosphorylation of enolase and increased phosphorylation of additional proteins that coprecipitated with these kinases (data not shown). Interestingly, a decrease in enolase phosphorylation was observed at 5 min of stimulation and a new peak was reached within 10 min of stimulation, suggesting a biphasic wave of Lck and Fyn activity. The fact that we could not detect enhanced Fyn or Lck phosphorylation levels in the Fyn or Lck immunoprecipitates used for IVK assays in response to CD43 cross-linking could be the result of their high constitutive phosphorylation, as has been suggested (45), or alternatively could be due to the comigration of phosphorylated IgG H chains with Fyn and Lck. However, when the Fyn or Lck immunoprecipitates were blotted with an anti-phosphotyrosine mAb, an increase in tyrosine phosphorylation of Fyn and Lck was observed (data not shown, and Refs. 22 and 23). Consistent with data showing that Lck is necessary for tyrosine phosphorylation of the ζ -chain as well as of associated ZAP-70 (31), experiments conducted on the Lck-deficient JCaM.1 cells demonstrated that Lck is necessary for tyrosine phosphorylation of the ζ -chain and subsequent association and activation of ZAP-70 in response to CD43 ligation.

Using latex beads coated with the anti-CD43 mAb L10, we found that the ζ -chain and the CD43 molecules were recruited to the contact zone between the T lymphocyte and the bead. This polarization was detectable as soon as 5 min after the onset of the experiment and remained so at least for 30-40 min. Interestingly, distribution of the TCR-CD3 complex was unaffected in response to CD43 ligation. Because Vav has been shown to be necessary for the recruitment of the ζ -chain to the actin cytoskeleton and subsequent polarization of the ζ -chain following TCR engagement (46), it is possible that through the ζ -chain-Vav association we

report here, the CD43-mediated signals recruit the actin cytoskeleton and induce the redistribution of the ζ -chain, as shown in response to TCR-ligation. Experiments conducted in Vav-deficient cells could address this issue.

In NK cells, the ζ -chain is also associated to CD2 and CD16 (6, 47). Here, we report that in NK cells, as in T cells, the ζ -chain is phosphorylated in response to CD43 ligation. Similar to what we found in T cells, the ζ -chain was concentrated toward the contact site with the anti-CD43-coated beads. Whether the ζ -chain phosphorylation we observe in response to CD43 cross-linking also induces the recruitment and activation of ZAP-70 in NK cells remains to be determined.

Recently, CD43-dependent signals were shown to enhance HIV type 1 transcriptional activity and virus production induced through TCR stimulation (48). Interestingly, Lck, and the scaffold proteins LAT and SLP-76 were all required for the HIV-1 transcriptional activity mediated through TCR and CD43 costimulation, suggesting a crucial role for Lck, LAT, and SLP-76 in the CD43-mediated signaling pathway. In immature hemopoietic cells, CD43 cross-linking induced Lyn and Syk phosphorylation (29). Unpublished data from our laboratory have shown that in T lymphocytes, Syk is also recruited in response to CD43 signals.⁵ The precise role of Syk and ZAP-70 in the CD43 signaling pathway is currently being investigated.

Altogether, these data suggest that tyrosine phosphorylation and relocation of the ζ -chain resulting of CD43-dependent signals provide a mechanism through which this molecule may recruit downstream effectors such as ZAP-70, LAT, or SLP-76. The ζ -chain might function as a scaffold molecule that favors the formation of signaling complexes involved in T and NK cell activation following CD43 ligation. It will be of interest to evaluate whether other molecules containing ITAMs, i.e., the γ -chain and kinases such as Syk, function as key elements of the CD43-mediated signals in those cells that do not express ζ -chain molecules and/or ZAP-70.

Acknowledgments

We thank Dr. Eduardo Huerta for leukocyte concentrates and Xochitl Alvarado and Erika Melchly for technical assistance.

References

- Janeway, C. A., Jr., and K. Bottomly. 1994. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 76:275.
- Weiss, A., and D. R. Littman. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76:263.
- Gassmann, M., K. E. Amrein, N. A. Flint, B. Schraven, and P. Burn. 1994. Identification of a signaling complex involving CD2, ζ -chain and p59^{lck} in T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 24:139.
- Barber, E. K., J. D. Dasgupta, S. F. Schlossman, J. M. Trevisan, and C. E. Rudd. 1989. The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56^{lck}) that phosphorylates the CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3277.
- Gary-Gouy, H., V. Lang, S. Sarun, L. Boamsell, and G. Bismuth. 1997. In vivo association of CD5 with tyrosine-phosphorylated ZAP-70 and p21 phospho- ζ molecules in human CD3⁺ thymocytes. *J. Immunol.* 159:3739.
- Lanier, L. L., G. Yu, and J. H. Phillips. 1989. Co-association of CD3 ζ with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* 342:803.
- Mittrecker, H. W., C. Steeg, B. Malissen, and B. Fleischer. 1995. The cytoplasmic tail of the T cell receptor ζ chain is required for signaling via CD26. *Eur. J. Immunol.* 25:295.
- Leitenberg, D., Y. Boutin, D. Lu, and K. Bottomly. 1999. Biochemical association of CD45 with the T cell receptor complex: regulation by CD45 isoform and during T cell activation. *Immunity* 10:701.
- Decker, M., M. Tschöni, B. Mani, D. Mary, and A. Bernard. 1995. The glycosylphosphatidylinositol-anchored CD59 protein stimulates both T cell receptor ζ ZAP-70-dependent and -independent signaling pathways in T cells. *Eur. J. Immunol.* 25:1815.

- Salmeron, A., A. Borroto, M. Fresno, M. J. Crumpton, S. C. Ley, and B. Alarcón. 1995. Transferrin receptor induces tyrosine phosphorylation in T cells and is physically associated with the TCR ζ -chain. *J. Immunol.* 154:1675.
- Cambier, J. C. 1995. New nomenclature for the Reth motif (or ARHYAM/ARAM/YNXL). *Immunol. Today* 16:110.
- van Leeuwen, J. E., and L. F. Samelson. 1999. T cell antigen-receptor signal transduction. *Curr. Opin. Immunol.* 11:242.
- Remold-O'Donnell, E., C. Zimmermann, D. Kenney, and F. S. Rosen. 1987. Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 70:104.
- Carlsson, S. R., and M. Fukuda. 1986. Isolation and characterization of leuko-sialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes. *J. Biol. Chem.* 261:12779.
- Fukuda, M., S. R. Carlsson, J. C. Klock, and A. Dell. 1986. Structures of O-linked oligosaccharides isolated from normal granulocytes, chronic myelogenous leukemia cells, and acute myelogenous leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 261:12796.
- Cyster, J., C. Somoza, N. Kilgus, and A. F. Williams. 1990. Protein sequence and gene structure for mouse leuko-sialin (CD43), a T lymphocyte mucin without introns in the coding sequence. *Eur. J. Immunol.* 20:875.
- Manjunath, N., R. S. Johnson, D. E. Staunton, R. Pasqualini, and B. Ardman. 1993. Targeted disruption of CD43 gene enhances T lymphocyte adhesion. *J. Immunol.* 151:1528.
- Manjunath, N., M. Correa, M. Ardman, and B. Ardman. 1995. Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature* 377:535.
- McEvoy, L. M., H. Sun, J. G. Frelinger, and C. E. Butcher. 1997. Anti-CD43 inhibition of T cell homing. *J. Exp. Med.* 185:1493.
- Woodman, R. C., B. Johnston, M. J. Hickey, D. Teoh, P. Reinhardt, B. Y. Poon, and P. Kubersky. 1998. The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice. *J. Exp. Med.* 188:2181.
- Sperling, A. L., J. M. Green, R. L. Mosley, P. L. Smith, R. J. DiPaolo, J. R. Klein, J. A. Bluestone, and C. B. Thompson. 1995. CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28. *J. Exp. Med.* 182:139.
- Alvarado, M., C. Klassen, J. Cerny, Y. Horejsi, and R. E. Schmidt. 1995. MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation. *Eur. J. Immunol.* 25:1051.
- Pedraza-Alva, G., L. B. Merida, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein. 1996. CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Lyn kinase. *J. Biol. Chem.* 271:27564.
- Pedraza-Alva, G., L. B. Merida, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein. 1998. T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation. *J. Biol. Chem.* 273:14278.
- Santana, M. A., G. Pedraza-Alva, N. Olivares-Zavalta, V. Madrid-Marina, V. Horejsi, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein. 2000. CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NFAT, and NFkB transcription factors in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 275:3160.
- Park, J. K., Y. J. Rosenstein, E. Remold-O'Donnell, B. E. Bierer, F. S. Rosen, and S. J. Burakoff. 1991. Enhancement of T-cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Nature* 350:706.
- Corniti, S., E. Fanales-Belasio, C. Albanesi, A. Cavani, P. Angelisova, and G. Girolomoni. 1999. Cross-linking of membrane CD43 mediates dendritic cell maturation. *J. Immunol.* 162:6331.
- Nieto, M., J. L. Rodriguez-Fernandez, F. Navarro, D. Sancho, J. M. Frade, M. Mellado, A. C. Martinez, C. Cabanas, and F. Sanchez-Madrid. 1999. Signaling through CD43 induces natural killer cell activation, chemokine release, and PKC- ζ activation. *Blood* 94:2767.
- Tada, J., M. Omine, T. Suda, and N. Yamaguchi. 1999. A common signaling pathway via Syk and Lyn tyrosine kinases generated from capping of the sialomucins CD34 and CD43 in immature hematopoietic cells. *Blood* 93:3723.
- Anzai, N., A. Gotoh, H. Shibayama, and Y. E. Brommeyer. 1999. Modulation of integrin function in hematopoietic progenitor cells by CD43 engagement: possible involvement of protein tyrosine kinase and phospholipase C- γ . *Blood* 93:3317.
- Siraus, D. B., and A. Weiss. 1992. Genetic evidence for the involvement of the *lck* tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 70:585.
- Padilla, S. L., R. Werner-Eckert, E. R. Mackow, M. Gorzigha, G. Larralde, K. Taniguchi, and H. B. Greenberg. 1993. Serological analysis of human rotavirus serotypes P1A and P2 by using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 31:622.
- Pedraza-Alva, G., S. Sawasdi-Kosol, Y. C. Liu, L. B. Merida, M. E. Cruz-Munoz, F. Ozeuguera-Yanez, S. J. Burakoff, and Y. Rosenstein. 2001. Regulation of Cbl molecular interactions by the co-receptor molecule CD43 in human T cells. *J. Biol. Chem.* 276:729.
- Neumeister, E. N., Y. Zhu, S. Richard, C. Terhorst, A. C. Chan, and A. S. Shaw. 1995. Binding of ZAP-70 to phosphorylated T-cell receptor ζ and η enhances its autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins. *Mol. Cell. Biol.* 15:3171.
- Michel, F., L. Grimaud, L. Tuosto, and O. Auci. 1998. Fyn and ZAP-70 are required for Vav phosphorylation in T cells stimulated by antigen-presenting cells. *J. Biol. Chem.* 273:3192.
- Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R. P. Trible, and L. F. Samelson. 1998. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92:83.
- Sperling, A. L., J. R. Sedy, N. Manjunath, A. Kupfer, B. Ardman, and J. K. Burkhardt. 1998. TCR signaling induces selective exclusion of CD43 from the T cell-antigen-presenting cell contact site. *J. Immunol.* 161:6439.
- Delon, J., K. Kaibuchi, and R. N. Germain. 2001. Exclusion of CD43 from the

⁵E. Layseca-Espinoza, G. Pedraza-Alva, J. L. Montiel, R. Del Rio, N. A. Fierro, R. González-Amaro, and Y. Rosenstein. T cell aggregation induced through CD43: intracellular signals and inhibition by the immunomodulatory drug Lefunomide. Submitted for publication.

- immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* 13:697.
39. Aguado, E., M. Santamaría, M. D. Gallego, J. Pena, and I. J. Molina. 1999. Functional expression of CD43 on human natural killer cells. *J. Leukocyte Biol.* 66:923.
40. Lanier, L. L., G. Yu, and J. H. Phillips. 1991. Analysis of Fc γ RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 ζ and Fc epsilon RI- γ by site-directed mutation. *J. Immunol.* 146:1571.
41. Rosenstein, Y., A. Santana, and G. Pedraza-Alva. 1999. CD43, a molecule with multiple functions. *Immunol. Res.* 20:89.
42. Nong, Y. H., E. Remold-O'Donnell, T. W. LeBien, and H. G. Remold. 1989. A monoclonal antibody to sialophorin (CD43) induces homotypic adhesion and activation of human monocytes. *J. Exp. Med.* 170:259.
43. Skubitz, K. M., K. D. Campbell, and A. P. Skubitz. 1998. CD43 is associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J. Leukocyte Biol.* 64:800.
44. Kuipers, T. W., M. Hoogerwerf, K. C. Kuipers, B. R. Schwartz, and J. M. Harlan. 1992. Cross-linking of sialophorin (CD43) induces neutrophil aggregation in a CD18-dependent and a CD18-independent way. *J. Immunol.* 149:998.
45. Navier, R., T. Brennan, Q. Li, C. McCormack, and B. Seed. 1998. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8:623.
46. Fischer, K. D., Y. Y. Kong, H. Nishina, K. Tedford, L. E. Marenberg, I. Kozieradzki, T. Sasaki, M. Starr, G. Chan, S. Gardener, et al. 1998. Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr. Biol.* 8:554.
47. Moingeon, P., J. L. Lucich, D. J. McConkey, F. Letourneur, B. Malissen, J. Kochan, H. C. Chang, H. R. Rodewald, and E. L. Reinherz. 1992. CD3 ζ dependence of the CD2 pathway of activation in T lymphocytes and natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1492.
48. Barat, C., and M. J. Tremblay. 2002. Engagement of CD43 enhances human immunodeficiency virus type 1 transcriptional activity and virus production that is induced upon TCR/CD3 stimulation. *J. Biol. Chem.* 277:28714.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Regulation of Cbl Molecular Interactions by the Co-receptor Molecule CD43 in Human T Cells*

Received for publication, September 18, 2000
Published, JBC Papers in Press, October 6, 2000, DOI 10.1074/jbc.M008494200

Gustavo Pedraza-Alva†, Sansana Sawasdikosol‡, Yun Cai Liu¶, Lily Beatriz Mérida‡, Mario Ernesto Cruz-Muñoz‡, Fabian Ocegüera-Yañez‡, Steven J. Burakoff§, and Yvonne Rosenstein**

From the †Instituto de Biotecnología/Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, MOR 62250, Mexico, the ‡Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts 02115, and the ¶La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, California 92012

CD43, one of the most abundant glycoproteins on the T cell surface, has been implicated in selection and maturation of thymocytes and migration, adhesion, and activation of mature T cells. The adapter molecule Cbl has been shown to be a negative regulator of Ras. Furthermore, it may also regulate intracellular signaling through the formation of several multi-molecular complexes. Here we investigated the role of Cbl in the CD43-mediated signaling pathway in human T cells. Unlike T cell receptor signaling, the interaction of the adapter protein Cbl with Vav and phosphatidylinositol 3-kinase, resulting from CD43-specific signals, is independent of Cbl tyrosine phosphorylation, suggesting an alternative mechanism of interaction. CD43 signals induced a Cbl serine phosphorylation-dependent interaction with the γ -isoform of 14-3-3 protein. Protein kinase C-mediated Cbl serine phosphorylation was required for this interaction, because the PKC inhibitor RO-31-8220 prevented it, as well as 14-3-3 dimerization. Moreover, mutation of Cbl serine residues 619, 623, 639, and 642 abolished the interaction between Cbl and 14-3-3. Overexpression of Cbl in Jurkat cells inhibited the CD43-dependent activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and AP-1 transcriptional activity, confirming nevertheless a negative role for Cbl in T cell signaling. However, under normal conditions, PKC activation resulting from CD43 engagement was required to activate the MAPK pathway, suggesting that phosphorylation of Cbl on serine residues by PKC and its association with 14-3-3 molecules may play a role in preventing the Cbl inhibitory effect on the Ras-MAPK pathway. These data suggest that by inducing its phosphorylation on serine residues, CD43-mediated signals may regulate the molecular associations and functions of the Cbl adapter protein.

T cell stimulation through the TcR¹ and/or co-receptor mol-

ecules leads to the activation of several protein-tyrosine kinases (1), thus inducing a cascade of tyrosine phosphorylation events. Phosphorylation of tyrosine residues provides docking sites for adapter molecules that recognize phosphorylated residues through Src homology 2 (SH2) domains or phosphotyrosine-binding (PTB) domains (2). Adapter molecules have emerged as critical components of cellular signaling (3, 4). The formation of tyrosine phosphorylation-dependent multi-protein complexes involving adapter and effector proteins has been shown to be essential for signal transduction. Disruption of these complexes by mutating specific phosphotyrosine residues of either the adapter or the effector proteins leads to the inhibition of cellular responses (5-7). On the contrary, hyperphosphorylation of adapter molecules such as Shc resulted in enhanced cellular response (8).

Cbl, the oncogene product of the Casitas B-lineage lymphoma has been implicated in several signal transduction pathways. Cbl is transiently phosphorylated on tyrosine residues after activation of several receptors and co-receptors by their cognate ligands, including: TcR, B cell receptor, Fc γ receptor, Fc ϵ R1, colony-stimulating factor-1 receptor, interleukin-3 receptor, CD38, CD28, interferon γ receptor, epidermal growth factor receptor, platelet-derived growth factor receptor, nerve growth factor receptor, and integrin receptors, among others (reviewed in Ref. 9). Cbl tyrosine phosphorylation is directly mediated by ZAP-70 and Syk kinases, although it is not yet clear whether it may also be a direct target for the Src family kinases, Fyn and Lck (10, 11). Cbl tyrosine phosphorylation induces its association with several signaling molecules including tyrosine kinases such as ZAP-70 and Fyn (12, 13); the lipid kinase PI3K (14-16); the guanine exchange factor (GEF) Vav (17); and the adapter molecule Crk (18-21). Through its proline-rich regions, Cbl may interact with the SH3 domain of kinases from the Src family Fyn (22) or Lyn (23) and with the adapter molecules Grb2 (24, 25) and Nck (26). Cbl phosphorylation on serine residues favors its association with proteins of the 14-3-3 family (27). This complex array of interactions suggests a central role for Cbl in cellular signaling. Recent data point to a negative role for Cbl in cellular signaling. Genetic evidences from the nematode *Caenorhabditis elegans* suggested that the Cbl homologue Sli-1 is a negative regulator of the Ras-dependent epidermal growth factor signal transduction pathway (28). In Jurkat cells, overexpression of Cbl inhibited the Ras-dependent activation of the MAPK path-

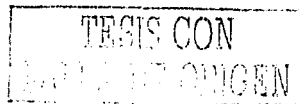
* This work was supported by Grant IN217498 from Dirección General de Apoyo al Personal Académico/Universidad Nacional Autónoma de México and Grant 25307-M from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Present address: Kyoto University Faculty of Medicine, Sakyo-ku, Kyoto 606-8315, Japan.

** To whom correspondence should be addressed: Instituto de Biotecnología/UNAM, APDO Postal 510-3, Cuernavaca, MOR 62250, Mexico. Tel.: 52-73-291606; Fax: 52-73-172385; E-mail: yvonne@ibt.unam.mx.

¹ The abbreviations used are: TcR, T cell receptor; SH2, Src homology domain 2; Ab, antibody; mAb, monoclonal antibody; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase;

PTB, phosphotyrosine-binding domain; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; GEF, guanine exchange factor; GST, glutathione S-transferase; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PTPase, protein-tyrosine phosphatase; TPA, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; PLC, phospholipase C; PKC, protein kinase C.



way and AP-1 transcriptional activity (29). Recent data obtained from the *c-Cbl*^{-/-} mouse clearly showed that the absence of Cbl leads to enhanced T cell signaling upon CD3 ligation, involving ZAP-70 kinase activity (30). However, a positive role for Cbl in integrin-mediated cell adhesion has also been described (31). Thus, Cbl seems to be a complex adapter molecule that, depending on the signal, may function both as positive and negative regulator.

