



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

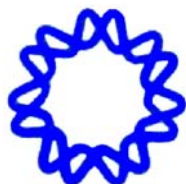
---

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

“ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE LINFOCITOS T  
CD4<sup>+</sup> Y CD8<sup>+</sup> HUMANOS A LAS SEÑALES  
GENERADAS A TRAVÉS DE CD43”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
PRESENTA  
JOSÉ LUIS RIVERA CORONA



BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY

CUERNAVACA, MOR.

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Asesor de tesis**

Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay

**Comité Tutorial**

Dra. Claudia González Espinosa  
Dr Fernando Esquivel Guadarrama

**Jurado de examen para obtener el grado de Maestro en Ciencias  
Bioquímicas**

Presidente: Dr. Federico Sánchez Rodríguez

Secretaria: Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay

Vocal: Dr. Roberto Coria Ortega

Suplente: Dra. Carmen Beltrán Núñez

Suplente: Dra. Rosario Vera Estrella

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Apoyado por donativos de DGAPA/UNAM (IN226203/IN219307) y CONACYT (U46505-M), México. Durante el desarrollo de la maestría, José Luis Rivera Corona recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Agradecemos al Banco de Sangre del Hospital de Zona del IMSS en Cuernavaca Morelos.

Este trabajo fue presentado en el XVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Inmunología, en Chihuahua, Chih., Mayo 2006.

## **A DIOS**

Dios es fiel; construye la historia y dirige nuestra vida conforme a sus promesas, que nunca fallan.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Lupita “Hijo, pa’ tras, ni pa’ tomar impulso”**

Má, no tengo palabras para agradecer todo lo que has hecho y sigues haciendo por mí. Amor es la palabra que mejor describe todos tus esfuerzos para conmigo. Te amo mamá.

### **A José Luis**

Gracias papá por enseñarme a buscar en todo momento el alcanzar mis sueños. Te amo papá.

### **A Olguita, Carlos, Esteban y Toño.**

Gracias por sus consejos, su apoyo incondicional, sus risas, guasas, chanzas... gracias por complementar mi vida, aun en la distancia. Los amo y los llevo siempre en mi mente y mi corazón.

### **A Di y Pame**

Gracias por compartir conmigo un poco de su maravilloso ser.

### **A mis amigos**

Anellyh, Eduardo (Heavy), Patito, Carmen, Ileana, Elia, Ustedes son fuente inagotable de motivación. ¡Gracias!

**Dra. Yvonne**

Gracias por aceptarme y permitirme trabajar en su laboratorio, pero sobre todo, gracias por todo lo aprendido (no solo me refiero a CD43), mi forma de ver las cosas es otra después de haber trabajado con usted. De verdad, gracias.

**A las niñas del Lab.**

Amiel, Constance, Caty, Erika, Irma, Laura, Mali, Monse, María, Norita, Rosita, Samahadi... Gracias por compartir conmigo un poco de sus alegrías, tristezas, soledades, problemas, hormonas, pizzas, chapatas... y por las innumerables tardes del cafecito de la maquina...

**A Norita**

Gracias Nora por todo tu apoyo, pero sobre todo por tus consejos. No voy a olvidar el "achis achis los mariachis" ni el "que onda tu". Nora, de verdad muchas gracias.

**A mis compañeros de laboratorio**

Gustavo, Omar, José Luis Montiel, gracias por compartir un poco de su conocimiento conmigo.

**A mis compañeros de generación**

Itzel, Sergio, Eugenio, Carmen, Juanita, Mike, Sabino, Jonathan... pero principalmente a Erika y Mary, por estar conmigo en los momentos difíciles. Las llevo siempre en mi corazón, de verdad muchas gracias.

**A mis camaradas**

Penélope, Claudia, Daya, Sandra, Pool... De verdad ha sido un verdadero placer el conocerlos y disfrutar de su compañía.



## INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMEN	iii
I INTRODUCCION	1
1 Generalidades	2
2 Estructura y funciones de CD43	4
a) Estructura de CD43	4
b) El rol fisiológico de CD43	5
3 Rutas de señalización de CD43	8
4 Lck y Fyn: ¿dos cinasas con funciones redundantes?	10
5 Regulación de la activación de Lck y Fyn	13
6 Diferencias entre rutas de señalización de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup>	15
II HIPOTESIS Y OBJETIVOS	18
III MATERIALES Y MÉTODOS	20
1 Anticuerpos y reactivos	21
2 Aislamiento y purificación de linfocitos de sangre periférica	21
3 Separación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> a partir de linfocitos T totales.	23
4 Activación celular	24
5 Evaluación de la fosforilación de Lck y Erk	24
6 Proliferación celular	25
7 Citometria de flujo	26

IV	RESULTADOS	27
1	Evaluación de la pureza de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> purificados de sangre de donadores sanos.	28
2	Niveles de expresión de CD43 en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> .	29
3	CD43 induce la fosforilación de Lck y de Erk a tiempos largos en linfocitos T totales.	30
4	El entrecruzamiento de CD43 en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> induce niveles comparables de fosforilación de la MAP cinasa ERK	31
5	CD43 induce la fosforilación de Lck y de ERK tanto en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> como en CD8 <sup>+</sup> .	32
6	La fosforilación de Lck es regulada de manera distinta en células CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> .	33
7	Linfocitos T CD8 <sup>+</sup> proliferan más que linfocitos T CD4 <sup>+</sup> cuando se estimulan a través de CD43 y del TcR	35
V	DISCUSIÓN	36
VI	FIGURAS	42
VII	REFERENCIAS	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC	célula presentadora de antígeno
$\beta$ GP	$\beta$ -glicerol fosfato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen-diamino-tetracético
ERK	cinasa regulada por señales extracelulares
FAKs	quinasas de adhesión focal
FCS	citofluorometría de flujo
ICAM-1	molécula de adhesión intracelular-1
ITAM	motivos de activación basados en tirosinas
GDP	difosfato de guanosina
GTP	trifosfato de guanosina
HSA	albúmina sérica humana
IL-2	interleucina-2
KDa	kilodalton
LAT	adaptador de células T activadas
MAPK	proteína cinasa activada por mitógenos
MEK	cinasa de la proteína cinasa activada por mitógenos
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
NFAT	factor de transcripción de las células T activadas
NF $\kappa$ B	factor nuclear $\kappa$ B
PI3K	fosfatidilinositol-3 cinasa
PKC	proteína cinasa C
PLC $\gamma$	fosfolipasa C- $\gamma$
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PTK	proteína cinasa de tirosina
SH2	dominio tipo 2 con homología a Src
SH3	dominio tipo 3 con homología a Src
Src	cinasa del virus de sarcoma

TcR	receptor para el antígeno de células T
TNF	factor de necrosis tumoral
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

## RESUMEN

Para generar una respuesta adecuada del linfocito T, se requiere, además de las señales generadas por el TcR, otras señales generadas por moléculas accesorias tales como CD2, CD4, CD8 y CD43, las cuales al interactuar con sus respectivos ligandos o contrareceptores en la APC, modulan y optimizan las señales del TcR, llevando, en función del estímulo, a diferenciación, proliferación o apoptosis. La molécula CD43 es una glicoproteína muy abundante que se expresa en la superficie de todas las células linfoides. Su dominio extracelular, compuesto por 235 aminoácidos, se extiende 45 nm sobre la superficie celular. CD43 recluta en su cascada de señalización a las cinasas de la familia de Src, Lck y Fyn, las cuales son de vital importancia para una adecuada activación y respuesta de la célula T. Cascada abajo, CD43 promueve la movilización de  $Ca^{2+}$  y la activación de PKC, lo que resulta a su vez en el reclutamiento de MAPk y posterior activación de factores transcripcionales como NFAT, NF $\kappa$ B y AP1.

Los linfocitos T, se clasifican básicamente en linfocitos CD4+ y CD8+. La regulación, el papel de las señales específicas y la respuesta final de la célula son diferentes en las dos subpoblaciones. Sin embargo, la mayoría de los estudios para elucidar las rutas de CD43 se han realizado en linfocitos T totales, sin diferenciar entre linfocitos CD4+ y CD8+, aún cuando existen claras diferencias entre ambos tipos de células. En el presente trabajo, se muestra que CD43 recluta tanto a Lck como a ERK en linfocitos T CD4+ y CD8+, pero las cinéticas e intensidades de fosforilación de estas moléculas son distintas en cada subpoblación. CD43 induce la fosforilación de la tirosina 192 de Lck en linfocitos T CD4+ y CD8+. Esta fosforilación está mediada probablemente por la cinasa Syk. El empleo del inhibidor de la MEK de ERK sugiere un circuito regulatorio en el que ERK controla la intensidad de las señales de Lck en linfocitos T CD4+, mientras que en linfocitos T CD8+, las señales parecen ser más independientes de la cinasa ERK. Por otra parte, la inhibición de la actividad enzimática de las Src cinasas induce una mayor fosforilación de la Y<sup>192</sup> en linfocitos T CD4+, no así en linfocitos T CD8+, lo que sugiere una regulación