The T cell surface glycoprotein CD43, is a transmembrane glycoprotein. Two isoforms of CD43 (115 and 130 kDa) are generated by post-translational modifications of the glycosylation pattern. The 115-kDa form of CD43 is expressed on all T cells, whereas the 130-kDa is more abundant on resting CD8⁺ cells and is up-regulated on both CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes upon activation (32-34). CD43 functions are not well defined. CD43 has been shown to play a positive role in cellular adhesion mediated by integrins (35, 36) and in T cell homing (37). On the contrary, based on the negative charge of the sialic acid residues of CD43, it has been suggested that it participates in anti-adhesive processes (38, 39). Also during thymic development, CD43 may play a role in the positive selection of immature cortical thymocytes, through its interaction with galactin-1 on thymic epithelial cells (40-42). A role for CD43 in negative selection has also been proposed, probably through mechanisms involving CD43-ICAM interactions (43). Co-ligation of CD43 with the TcR enhances T cell proliferation above levels observed when cross-linking the TcR alone, in normal as well as in CD28^{-/-} mice (44). Furthermore, it was recently shown that CD43 may modulate TcR signaling and immune responses (45). CD43 ligation with different monoclonal antibodies (mAbs) was reported to induce the generation of diacylglycerol and inositol phosphates, Ca²⁺ mobilization, and PKC activation (46). These effects are mediated by the highly conserved cytoplasmic domain of CD43 because deletion of the entire cytoplasmic domain abolished the co-receptor functions of CD43 when expressed in an antigen-specific murine T cell hybridoma (47).

Despite the fact that CD43 participates in different immunological processes, the molecular event involved in CD43 signaling are still poorly understood. We have recently shown that cross-linking CD43 on the cell surface of human T lymphocytes with the anti-CD43 mAb L10 leads to a CD43-Fyn kinase interaction and to Fyn phosphorylation on tyrosine residues. This interaction is mediated by the Fyn SH3 domain and presumably a proline-rich sequence located in the cytoplasmic domain of CD43 (48). Other groups have shown that CD43 can also interact with Lck (49), although no functional data were provided regarding this association. We have also shown that CD43-specific activation of human T lymphocytes induces tyrosine phosphorylation of the adapter protein Shc and of the GEF Vav, leading to the formation of a macromolecular complex that comprises Shc, Grb2, and Vav. CD43 ligation results also in the formation of Vav-SLP-76 complexes and the activation of the MAPK pathway (50). Recent data suggest that the interleukin-2 gene expression mediated by CD43 signaling is Ca²⁺- and PKC-dependent and that it involves activation of the transcription factors AP-1, NFAT, and NFkB.

In the present report we show that cross-linking CD43 on human peripheral T lymphocytes induced the association of Cbl with the GEF Vav, the lipid kinase PI3K, and the α -isoform of the 14-3-3 family of proteins; interestingly, these interactions did not require Cbl-tyrosine phosphorylation. The induction of 14-3-3 dimerization, the 14-3-3-Cbl interactions, and

MAPK activation mediated by CD43 ligation were found to be PKC-dependent. Furthermore, we show that the CD43-induced 14-3-3-Cbl interactions required serine phosphorylation of Cbl. Nevertheless, overexpression of Cbl in Jurkat cells inhibited the CD43-dependent ERK kinase and AP-1 transcriptional activity, suggesting a negative role for Cbl in CD43-dependent early signaling events. Altogether, these data clearly show that CD43 signaling induces Cbl-serine phosphorylation rather than Cbl-tyrosine phosphorylation and that Cbl serine phosphorylation may contribute to regulate the molecular associations and functions of this adapter molecule.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents—L10, an IgG1 mAb that recognizes CD43, was either purified from ascites on protein A-Sepharose columns or used as ascites (1:500). Rabbit anti-mouse IgG antiserum was generated by repeated immunizations with purified mouse IgG, and anti-mouse IgG immunoglobulins were affinity purified. 3D6, an IgG1 mAb that recognizes the VP7 protein from human rotavirus (51), was used as a negative control in all experiments and was the kind gift from Dr. Luis Padilla-Noriega (Instituto de Investigaciones Biológicas/Universidad Nacional Autónoma de México). The anti-Vav, anti-14-3-3, and anti-Cbl antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The anti-phosphotyrosine 4G10 mAb has been described elsewhere (52). The anti-GST antibody was generated by rabbit immunization with purified GST protein. Protein A-Sepharose was from Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA) and Ficoll-Hypaque was from Sigma. The plasmid containing the AP-1 element linked to the thymidine kinase promoter and the luciferase reporter gene was the kind gift of Dr. M. Kincaid from the University of Vermont.

Cell Culture—Jurkat cells were cultured in RPMI 1640 (Hyclone, Logan, UT) supplemented with 5% fetal calf serum (Hyclone) and 5% bovine iron-supplemented calf serum (Hyclone), 2 mM L-glutamine (Sigma), 50 units/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, and 50 μ M β -mercaptoethanol. Peripheral blood T cells were isolated from healthy adult donors by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. The buffy coat was washed three times with phosphate-buffered saline and resuspended in supplemented RPMI. Adherent cells were removed by plating the cells onto 100-mm Petri dishes (4×10^7 cells/plate) for at least 2 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Nonadherent cells were collected and loaded on a nylon column pre-equilibrated with supplemented RPMI, incubated for 45 min at 37 °C, and eluted with supplemented RPMI. The resultant purified cells were predominantly OKT3⁺ (>80%) and L10⁺ (>95%), as determined by fluorescence-activated cell sorter analysis.

T Cell Activation and Binding of Cellular Protein to GST-14-3-3 Fusion Proteins—Purified T cells (2×10^7) or Jurkat cells (2×10^7) were incubated in 0.5 ml of cold RPMI for 15 min at 4 °C with the following antibodies: L10 (1:500 dilution of ascites) or 1 μ g/ml of purified IgG, 3D6, or OKT3 at 1 μ g/ml. Cross-linking was achieved by further incubating the cells with rabbit anti-mouse IgG1 (1 μ g/ml) for 15 min at 4 °C, following which cells were activated by incubation at 37 °C for the indicated times. Alternatively, when indicated, cells were stimulated with 4 μ g/ml of L10 anti-CD43 or 4 μ g/ml of OKT3 anti-CD3 mAbs, and cross-linking was achieved using 10 μ g/ml of rabbit anti-mouse IgG at 37 °C for different time periods. After activation, cells were lysed in 100 μ l of lysis buffer (25 mM HEPES, pH 7.7, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5 mM dithiothreitol, 20 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₂VO₄, 5 mM NaF, 4 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin) for 30 min at 4 °C. Lysates were spun at 14,000 \times g for 15 min at 4 °C, and supernatant volume was adjusted to 300 μ l with fresh lysis buffer and incubated with approximately 10 μ g of fusion protein noncovalently coupled to glutathione-Sepharose beads for 2 h at 4 °C. Beads were washed four times with cold lysis buffer, and bound proteins were resolved by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting.

Immunoblotting—Proteins were transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA). Membranes were blocked with 5% nonfat milk in Tris-buffer saline (TBS; 10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl), followed by incubation with the indicated antibody diluted in TBS with 0.05% Tween 20 (TBS-T; Bio-Rad). After three washes with TBS-T, the membranes were incubated with the appropriate second antibody coupled to horseradish peroxidase (Biomedica Corp, Foster City, CA), and proteins were visualized by ECL (Amersham Pharmacia Biotech), following the manufacturer's instructions.

Immunoprecipitation—Protein A precleared lysates from activated

² Santana, M. A., Pedraza-Alva, G., Oliveras-Zavaleta, N., Madrid-Marina, V., Horejsi, V., Burakoff, S. J., and Rosenstein, Y. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 31460-31468.

or nonactivated T cells (2×10^7 cellular equivalents) were immunoprecipitated with the indicated antibody ($1 \mu\text{g/ml}$) for 2 h at 4°C . Immune complexes were harvested with protein A-Sepharose for 1 h on ice and washed once with cold TNE-T (150 mM NaCl , 50 mM Tris , $\text{pH } 7.5$, 5 mM EDTA , 1% Triton X-100 (w/v)), twice with TNE (150 mM NaCl , 50 mM Tris , $\text{pH } 7.5$, 5 mM EDTA), and once with H_2O . When indicated, Cbl precipitates were treated for 30 min at 37°C with 5 units of alkaline phosphatase or 25 units of protein-tyrosine phosphatase (PTPase from Yersinia) in $50 \mu\text{l}$ of the buffer suggested by the manufacturer (Roche Molecular Biochemicals). To inhibit alkaline phosphatase, $10 \text{ mM } \beta\text{-glycerophosphate}$ was added to the reaction mix, and $100 \mu\text{M}$ of Na_2VO_4 was used to inhibit PTPase. Immunoprecipitated proteins were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted as described above.

Lipid Kinase Assay—PI3K assay was performed basically as described previously (53), with the following modifications. Cbl precipitates were washed twice with 100 mM Tris , $\text{pH } 6.8$, containing 500 mM LiCl and two final washes with 10 mM Tris , $\text{pH } 7.5$, containing 100 mM NaCl and 1 mM EDTA . $10 \mu\text{g}$ of phosphatidylinositol were added to each immunoprecipitate and equilibrated for 5 min at 30°C and then $40 \mu\text{l}$ of kinase buffer were added (100 mM HEPES , $\text{pH } 7.5$, 5 mM MgCl_2 , $10 \mu\text{Ci}$ of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, and $10 \mu\text{M ATP}$). After incubating at 30°C for 10 min, reactions were stopped by adding $400 \mu\text{l}$ of 1 N HCl and $400 \mu\text{l}$ of chloroform/methanol (1:1). The aqueous phase was discarded, and lipids were extracted with 1 N HCl /methanol (1:1). Phospholipids were separated by thin layer chromatography using 1-propanol/2 x acetic acid (65:35) as solvent and detected by autoradiography.

Transfection and Luciferase Assays—Transient transfection of Jurkat cells was performed by electroporation as described previously (54). Briefly, 10^7 cells were washed twice with phosphate-buffered saline, resuspended in $400 \mu\text{l}$ of RPMI and mixed with an equal volume of RPMI containing $10 \mu\text{g}$ of DNA and $40 \mu\text{g}$ of DEAE-dextran prior to electroporation at 270 V , $950 \mu\text{F}$ in a Bio-Rad gene pulser. After electroporation, cells were allowed to stand for 10 min at room temperature. Cells transfected with the same plasmid were pooled and cultured for 48 h in complete RPMI. Finally, cells were stimulated for the indicated time under different experimental conditions. Luciferase activity was determined as described previously (55).

RESULTS

Cbl Associates with Vav and the p85 Subunit of the PI3K upon CD43-specific T Cell Activation—We have previously shown that cross-linking CD43 on the cell surface of human peripheral T cells induces the formation of a macromolecular complex containing Grb2 and tyrosine-phosphorylated Shc and Vav. Because we identified Vav as the p85 tyrosine phosphorylated protein, we found that Vav precipitates contained the adapter molecule Cbl. Fig. 1A shows that in resting human peripheral T cells, Cbl and Vav can associate. Cbl precipitates from cells treated with an isotype control mAb (3D6) contained Vav (lanes 6 and 8, lower panel). This association was clearly enhanced by CD43 cross-linking with the L10 mAb and activation at 37°C for 1 or 5 min (lanes 2 and 4). Similarly, Vav immunoprecipitates from 3D6-treated cells contained basal levels of associated Cbl (lanes 5 and 7, upper panel), and the amount of Cbl found in Vav immunoprecipitates increased with time when cells were stimulated with the anti-CD43 mAb L10 (lanes 1 and 3, upper panel). Equivalent amounts of Cbl (lanes 2, 4, 6, and 8, upper panel) or Vav (lanes 1, 3, 5, and 7, upper panel) were precipitated from T cells lysates, independently of the treatment.

Because we had previously shown that CD43 ligation induced Vav tyrosine phosphorylation (50), we asked whether the Vav molecules associated with Cbl were tyrosine phosphorylated. Fig. 1B shows that Cbl immune complexes isolated from isotype control antibody-treated cells contained low levels of tyrosine phosphorylated Vav (lanes 3 and 4). On the other hand, following CD43 engagement, the amount of tyrosine phosphorylated Vav associated with Cbl increased (lanes 1 and 2). Identification of Vav in Cbl precipitates was performed using anti-Vav polyclonal antibodies (data not shown). Thus, these data show that Vav molecules associated with Cbl in resting or activated T lymphocytes are tyrosine phosphorylated

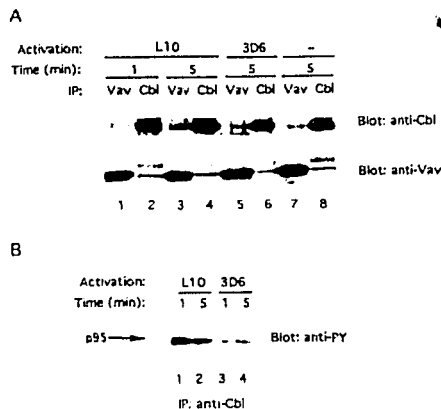


Fig. 1. CD43 cross-linking induces Vav-Cbl interactions in human T cells. A. 2×10^7 T cells were stimulated at 37°C for different periods of time with anti-CD43 mAb L10 (lanes 1–4) or the isotype control mAb 3D6 (lanes 5 and 6) or left untreated (lanes 7 and 8). Precleared cell lysates were immunoprecipitated with anti-Vav (lanes 1, 3, 5, and 7) or anti-Cbl polyclonal Abs (lanes 2, 4, 6, and 8). Precipitated proteins were separated by SDS-PAGE and blotted with the indicated antibodies. B. Cbl was precipitated from precleared T cell lysates of anti-CD43 mAb-stimulated cells (lanes 1 and 2) or isotype control mAb-treated cells (lanes 3 and 4); precipitated proteins were separated by SDS-PAGE and blotted with anti-phosphotyrosine 4G10 mAb. The position of Vav is indicated. IP, immunoprecipitation.

and that CD43-mediated signals induce the association of tyrosine phosphorylated Vav to Cbl.

Cbl has also been shown to interact with the p85 subunit of the PI3K, upon T and B cell activation through the TcR or the BcR (16, 56). A similar interaction has been described to be induced in macrophages by colony-stimulating factor stimulation (14, 57). We tested whether CD43-specific activation of human T lymphocytes induced Cbl-p85 interactions. As shown in Fig. 2A, p85 immunoprecipitates from L10-treated cells contained Cbl. This association was time-dependent, with maximum levels of association observed at 1 and 5 min after activation (lanes 1 and 2) and decreasing after 10 min (lane 3). Only very low levels of Cbl were found in p85 precipitates from control antibody-treated cells (lane 4). To further characterize this interaction, we tested whether the PI3K associated with Cbl upon CD43 cross-linking was active. Cbl immunoprecipitates from CD43-stimulated or control-treated peripheral human T cells were subjected to a PI3K assay. Fig. 2B shows that the PI3K associated with Cbl in response to CD43-mediated signals was active in a time-dependent manner, with maximum activation levels reached after 1 min of activation and decreasing thereafter (Fig. 2B, lanes 1–3). Basal levels of the PI3K activity associated with Cbl remained constant in control isotype mAb-treated lymphocytes (Fig. 2B, lanes 4–6). The CD43-induced PI3K activity associated with Cbl was approximately four times lower than that resulting from TPA stimulation of the same cells (data not shown). These data clearly indicate that T cell activation through the CD43 molecule induces Cbl interaction with activated PI3K, suggesting a role for both Cbl and PI3K in the CD43 signal pathway.

Cbl-Vav Interaction Induced by CD43 Occurs Independently of Cbl Tyrosine Phosphorylation—Association of Cbl with Vav and p85 in response to TcR signaling is mediated by Vav and p85 SH2 domains and tyrosine phosphorylation of Cbl on residues Tyr⁵⁰⁰ (17) and Tyr⁷³¹ (58), respectively. Therefore, we

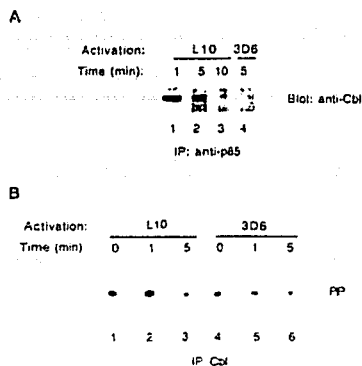


Fig. 2. Active p85 associates to Cbl upon T cell activation through CD43. *A*, 2×10^7 human peripheral T cells were stimulated at 37 °C for the indicated time periods with anti-CD43 mAb L10 (lanes 1-3) or with the isotype control mAb 3D6 (lane 4). p85 was precipitated from the precleared cell lysates. Proteins were separated by SDS-PAGE and blotted with anti-Cbl antibodies. *B*, human peripheral T cells were stimulated with anti-CD43 mAb L10 (lanes 1-3) or isotype control mAb 3D6 (lanes 4-6) for different periods of time. Cbl was precipitated from precleared cell lysates and subjected to PI3K assay. The position of phosphatidylinositol phosphate (PIP) is indicated. *IP*, immunoprecipitation.

investigated whether signaling through CD43 in normal T cells induced Cbl tyrosine phosphorylation. Cell lysates from T lymphocytes activated with the L10 mAb, OKT3 mAb, or the control mAb 3D6 were immunoprecipitated with anti-Cbl, and the presence of tyrosine-phosphorylated Cbl was assessed by immunoblotting with the anti-phosphotyrosine antibody 4G10. As shown in Fig. 3A, only basal levels of tyrosine phosphorylated Cbl could be detected after CD43 cross-linking for different time periods (lanes 2-5, upper panel). As expected, T cell stimulation through the TeR clearly induced Cbl tyrosine phosphorylation (lanes 6-9, upper panel). When cells were treated with the control antibody (data not shown) or left unstimulated, only basal levels of tyrosine phosphorylated Cbl were observed (lane 1). Reprobing the same membranes with anti-Cbl antibodies showed that similar amounts of Cbl were precipitated in all cases (Fig. 3A, lower panel). Similarly, the Cbl molecules that co-precipitated with Vav or p85 following CD43 ligation were not tyrosine phosphorylated (data not shown).

To determine whether phosphorylation on residues other than tyrosines was involved in the CD43-induced Cbl-Vav interaction, we immunoprecipitated Cbl from CD43- or TeR-activated T lymphocytes and treated these immune complexes with alkaline phosphatase or with a tyrosine specific phosphatase (PTPase) from Yersinia. As shown in Fig. 3B, activation of human peripheral T cells with the L10 mAb for 5 min had no effect on Cbl tyrosine phosphorylation as compared with unstimulated T cells (lanes 1 and 2, top panel). However, CD43 signals induced Cbl-Vav interaction (lanes 1 and 2, middle panel). Activation through the CD3 complex induced Cbl tyrosine phosphorylation and Cbl-Vav interaction (compare lanes 1 and 7, top and middle panels, respectively). Treatment of Cbl precipitates with alkaline phosphatase totally dephosphorylated Cbl precipitated from L10-stimulated cells (compare lanes 2 and 3, top panel) or OKT3-stimulated cells (compare lanes 7 and 8, top panel), whereas the addition of the phosphatase inhibitor β -glycerophosphate prevented this effect (lanes 4 and 9, top panel). Cbl dephosphorylation resulted in a partial blockade of the CD43-induced Cbl-Vav interaction that was over-

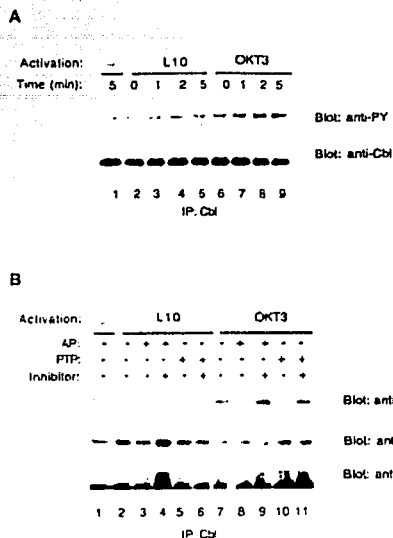
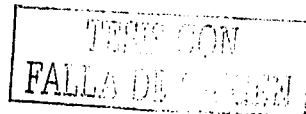


Fig. 3. Activation of human peripheral T cells through CD43 cross-linking does not induce Cbl tyrosine phosphorylation. *A*, 2×10^7 T cells were unstimulated (lane 1) or stimulated at 37 °C for the indicated time periods with the anti-CD43 mAb L10 (lanes 2-5) or OKT3 (lanes 6-9). Cbl was precipitated from precleared cell lysates, and proteins were separated by SDS-PAGE and blotted with anti-phosphotyrosine 4G10 mAb (upper panel) or with anti-Cbl polyclonal Ab (lower panel). *B*, Cbl was precipitated from precleared T cell lysates (2×10^7) of unstimulated (lane 1) or stimulated cells for 5 min with anti-CD43 mAb L10 (lanes 2-6) or with anti-CD3 mAb OKT3 (lanes 7-11). Cbl precipitates were left untreated (lanes 2 and 7) or treated with alkaline phosphatase in the absence (lanes 3 and 8) or the presence of β -glycerophosphate (lanes 4 and 9) or treated with PTPase in the absence (lanes 5 and 10) or presence of NaVO_4 (lanes 6 and 11). Proteins were separated by SDS-PAGE and blotted with anti-phosphotyrosine 4G10 mAb (top panel), anti-Vav polyclonal Ab (middle panel), or anti-Cbl polyclonal Ab (bottom panel). *IP*, immunoprecipitation.

come by the addition of phosphatase inhibitors (compare lanes 3 and 4, middle panel). Alkaline phosphatase treatment had a minor effect on TeR-induced Cbl-Vav interactions as compared with the precipitates containing phosphatase inhibitors (lanes 8 and 9, middle panel). PTPase treatment of Cbl precipitates from CD43- or TeR-stimulated cells resulted also in complete Cbl dephosphorylation (lanes 5 and 10, top panel), whereas dephosphorylation was prevented by the addition of the PTPase inhibitor NaVO_4 (lanes 6 and 11, top panel). Equivalent levels of Cbl-Vav interactions were found in Cbl precipitates from L10-stimulated T cells after PTPase treatment in the absence or presence of NaVO_4 (lanes 5 and 6, middle panel); the same was true for Cbl precipitated from OKT3 stimulated cells (lanes 10 and 11). Blotting the same membrane with anti-Cbl antibodies shows that equivalent amounts of Cbl were precipitated (Fig. 3B, bottom panel). These results suggest that the CD43-mediated Cbl-Vav interactions are independent of Cbl tyrosine phosphorylation. The Cbl-PTB domain does not bind tyrosine-phosphorylated Vav after CD43 engagement (data not shown), ruling out the possibility that this Cbl-Vav interaction could be mediated by Cbl-PTB domain and Vav tyrosine residues. Altogether, these data suggest that Cbl-Vav interactions may be partially mediated by phosphorylation on serine or threonine residues.