distinta de los niveles y/o actividad enzimática de Syk en cada subpoblación. Nuestros resultados también muestran que los linfocitos T CD8+ proliferan más que linfocitos T CD4+ en respuesta al estímulo a través de CD43, previo o simultáneo al estímulo a través del TcR. En conjunto, nuestros resultados indican que, el comportamiento observado en linfocitos humanos CD4+ y CD8+ en respuesta al estímulo a través de CD43 no es exactamente igual ya que las cinéticas e intensidades de fosforilación no son las mismas. A su vez, estas diferencias podrían reflejar la existencia de distintos circuitos regulatorios en cada una de las subpoblaciones. A nivel fisiológico, estas diferencias se reflejan en distintos niveles de proliferación.

I  
INTRODUCCIÓN

## 1 Generalidades

El sistema inmune provee al organismo una serie de mecanismos de defensa en contra de agentes patógenos. Este sistema está constituido por un conjunto de células que, de forma colectiva y coordinada, monta una respuesta para hacer frente a sustancias extrañas, conocida como respuesta inmune. Para su estudio, el sistema inmune puede dividirse básicamente de dos partes: el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo. La respuesta inmune innata constituye la primera línea de defensa del organismo; este sistema está formado por barreras físicas, tales como la piel y las mucosas, así como por una serie de células efectoras como son las células cebadas, células asesinas naturales (NK), macrófagos y células polimorfonucleares. Se considera que la respuesta inmune innata es inmediata y reconoce proteínas de microorganismos patógenos. En cambio, la respuesta inmune adaptativa, cuyos componentes celulares principales son las células dendríticas, los linfocitos T y los linfocitos B, se caracteriza por ser altamente específica y por tener “memoria”. Estas dos características se complementan de tal modo que le confieren a un individuo la capacidad de responder rápida y específicamente en contra de agentes patógenos afrontados previamente.

En linfocitos T, células clave del sistema inmune adaptativo, el reconocimiento específico del antígeno se da a través del receptor para el antígeno de la célula T (TCR), que identifica péptidos derivados de patógenos e induce señales intracelulares claves para la activación de la célula T. Los péptidos que reconoce el TCR son presentados por glicoproteínas altamente polimórficas presentes en las células presentadoras de antígeno (APC's). Este tipo de proteínas está codificado por un grupo de genes que fueron primero identificados por sus potentes efectos en la respuesta inmune a tejidos transplantados. Por esta razón, el complejo de genes fue llamado Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC).



Si bien el TCR reconoce específicamente al antígeno, las señales provenientes del TCR no son suficientes para generar una respuesta adecuada del linfocito, y son necesarias otras señales proporcionadas por distintas moléculas accesorias como CD2, CD4, CD8 (Janeway, 1992), CD28 (Klasen et al., 1998) y CD43 (Bagriacik et al., 2001; Rosenstein et al., 1999) presentes en la célula T, las cuales interactúan con sus respectivos ligandos o contrareceptores en la APC. Las señales proporcionadas por estas moléculas modulan y optimizan las señales del TCR, regulando la síntesis de macromoléculas y el metabolismo energético de la célula, llevándola, en función del estímulo, a diferenciación, proliferación o apoptosis. Es por esto que el estudio de las señales intracelulares que se generan por la interacción de las moléculas accesorias con sus ligandos en la APC es de trascendental importancia para entender de manera más integral los mecanismos de activación de las células T.

Se ha propuesto que cuando un linfocito T y una APC se aproximan, los primeros contactos se establecen a través de moléculas que participan en adhesión, y que la respuesta final de la célula depende en gran parte de estas interacciones. CD43 ha sido identificada como una de las moléculas más alargadas de la superficie celular. Debido a su abundancia sobre la superficie de la célula T y a que su ectodominio que se proyecta 45 nm hacia el espacio extracelular, CD43 pudiera ser una de las moléculas, a través de las cuales la célula T establece los primeros contactos con la célula APC y censa el medio ambiente. Este trabajo se enfocó en el estudio de algunas de las señales intracelulares generadas por la molécula CD43 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> humanos.

## **2 Estructura y funciones de CD43**

### **a) Estructura de CD43**

La molécula CD43, conocida también como gpL115, sialoforina o leucosialina, es una glicoproteína abundante ( $1.5 \times 10^5$  moléculas/célula) que se expresa en la superficie de todas las células hematopoyéticas excepto en eritrocitos (Axelsson et al., 1988; Remold-O'Donnell et al., 1987b). Aproximadamente el 60% de la masa de CD43 está constituida por carbohidratos como ácido siálico, N-acetil-galactosamina y galactosa (Carlsson & Fukuda, 1986; Fukuda & Carlsson, 1986). Posee un dominio extracelular con 235 aminoácidos que incluyen 80 residuos de serinas o treoninas, la mayoría de los cuales están O-glicosilados y que se extiende hasta 45 nm de la superficie celular, un dominio transmembranal de 23 aminoácidos y un dominio intracitoplásmico con 123 aminoácidos, entre los que destacan 6 treoninas y 11 serinas potencialmente fosforilables (Cyster et al., 1990; Pallant et al., 1989; Shelley et al., 1989). Los tres dominios de CD43 están codificados por un solo exón (Cyster et al., 1990; Pallant et al., 1989; Shelley et al., 1989). Se han reportado dos isoformas de CD43, una con una masa molecular de 115 KDa la cual se expresa esencialmente en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y monocitos y otra con una masa molecular de 130 KDa que se expresa en células T CD4<sup>+</sup> activadas, CD8<sup>+</sup> en reposo y activadas, neutrófilos, plaquetas, macrófagos y linfocitos B activados. Ambas isoformas son el resultado de la glicosilación diferencial de la molécula, regida por la actividad de la core 2 UDP-GlcNAc:Gal $\beta$ 1-3GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc)  $\beta$ 1-6GlcNAc glicosil transferasa (C2GnT).

## **b) La función fisiológica de CD43.**

CD43 funciona como una molécula accesoria que tiene la capacidad de generar señales intracelulares independientemente de las del TCR, así como de modular las de otras moléculas de la superficie celular, tales como el TCR (Bagriacik et al., 2001; Park et al., 1991) ó CD2 (Stockl et al., 1996)(Stockl)

En lo que respecta a los ligandos naturales de CD43, se han identificado cuatro moléculas: ICAM-1(Rosenstein et al., 1991), galectina-1 (Baum et al., 1995a), MHC-I (Stockl et al., 1996) y albúmina sérica humana (HSA) (Nathan et al., 1993). Se piensa que, al interactuar con ICAM-I, CD43 puede regular la adhesión entre la célula T y la APC. El resultado de la interacción de galectina-I con CD43 aun no es claro, pero por ser galectina-1 una proteína abundante en la superficie de células epiteliales tímicas (Baum et al., 1995a), se ha sugerido que al interactuar con galectina-1, CD43 participa en procesos de selección negativa de timocitos (Barondes et al., 1994a; Barondes et al., 1994b; Baum et al., 1995a; Baum et al., 1995b). Analizando la adhesión espontánea entre células T y APCs se encontró que CD43 es capaz de interactuar con moléculas MHC-I, y que esta interacción favorece un aumento en la avidéz de la interacción entre CD2 y su ligando LFA-3 (Stockl et al., 1996). En neutrófilos humanos, se sabe que CD43 interactúa con HSA, lo que parece regular negativamente el “spreading” de las células, posterior a la adhesión a un sustrato.

Por otra parte, se sabe que CD43 actúa como receptor para la hemaglutinina del virus de influenza A y que esta interacción participa en la disfunción de leucocitos polimorfonucleares asociada a esta infección (Abramson & Hudnor, 1995). CD43 promueve la interacción entre *Mycobacterium tuberculosis* y la membrana de macrófagos, facilitando la infección. Sin embargo, la célula es aún capaz de responder produciendo TNF- $\alpha$  (Fratazzi et al., 2000), lo que sugiere una conexión funcional entre la unión de

la micobacteria al macrófago y la producción de TNF- $\alpha$ . En pacientes inmunodeficientes afectados con el síndrome de Wiskott-Aldrich, se sabe que es deficiente la expresión de CD43 (Parkman et al., 1981), mientras que en pacientes infectados con HIV, se han encontrado anticuerpos que reconocen una forma hiposialilada de la molécula CD43 (Giordanengo et al., 1995) que correlaciona con una susceptibilidad de éstas células a la muerte inducida por galectina-1 (Lanteri et al., 2003). Además, se ha demostrado que el entrecruzamiento de CD43 aumenta la replicación del virus del VIH en linfocitos T (Barat & Tremblay, 2002).