CD43 Signaling Leads to Cbl and Raf Serine Phosphorylation and to Their Interaction with the 14-3-3 Molecule—Data presented above and the multiplicity of different domains present in Cbl suggest that domains other than the PTB domain or post-translational modifications of Cbl rather than phosphorylation of Tyr⁷⁰⁰, could participate in the Cbl-Vav interactions induced by CD43. Recently, it was reported that T cell treatment with TPA resulted in the association of Cbl with the isoform γ of the 14-3-3 family of proteins and that this association was dependent on the PKC-mediated Cbl-serine phosphorylation (27). Because previous reports suggest a role for PKC in the CD43 signaling pathway (46), we tested whether activation of T cells through CD43 could induce Cbl-14-3-3 interactions, as indicative of Cbl serine phosphorylation in response to CD43 activation. As shown in Fig. 4A (upper panel), cross-linking CD43 in human peripheral T cells with the L10 mAb induced the association of Cbl to a GST- γ -14-3-3 fusion protein in a time-dependent manner. Maximum association was found after 10 min of activation (lanes 1–5). TcR or TPA stimulation also induced 14-3-3-Cbl association (lanes 6 and 7); no association was found in control cells (lane 8), even though equivalent amounts of fusion protein were used in all cases, as determined by anti-GST immunoblotting (Fig. 4A, lower panel).

Raf is a direct effector of Ras and is the first kinase activated in the MAPK pathway; furthermore, it is constitutively associated with a dimer of 14-3-3. Even though the role for this association has been controversial, it was recently demonstrated that 14-3-3 interacts as a dimer with Raf phosphoserines 259 and 621. Upon cell activation, new sites on Raf become phosphorylated, probably by PKC, inducing the association of 14-3-3 to these new sites, thus stabilizing the active state of Raf, in the absence of GTP-bound Ras (59). As expected, we found that the association of Raf to the GST-14-3-3 fusion protein was constitutive (Fig. 4B, lane 8). Moreover, a shift in Raf mobility was observed in Jurkat cells in response to CD43 (lane 2), TcR (lane 4), or TPA-mediated signals (lane 6), as compared with control-treated cells (lane 8). This shift is indicative of Raf activation (60).

On the contrary, Cbl-14-3-3 association was clearly activation-dependent (Fig. 4B, lanes 2, 4, and 6) because no association was observed in control-treated cells (lane 8). Neither Cbl nor Raf were found in GST precipitates (lanes 1, 3, 5, and 7). These data suggested that CD43-mediated PKC activation induces serine phosphorylation of both Cbl and Raf. To test this possibility we pretreated Jurkat cells with RO-31-8220 or staurosporine (two PKC inhibitors) prior to cell activation. RO-31-8220 pretreatment diminished CD43-mediated Cbl-14-3-3 and active Raf-14-3-3 interactions (Fig. 4C, compare lanes 1 and 2, upper panel) and had no effect on the basal Raf-14-3-3 association (Fig. 4C, lanes 3 and 4, upper panel). Blotting the same membranes with anti-14-3-3 antibodies showed that CD43 signaling may also induce 14-3-3 dimerization (Fig. 4C, compare lanes 1 and 3, lower panel), because endogenous 30-kDa 14-3-3 molecules were detected in the precipitates. 14-3-3 dimerization was also PKC-dependent because RO-31-8220 pretreatment decreased this interaction (compare lanes 1 and 2, lower panel). Similar results were obtained with staurosporine (data not shown). These data clearly show that CD43 signaling leads to PKC activation and serine phosphorylation of Cbl and Raf.

To further prove that CD43 signals lead to Cbl serine phosphorylation and 14-3-3 association, Jurkat cells were transfected with plasmids containing the human IgG1-Fc fragment fused in frame with the wild type or mutated Cbl-serine-rich region required for the interaction with 14-3-3 (27), and their ability to interact with GST-14-3-3 *in vitro*, after CD43 engagement, was monitored. Fig. 5 shows that GST-14-3-3 was able to

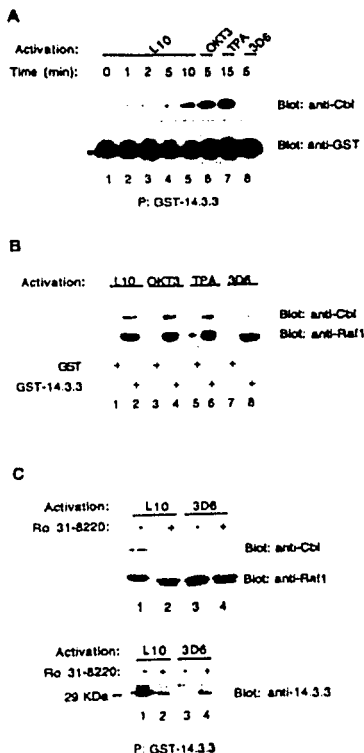


Fig. 4. CD43 cross-linking induces Cbl-14-3-3 interaction in a PKC-dependent manner. A, 2×10^7 human peripheral T cells were stimulated at 37 °C for the indicated periods of time with anti-CD43 mAb L10 (lanes 1–5), anti-CD3 mAb OKT3 (lane 6), 50 ng/ml TPA (lane 7), or isotype control mAb 3D6 (lane 8). Cells lysates were incubated with Sepharose 4B-GST-14-3-3 fusion protein for 2 h at 4 °C. Bound proteins were separated by SDS-PAGE and blotted with anti-Cbl or anti-GST polyclonal Abs. B, 2×10^7 Jurkat cells were stimulated as described above for 5 min with anti-CD43 mAb L10 (lanes 1 and 2), anti-CD3 mAb OKT3 (lanes 3 and 4), or isotype control mAb 3D6 (lanes 5 and 6) or for 15 min with 50 ng/ml TPA (lanes 7 and 8). Total cell extracts were incubated with Sepharose 4B-GST (lanes 1, 3, 5, and 7) or with Sepharose 4B-GST-14-3-3 fusion protein (lanes 2, 4, 6, and 8) for 2 h at 4 °C. Bound proteins were separated by SDS-PAGE and blotted with anti-Cbl or anti-Raf polyclonal Abs. C, 2×10^7 Jurkat cells were incubated for 30 min in the absence or in the presence of 10 μ M RO-31-8220 prior to activation with anti-CD43 mAb L10 (lanes 1 and 2) or isotype control mAb 3D6 (lanes 3 and 4) for 5 min. Total cell extracts were incubated with Sepharose 4B-GST-14-3-3 fusion protein for 2 h at 4 °C. Bound proteins were separated by SDS-PAGE and blotted with anti-Cbl or anti-Raf (upper panel) or anti-14-3-3 (lower panel) polyclonal Abs.

precipitate the wild type Cbl fragment (amino acids 615–644 (S4)), whereas mutation of the serine residues 619, 623, 639, and 642 for alanine residues (A4) prevented this interaction (compare lanes 1 and 2 with lanes 3 and 4, upper panel). Consistent with the data presented above, the 14-3-3-Cbl interaction was enhanced following CD43 ligation with the L10 mAb (lanes 1 and 2, upper panel). Blotting the same membrane with anti-GST antibodies shows that equivalent amounts of GST-14-3-3 fusion protein were used for precipitation (lanes

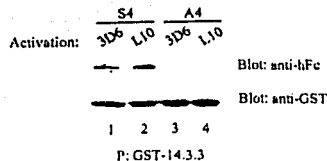


Fig. 5. Cbl serine residues S619, S623, S639 and S642 are required for the CD43-induced Cbl-14-3-3 interaction. Jurkat cells were electroporated with 10 μ g of the vector S4 encoding for the wild type c-Cbl 14-3-3 binding site, fused to the human IgG Fc (lanes 1 and 2) or with 10 μ g of the vector A4 encoding for the mutated c-Cbl 14-3-3 binding site (lanes 3 and 4). After 36 h, cells were treated for 10 min with isotype control mAb 3D6 (lanes 1 and 3) or anti-CD43 mAb L10 (lanes 2 and 4). Total cell extracts were incubated with Sepharose 4B-GST-14-3-3 fusion protein for 2 h at 4°C. Bound proteins were separated by SDS-PAGE and blotted with anti-hFc or anti-GST polyclonal Abs.

1-4, lower panel). Thus, these results demonstrate that in human T cells, CD43 signaling leads to Cbl serine phosphorylation and that through this mechanism, CD43 induces the interaction between Cbl and 14-3-3.

Cbl Overexpression Negatively Regulates CD43 Signaling Pathway—Recently it became clear that in T cells, Cbl may function as a negative regulator of the MAPK-dependent TeR signal transduction pathway (29, 30). It is not yet clear, however, whether tyrosine or serine phosphorylation of Cbl play a role in regulating Cbl negative effect on T cell activation. Contrary to TeR signaling, we have shown here that T cell activation through CD43 engagement has no effect on Cbl tyrosine phosphorylation levels. Moreover, CD43 signaling induced the phosphorylation of Cbl on serine residues and its interaction with 14-3-3. Because we had previously shown that CD43 cross-linking induced MAPK pathway activation (50), we tested the effect of Cbl overexpression on the CD43-dependent activation of the MAPK pathway in Jurkat cells. Fig. 6A (upper panel) shows that CD43 (lane 2) and TeR (lane 3) cross-linking, as well as TPA treatment (lane 4) of cells transfected with the empty vector (lanes 1-4), resulted in a different pattern of ERK activation as determined by blotting with anti-p-ERK antibodies, when compared with untreated cells (lane 1). Independent of the stimulus (lanes 6-8), overexpression of Cbl drastically diminished ERK activation. The same membrane was blotted with anti-ERK antibody to show that equivalent amounts of protein were loaded in each lane (Fig. 6A, lower panel). To determine whether Cbl had also a negative effect downstream of the MAPK pathway, at the transcriptional level, Jurkat cells were co-transfected with a plasmid containing four AP-1-binding sites upstream the thymidine kinase promoter linked to the luciferase reporter gene and either an empty vector or the vector encoding for Cbl. As shown in Fig. 6B, in cells transfected with the empty vector and the reporter plasmid, CD43 as well as CD3 ligation induced AP-1 trans-activational activity (approximately 2-fold over background levels), whereas TPA treatment resulted in a stronger effect (approximately 4-fold). Cbl overexpression prevented the induction of luciferase activity mediated by the different stimuli. Thus, these results suggest that independently of the fact that CD43 signaling induces Cbl-serine phosphorylation and interaction with 14-3-3, Cbl overexpression has a negative role on the CD43-dependent MAPK and AP-1 activation.

PKC Activation through CD43 Signaling Is Necessary to Activate the MAPK Pathway in Human T Lymphocytes—Activation of the Ras-MAPK pathway can be induced by positive signals (reviewed in Ref. 61) or by eliminating the default negative effect of Cbl (30). The strong induction observed after

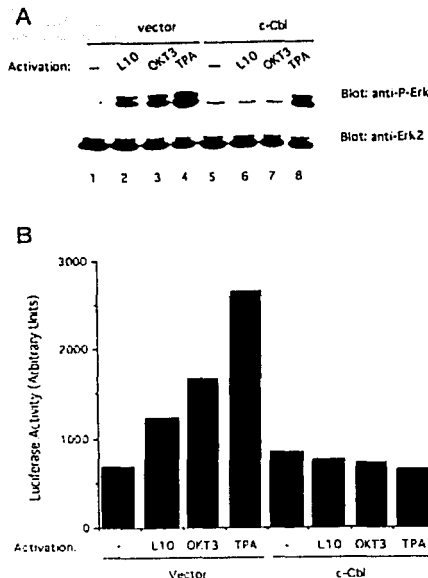


Fig. 6. Cbl plays a negative role on the CD43 signaling pathway. A, Jurkat cells were electroporated with 10 μ g of empty vector (lanes 1-4) or with 10 μ g of the vector coding for Cbl (lanes 5-8). After 36 h, cells were left unstimulated (lanes 1 and 5) or stimulated with anti-CD43 mAb L10 (lanes 2 and 6), anti-CD3 mAb OKT3 (lanes 3 and 7), or 50 ng/ml TPA (lanes 4 and 8) for 15 min. Cell lysates (10 μ g) were separated by SDS-PAGE and blotted with anti-p-ERK monoclonal Ab (upper panel) or anti-ERK polyclonal Ab (lower panel). B, Jurkat cells were electroporated with 5 μ g of empty vector and 5 μ g of the reporter plasmid AP-1-PRL-Luc or with 5 μ g of the vector coding for Cbl and 5 μ g of the reporter plasmid AP-1-PRL-Luc. After 12 h of stimulation as described above, total cell extracts were prepared, and luciferase activity was measured.

TeR engagement results probably from activating both mechanisms. We asked whether the phosphorylation of Cbl on serine residues by PKC activation after CD43 engagement could prevent the negative effect of Cbl on MAPK activation. The rationale for these experiments was that CD43 signaling requires PKC activation to cancel the inhibitory effect of Cbl, thus inducing MAPK activation. Human peripheral T cells were pretreated with the PKC inhibitor RO-31-8220 or with the PLC γ inhibitor U73122 before stimulation through CD43 or TPA and activation of the MAPK pathway was monitored by immunoblotting with anti-active ERK antibodies. Fig. 7 (upper panel) shows that CD43 engagement or TPA treatment resulted in ERK activation when compared with isotype control antibody-treated cells (lanes 1, 2, and 5). The PKC inhibitors RO-31-8220 (lanes 3 and 6) and G6976 (data not shown) partially prevented the CD43-dependent ERK activation and totally blocked ERK activation induced by TPA. Stimulation of PKC activity in response to CD43 ligation depends on the activation of PLC γ (46). As expected, inhibition of PLC γ with the specific inhibitor U73122 blocked MAPK activation in response to CD43 signaling and had no effect on TPA-stimulated cells (compare lanes 4 and 7). Equivalent amounts of ERK were present in all lanes as determined by blotting the same membrane with anti-ERK antibodies (lanes 1-7, lower panel). These results suggest that CD43-dependent MAPK activation re-

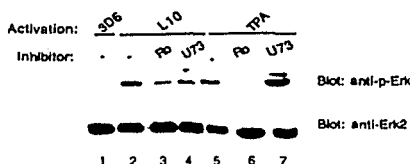


Fig. 7. CD43-dependent MAPK pathway induction requires PKC activation. 2×10^7 human peripheral T cells were incubated for 30 min in the absence or presence of 10 μ M RO-31-8220 or 2 μ M U73122, prior to activation with isotype control mAb 3D6 (lane 1), anti-CD43 mAb L10 (lanes 2-4), or with 50 ng/ml TPA (lanes 5-7) for 10 min. Total cell extracts were separated by SDS-PAGE and blotted with anti-phosphorylated ERK (upper panel) or anti-ERK2 (lower panel) polyclonal Abs.

quires the activation of PKC, which depends on previously activated PLC γ . Together these results suggest that the PKC-dependent Cbl phosphorylation on serine residues and its subsequent association with 14-3-3, resulting of CD43 engagement on the surface of normal human T lymphocytes, probably blocks the default negative effect that Cbl has on MAPK activity, resulting in activation of the MAPK pathway.

DISCUSSION

Following receptor engagement, the formation of tyrosine phosphorylation-dependent multimeric complexes involving adapter and effector proteins has been shown to be essential for signal transduction. Upon cell activation through different stimuli, the adapter protein Cbl becomes phosphorylated on tyrosine residues, favoring its interaction with SH2-containing signaling molecules. In primary murine T cells as well as in Jurkat T cells, TcR activation induces Cbl tyrosine phosphorylation on tyrosine residues 700 and 731, resulting in the interaction with the SH2 domains of Vav and PI3K, respectively (17, 58). Here we show that in human normal peripheral T cells, CD43 engagement induced also the interaction of Cbl with Vav and PI3K. Unlike with TcR signaling, these interactions were independent of Cbl tyrosine phosphorylation because only basal tyrosine phosphorylation levels were detected when cross-linking CD43 for different periods of time. Nonetheless, under the same experimental conditions, the association with Vav and PI3K was enhanced after 5 min of activation. Furthermore, even though PTPase treatment of Cbl precipitates from CD43- or CD3-stimulated T cells resulted in complete Cbl tyrosine dephosphorylation, the interaction with Vav was not affected. Removal of phosphate groups from serine, threonine, and tyrosine residues with alkaline phosphatase resulted in complete Cbl dephosphorylation and in partial blockade of the CD43-induced Cbl-Vav interaction. Interestingly, this treatment had only a minor effect on the formation of the Cbl-Vav complex mediated through the TcR. Transient expression of a mutated form of the Cbl molecule (Y700A) in Jurkat cells did not prevent the formation of this complex,³ further suggesting an alternative mechanism through which Cbl and Vav interact following CD43 engagement. The highly conserved amino-terminal region of Cbl (Cbl-N) binds to phosphorylated tyrosine residues and has a cell transforming activity. Point mutations in Cbl that disrupt its recognition of phosphotyrosines also interfere with its negative regulatory function and, in the case of v-Cbl, with its oncogenic potential (62, 63). Cbl-N is composed of three interacting domains: a four-helix bundle (4H), an EF-hand calcium-binding domain, and a divergent SH2 domain. Mutations in the 4H, EF-hand, and SH2 domains confirm that the three domains together form an integrated phospho-

phoprotein-recognition module (64). The possibility that the Cbl PTB domain could bind tyrosine phosphorylated Vav was eliminated, because neither the Wt PTB nor the G306E mutant PTB domain were able to bind Vav after CD43 engagement (data not shown). This was particularly important, because we had previously shown that CD43 signaling leads to Vav tyrosine phosphorylation (50). Altogether these data suggest that the interaction between Cbl and Vav induced by CD43 signaling is independent of Cbl tyrosine phosphorylation and that phosphorylation on residues other than tyrosine may be involved in this interaction. Therefore, CD43 and the TcR induce Cbl-Vav interactions by two independent mechanisms.

The dephosphorylation experiments bring evidence that phosphorylation of Tyr⁷⁰⁰ of Cbl is not the only mechanism by which Cbl and Vav interact in response to TcR engagement, suggesting that interactions between these two molecules are also mediated by domains that do not recognize phosphoaminoacids, like SH3-proline-rich regions. Using a yeast two-hybrid system, Vav-Cbl-b interactions have been shown to be mediated by the SH3 domain of Vav and the proline-rich region of Cbl-b (65). Furthermore, the proline-rich region of Cbl has been reported to interact with the amino-terminal SH3 domain of Crk-L, leading to lamellopodia and membrane ruffle formation, indicating that Cbl participates in cytoskeleton rearrangements essential for cell adhesion, spreading and migration (31, 66, 67). Vav was also shown to be localized to the lamellopodia and to regulate Rac-dependent lamellopodia formation after $\alpha_5\beta_1$ -integrin activation (68). Although at the moment we do not know whether the Vav molecules associated to Cbl in response to CD43 ligation are active, it is possible that the Cbl-Vav complexes we find participate in the CD43-dependent cytoskeleton reorganization (69, 70).

In the present report we show that CD43 signaling induced Cbl-PI3K interaction and the activation of Cbl-associated PI3K. Engagement of CD43 on different hematopoietic cells induces homotypic cell adhesion, a process described as partially dependent on integrin activation (71-74). In human peripheral T cells, this process is prevented by wortmannin and Ly294002, two specific inhibitors for PI3K.⁴ CD43-dependent signals have been shown to have a regulatory role on integrin-mediated T cell adhesion to endothelial cells and extra-cellular matrix components (36, 75). Cbl-associated PI3K activity induced after CD28 engagement is required for integrin β_1 activation (31). Altogether, these data suggest that multimolecular complexes containing Cbl-Vav and/or PI3K may play a role in the cytoskeleton remodeling required for cell adhesion and migration induced by the interaction of CD43 on the surface of a T cell with a putative receptor on the surface of endothelial or dendritic cells (37, 76-78).