El hecho que todos los ligandos descritos a la fecha para CD43 sean a su vez ligandos de otras moléculas de la superficie de linfocitos T [MHC-I es ligando de CD8 (Rosenstein et al., 1989); LFA-1 interactúa con ICAM-1 (Dustin & Springer, 1988); mientras que se ha reportado la interacción existente entre galectina-1 y CD2, CD3 (Walzel et al., 2000), CD7 (Pace et al., 2000) y CD45 (Fajka-Boja et al., 2002; Walzel et al., 1999)], sugiere que CD43 podría participar en la regulación de las interacciones de las células linfoides con distintas células. Además, es posible que dependiendo de la isoforma de CD43 y del ligando al que se una, se induzcan señales diferenciales.

El empleo de anticuerpos monoclonales específicos dirigidos contra CD43, en células Jurkat o en linfoblastos T, promueve la adhesión celular mediada por la interacción de las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha L\beta 2$  con sus ligandos, tanto en la matriz extracelular (fibronectina) como con ligandos celulares (ICAM-1 y VCAM-1) (Serrador et al., 1998), induciendo además la redistribución de CD43 hacia el urópodo en la célula. Así mismo, las señales del TCR son suficientes para inducir la relocalización de CD43 fuera del área de contacto con las células presentadoras de antígeno (Allenspach et al., 2001; Delon et al., 2001). Este proceso de polarización celular dependiente de CD43 se da a través de la interacción del dominio intracitoplásmico de CD43 con

eizrina y moesina, regulando su distribución hacia los uropodos en linfocitos, en los puntos de contacto célula-célula (Serrador et al., 1998).

Estudios realizados en células transfectadas con el gene humano de CD43 o células deficientes en la expresión de CD43 (CD43<sup>-/-</sup>), sugirieron que la carga negativa conferida por el alto contenido de ácido siálico de CD43 proporciona a la célula fuerzas repulsivas que contribuyen a regular de manera negativa la adhesión de linfocitos T con células blanco o APCs (Manjunath et al., 1995; Manjunath et al., 1993). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la presencia de CD43 en el sitio de contacto entre un linfocito T y una APC no interfiere con las señales generadas por el TCR, ni con eventos inducidos a través de las señales propias de CD43, lo que debilita la teoría de que CD43 represente solo un impedimento estérico en la transmisión de señales intracelulares (Allenspach et al., 2001; Layseca-Espinosa et al., 2003).

Experimentos realizados con ratones CD43<sup>-/-</sup> revelaron el papel de esta molécula en la migración y “homing” o direccionamiento de los linfocitos hacia los órganos linfocitarios secundarios y los tejidos, notándose un incremento en la salida de los linfocitos del torrente sanguíneo a la vez que un retraso en la llegada a los órganos linfoides periféricos (Stockton et al., 1998; Woodman et al., 1998). La participación de CD43 en la migración celular se ve apoyada por otro reporte en los que anticuerpos anti-CD43 inhiben el rodamiento de linfocitos T sobre las células epiteliales de vénulas altas, o retardan significativamente el establecimiento de diabetes, inhibiendo específicamente el reclutamiento de linfocitos T a los islotes del páncreas, así como a glándulas salivales y lacrimales, limitando la amplitud de los procesos inflamatorios (McEvoy et al., 1997). Así mismo, en un modelo de esclerosis múltiple, el modelo de encefalitis experimental autoinmune (EAE), los ratones CD43<sup>-/-</sup> desarrollan infiltrados leucocitarios de menor tamaño en las lesiones ateroscleróticas, probablemente como un reflejo de defectos en la migración y/o capacidad locomotora y así como de activación de los linfocitos (Onami et al., 2002). Estos resultados

sugieren también que anticuerpos anti-CD43 podrían tener usos terapéuticos. Por otro lado, la carencia de CD43 se traduce en un retraso de la contracción de la población de linfocitos CD8<sup>+</sup> citotóxicos específicos después de un reto viral (Nathan et al., 1993), lo cual altera la homeostasis de la respuesta inmune y podría conducir a padecimientos autoinmunes.

Además de participar en quimiotaxis y adhesión (Manjunath et al., 1995; Manjunath et al., 1993; Miura et al., 2001; Rosenstein et al., 1991), se sabe que CD43 induce agregación celular (Layseca-Espinosa et al