T cell activation through CD43 ligation with the L10 mAb also promoted the interaction of the γ isoform of the 14-3-3 family of proteins with the Cbl and Raf molecules. Phosphorylation of c-Cbl serine residues Ser⁶¹⁹, Ser⁶²³, Ser⁶³⁹, and Ser⁶⁴² through a PKC-dependent mechanism was found to be responsible for this association (27). Mutation of those residues prevented this interaction in response to CD43 cross-linking. Consistent with this, 14-3-3-Cbl as well as 14-3-3-active Raf complex formation resulting from CD43 ligation, were diminished by pretreatment of the cells with the PKC inhibitors RO 31-8220 or staurosporine, suggesting that a CD43-dependent PKC activation (46), leading to Cbl and Raf phosphorylation, was responsible for these interactions.

We described previously the activation of the MAPK pathway resulting from CD43 ligation (50) that is consistent with a

³ G. Pedraza-Alva, unpublished data.

⁴ E. Layseca, unpublished data.

shift in SDS-PAGE mobility of 14-3-3-associated Raf described by others (60). Furthermore, activation of Raf depends on 14-3-3 dimerization (59), a phenomenon we found in response to CD43 cross-linking. The fact that RO 31-8220 and staurosporine prevented the shift in mobility characteristic of active Raf suggests that, in response to CD43 engagement, PKC is phosphorylating 14-3-3 and inducing its dimerization. Different 14-3-3 isoforms have been shown to be phosphorylated by PKC on Ser⁶⁴ (79, 80), by a sphingosine-dependent kinase on Ser⁶⁸ (81), and by casein kinase I on Thr²³³ (82). Therefore, phosphorylation of 14-3-3 by different protein kinases may control its own dimerization, regulating the formation of specific complexes and thus signal transduction.

Cumulative genetic and biochemical evidences point at a negative role for the Cbl family members in T cell signal transduction. Overexpression of c-Cbl in Jurkat cells inhibits both the MAPK activation pathway and AP-1 transcriptional activity (29). c-Cbl null mice show enhanced T cell signaling after TcR engagement, and ZAP70 kinase as well as MAPK activation levels were higher in those mice as compared with wild type mice (30, 83). Consistent with these data, overexpression of c-Cbl in Jurkat cells prevented induction of the CD43- and TcR-dependent MAPK pathway as well as of AP-1-mediated transcriptional activity, suggesting that when overexpressed, Cbl may be acting as a negative modulator of CD43 signaling.

During the last year several groups showed that, to negatively modulate cellular signaling, Cbl requires its PTB domain to bind tyrosine kinase receptors (epidermal growth factor and platelet-derived growth factor (63, 84)) and tyrosine kinases (ZAP70 and SYK (64, 85, 86)) as well as the RING finger to bind components of the ubiquitination machinery and target them for degradation by the proteasome degradation or endocytic degradation pathways (87-89). It was recently shown that Cbl overexpression in the Ramos B-lymphoma cell line resulted in a decrease in Syk protein levels and that the Cbl RING finger domain was essential to induce Syk down-modulation (90). One of the earliest events following CD43 engagement in T cells is activation of the ZAP70 kinase⁶ and that of the Ras-dependent MAPK pathway (50). The blockade of CD43-dependent signals we observe upon c-Cbl overexpression may result from reduced ZAP70 protein levels or from the generation of Cbl-CrkL-C3G inhibitory complexes. These in turn may activate the Rap1 GTPase, a molecule shown to have negative effects on T cells signaling (91), probably by counteracting the Ras-dependent activation (92). c-Cbl overexpression may also negatively modulate the Vav GEF activity. Although there is a direct correlation between Vav tyrosine phosphorylation levels and its GEF activity (93, 94), whether Vav associated with Cbl, either through its SH2 domain or the Cbl-tyrosine phosphorylation-independent mechanism described here, has any GEF activity remains to be determined.

From the overexpression experiments it is clear that Cbl has a negative effect on CD43 signaling. However, it is not possible to assess the role of serine-phosphorylated Cbl in T cell activation resulting from CD43 engagement under these experimental conditions. Nonetheless, the fact that PKC and PLC γ inhibitors prevented the activation of the MAPK pathway and the association between Cbl and 14-3-3 after CD43 engagement, strongly suggests that the CD43-induced MAPK activation results from a blockade of the negative effect of Cbl on the MAPK pathway by promoting the interaction of serine phosphorylated Cbl and 14-3-3 molecules. Activation of the Ras-MAPK pathway may result of two events: (i) activation of SOS GEF activity by tyrosine phosphorylation and translocation to the mem-

brane where it binds and activates Ras and (ii) blocking the negative regulation mediated by Cbl. In human peripheral T cells, TcR signaling induces a faster and stronger activation of MAPK activity when compared with CD43 engagement.⁶ The TcR-dependent signals could activate both processes concomitantly. On the contrary, because we have not been able to detect SOS or SOS-1 tyrosine phosphorylation in response to CD43 cross-linking in human T lymphocytes,⁶ MAPK activation following CD43 engagement may result from blocking the Cbl negative effects rather than activating SOS GEF activity.

Serine phosphorylation of Cbl has been shown to prevent phosphorylation of tyrosine residues and the interaction of this molecule with SH2-containing signaling proteins like PI3K and CrkL (95, 96), suggesting a cross-talk between serine/threonine and tyrosine phosphorylation signaling targeted to Cbl. Differential phosphorylation patterns of Cbl may regulate its functions, probably by modifying its capacity to interact with different signaling molecules, thus modulating cellular signaling. Phosphorylation of Cbl serine residues as a result of CD43-specific signals may play a role in modulating Cbl negative effect on T cell signaling. Ongoing work is in progress to elucidate the biological role of Cbl serine phosphorylation and Cbl-14-3-3 interaction induced by CD43 engagement in T cell activation.

Acknowledgments—We thank Dr. Mercedes Rincón for the AP-1-Luc reporter plasmid, Dr. Eduardo Huerta for leukocyte concentrates, and Dr. Leonor Pérez and Angélica Santana for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Chang, and Sahw. (1996) *Curr. Opin. Immunol.* 8, 394-401
- Pawson, T. (1995) *Nature* 373, 573-579
- Pratt, J. C., Kwilongmanglam, R. S., Sawasdikol, S., Chang, J. H., and Burakoff, S. J. (1994) *Immunity* 1, 122-127
- Clements, J. L., Boerth, R. J., and Korozyk, G. A. (1999) *Annu. Rev. Immunol.* 17, 99-108
- Wu, J., Motto, D. G., Korozyk, G. A., and Weiss, A. (1996) *Immunity* 4, 599-602
- Musi, M. A., Motto, D. G., Ross, S. E., Fang, N., and Korozyk, G. A. (1997) *J. Immunol.* 159, 1639-1647
- Ravichandran, K. S., Zhou, M. M., Pratt, J. C., Harlan, J. E., Walk, S. F., Fesik, S. W., and Burakoff, S. J. (1997) *Mol. Cell Biol.* 19, 5540-5549
- Marengere, L. E., Waterhouse, P., Dunstan, G. S., Mitrucker, H. W., Feng, G. S., and Mak, T. W. (1996) *Science* 272, 1170-1173
- Liu, Y. C., and Altman, A. 377-385 (1995) *Cell Signal* 10, 377-385
- Feshchenko, E. A., Langdon, W. Y., and Tsygankov, A. Y. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 8323-8331
- Fournel, M., Davidson, D., Weil, R., and Veillette, A. (1996) *J. Exp. Med.* 183, 301-306
- Lupher, M. L., Jr., Reedquist, K. A., Miyake, S., Langdon, W. Y., and Band, H. (1995) *J. Biol. Chem.* 271, 24963-24968
- Tsygankov, A. Y., Mahajan, S., Finke, J. E., and Bolen, J. B. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 21340-21347
- Kanagasundaram, V., Jaworski, A., and Hamilton, J. A. (1996) *Biochem. J.* 320, 69-77
- Matsuo, T., Hazeki, K., Tsujimoto, N., Inoue, S., Kurosu, H., Konani, K., Haruki, O., Ue, M., and Katada, T. (1996) *FEBS Lett.* 397, 113-116
- Hartley, D., and Corvera, S. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 21939-21943
- Marengere, L. E., Mirsios, C., Kozieradzki, I., Veillette, A., Mak, T. W., and Penzinger, J. M. (1997) *J. Immunol.* 159, 70-76
- Ribon, V., Printers, J. A., Hoffman, N. G., Kay, B. K., and Saitel, A. R. (1998) *Mol. Cell Biol.* 18, 672-679
- Sawasdikol, S., Ravichandran, K. S., Lee, K. K., Chang, J. H., and Burakoff, S. J. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 2893-2896
- Buday, L., Khwaja, A., Sipki, S., Farago, A., and Downward, J. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 6159-6163
- Reedquist, K. A., Fukazawa, T., Panchamoorthy, G., Langdon, W. Y., Shoelson, S. E., Draker, B. J., and Band, H. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 8436-8442
- Reedquist, K. A., Fukazawa, T., Draker, B., Panchamoorthy, G., Shoelson, S. E., and Band, H. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4137-4139
- Tezuka, T., Umehori, H., Fusaki, N., Yagi, T., Takata, M., Kurosaki, T., and Yamamoto, T. (1990) *J. Exp. Med.* 183, 675-680
- Donovan, J. A., Ota, Y., Langdon, W. Y., and Samelson, L. E. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 26369-26374
- Fukazawa, T., Reedquist, K. A., Trub, T., Soltoff, S., Panchamoorthy, G., Draker, B., Cantley, L., Shoelson, S. E., and Band, H. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 19141-19150
- Rivero-Lezcano, O. M., Sameshima, J. H., Marcilla, A., and Robbins, K. C.

⁶ M. Cruz-Muñoz, manuscript in preparation.

⁶ H. Gordillo, G. Pedraza-Alva, and Y. Rosenstein, unpublished data.

- (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 17363-17366
27. Liu, Y. C., Liu, Y., Ely, C., Yoshida, H., Lipkowitz, S., and Altman, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 9879-9885
 28. Jongeward, G. D., Clandinin, T. R., and Sternberg, P. W. (1995) *Genetics* **139**, 1553-1566
 29. Rellahan, B. L., Graham, L. J., Stoica, B., DeBell, K. E., and Bonvini, E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 30806-30811
 30. Murphy, M. A., Schnall, R. G., Venter, D. J., Barnett, L., Bertonecello, L., Thien, C. B., Langdon, W. Y., and Rowell, D. D. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 4872-4882
 31. Zell, T., Warden, C. S., Chan, A. S., Cook, M. E., Dell, C. L., Hunt, S. W., 3rd, and Shimizu, Y. (1998) *Curr. Biol.* **8**, 814-822
 32. Piller, F., Piller, V., Fox, R. I., and Fukuda, M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 15146-15150
 33. Fukuda, M., Carlsson, S. R., Klock, J. C., and Dell, A. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 12796-12806
 34. Ellies, L. G., Jones, A. T., Williams, M. J., and Ziltener, H. J. (1994) *Glycobiology* **4**, 885-890
 35. Stoeckl, J., Magdic, O., Kohl, P., Beck, W. F., Metzler, J. E., and Knapp, W. (1998) *J. Exp. Med.* **184**, 1769-1779
 36. Sanchez-Mateos, P., Campanero, M. R., del Pozo, M. A., and Sanchez-Madrid, F. (1995) *Blood* **86**, 2228-2239
 37. McEvoy, L. M., Sun, H., Freilinger, J. G., and Butcher, E. C. (1997) *J. Exp. Med.* **186**, 1493-1498
 38. Marjunaath, N., Johnson, R. S., Stanton, D. E., Pasquano, R., and Ardman, B. (1993) *J. Immunol.* **151**, 1528-1534
 39. Marjunaath, N., Correa, M., Ardman, M., and Ardman, B. (1995) *Nature* **377**, 535-538
 40. Baum, L. G., Pang, M., Perillo, N. L., Wu, T., Deleage, A., Uittenbogaart, C. H., Fukuda, M., and Sellhammer, J. J. (1995) *J. Exp. Med.* **181**, 877-887
 41. Baronets, S. H., Castronevo, V., Cooper, D. N., Cummings, R. D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K., and et al. (1994) *Cell* **76**, 597-598
 42. Perillo, N. L., Pace, K. E., Sellhammer, J. J., and Baum, L. G. (1995) *Nature* **378**, 736-739
 43. Keshimoto, H., and Sprent, J. (1999) *J. Exp. Med.* **190**, 65-73
 44. Sprent, J., A. Green, J. M., Mosley, R. L., Smith, P. D., Pardo, R. J., Klein, J. R., Bluestone, J. A., and Thompson, C. B. (1995) *J. Exp. Med.* **182**, 139-146
 45. Thurman, E. C., Walker, J., Jayaraman, S., Marjunaath, N., Ardman, B., and Gross, J. M. (1998) *Int. Immunol.* **10**, 691-701
 46. Silverman, L. B., Wong, R. C., Romold-O'Donnell, E., Vertech, D., Sancho, J., Terhorst, C., Rosen, F., Geba, B., and Chantia, T. (1989) *J. Immunol.* **142**, 4194-4200
 47. Park, J. K., Eisenstein, Y. J., Romold-O'Donnell, E., Borer, B. E., Rosen, F. S., and Barakoff, S. J. (1991) *Nature* **350**, 768-769
 48. Pedraza-Alva, G., Merida, L. B., Barakoff, S. J., and Rosenstein, Y. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 27564-27565
 49. Alvarado, M., Klassen, C., Cerny, J., Horvati, V., and Schmidt, R. E. (1995) *Eur. J. Immunol.* **25**, 1051-1055
 50. Pedraza-Alva, G., Merida, L. B., Barakoff, S. J., and Rosenstein, Y. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 14218-14224
 51. Padilla-Norega, L., Werner-Eckert, R., Mackow, E. R., Gorziglia, M., Larralde, G., Taniguchi, K., and Greenberg, H. B. (1993) *J. Clin. Microbiol.* **31**, 622-629
 52. Druker, B. J., Manion, H. J., and Roberts, T. M. (1989) *N. Engl. J. Med.* **321**, 1383-1391
 53. Perez, L., Paasinen, A., Schmiegel, B., Kach, S., Seiften, M., and Ballmer-Hofer, K. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8113-8117
 54. Dunda, A., Schulz, M., Burki, K., Di Libero, G., and Uematsu, Y. (1996) *Eur. J. Immunol.* **26**, 493-500
 55. Pedraza-Alva, G., Zingg, J. M., and Jost, J. P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5978-5985
 56. Meisner, H., Conway, B. R., Harley, D., and Czech, M. P. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3571-3578
 57. Hesson, H., Mognabi, B., Schmid-Antomarchi, H., Fischer, S., and Rossi, B. (1997) *Oncogene* **14**, 2331-2338
 58. Liu, Y. C., Ely, C., Langdon, W. Y., and Altman, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 168-173
 59. Tavion, G., Luo, Z., and Avruch, J. (1998) *Nature* **394**, 68-92
 60. Marais, R., Light, Y., Paterson, H. F., Mason, C. S., and Marshall, C. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4378-4383
 61. Zenner, G., Dirk zur Hausen, J., Burn, P., and Mustelin, T. (1995) *Bioassays* **17**, 967-975
 62. Lupher, M. L., Jr., Rao, N., Eck, M. J., and Band, H. (1999) *Immunol. Today* **20**, 375-382
 63. Lill, N. L., Douillard, P., Awwad, R. A., Ota, S., Lupher, M. L., Jr., Miyake, S., Meissner-Lula, N., Hsu, V. W., and Band, H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 367-377
 64. Meng, W., Sawasdikosol, S., Burakoff, S. J., and Eck, M. J. (1999) *Nature* **398**, 84-90
 65. Bustelo, X. R., Crespo, P., Lopez-Barahona, M., Gutkind, J. S., and Barbacid, A. (1997) *Oncogene* **15**, 2511-2520
 66. Uemura, N., and Griffin, J. D. (1989) *J. Biol. Chem.* **274**, 37525-37532
 67. Scaife, R. M., and Langdon, W. Y. (2000) *J. Cell Sci.* **113**, 215-226
 68. Miranti, C. K., Leng, L., Mascherberg, P., Brugge, J. S., and Shatill, S. J. (1998) *Curr. Biol.* **8**, 1289-1299
 69. Serrador, J. M., Nieto, M., Alonso-Lebrero, J. L., del Pozo, M. A., Calvo, J., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Lozano, F., Gonzalez-Amaro, R., Sanchez-Mateos, P., and Sanchez-Madrid, F. (1998) *Blood* **91**, 4632-4644
 70. Seveau, S., Lopez, S., Lissavre, P., Guichard, J., Cramer, E. M., and Hallowachs-Macarelli, L. (1997) *J. Cell Sci.* **110**, 1465-1475
 71. Axelsson, B., Youseff-Elmund, R., Hammarstrom, S., and Perlmann, P. (1988) *J. Immunol.* **141**, 2912-2917
 72. Rosenkranz, A. R., Magdic, O., Stoeckl, J., Beck, W., Stockinger, H., and Knapp, W. (1993) *Immunology* **80**, 431-438
 73. Pintado, C. O., and Llanes, D. (1995) *Vet. Immunol. Immunopathol.* **47**, 333-340
 74. Corinti, S., Fanales-Belasio, E., Albanesi, C., Cavani, A., Angelisova, P., and Girolomoni, G. (1999) *J. Immunol.* **162**, 6331-6336
 75. Arzay, N., Göttsch, A., Shubayana, H., and Brosmeier, H. E. (1999) *Blood* **93**, 3317-3326
 76. Fanales-Belasio, E., Zambruno, G., Cavani, A., and Girolomoni, G. (1997) *J. Immunol.* **159**, 2203-2211
 77. Fanales-Belasio, E., Zambruno, G., Cavani, A., and Girolomoni, G. (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.* **417**, 207-212
 78. Johnson, G. G., Mikulowska, A., Butcher, E. C., McEvoy, L. M., and Michie, S. A. (1999) *J. Immunol.* **163**, 5678-5685
 79. Tokar, A., Sellers, L. A., Amoss, B., Patel, Y., Harris, A., and Aitken, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* **206**, 453-461
 80. Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madraza, J., and Patel, Y. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 5706-5709
 81. Megdishi, T., Cooper, J., Zhang, L., Fu, H., and Hakomori, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 21834-21845
 82. Dubois, T., Hommel, C., Howell, S., Steinhilber, U., Soneji, Y., Morrice, N., Moching, K., and Aitken, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28882-28888
 83. Thien, C. B., Howlett, D. D., and Langdon, W. Y. (1999) *J. Immunol.* **162**, 7133-7139
 84. Galisteo, M. L., Dikie, I., Batzer, A. G., Langdon, W. Y., and Schlessinger, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 29242-29245
 85. Lupher, M. L., Jr., Songyang, Z., Shelson, S. E., Cantley, L. C., and Band, H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 33140-33144
 86. Yankee, T. M., Keebhara, L. M., Sawasdikosol, S., Harrison, M. L., and Geahlen, R. L. (1999) *J. Immunol.* **163**, 5827-5835
 87. Joazeiro, C. A., Wing, S. S., Huang, H., Leverson, J. D., Hunter, T., and Liu, Y. C. (1999) *Science* **286**, 309-312
 88. Yokouchi, M., Kondo, T., Houghton, A., Bartkiewicz, M., Horne, W. C., Zhang, H., Yoshimura, A., and Barron, R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 31707-31712
 89. Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, L., and Yarden, Y. (1989) *J. Biol. Chem.* **274**, 22151-22154
 90. Ota, S., Hazeki, K., Rao, N., Lupher, M. L., Jr., Andonidou, C. E., Druker, B., and Band, H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 414-422
 91. Boussetis, V. A., Freeman, G. J., Berezovskaya, A., Barber, D. L., and Nadler, L. M. (1997) *Science* **278**, 124-128
 92. Marshall, C. J. (1998) *Nature* **394**, 553-554
 93. Crespo, P., Schaubel, K. E., Ostrom, A. A., Gutkind, J. S., and Bustelo, X. R. (1997) *Nature* **385**, 169-172
 94. Han, J., Das, B., Wei, W., Van Adst, L., Mosteller, R. D., Khosravi-Far, R., Westwick, J. K., Der, C. J., and Broek, D. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1346-1353
 95. Liu, Y., Liu, Y. C., Moller, N., Giampa, L., Ely, C., Doyle, M., and Altman, A. (1999) *J. Immunol.* **162**, 7095-70101
 96. Fernandez, B., Czech, M. P., and Meisner, H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 20244-20250

125
 TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN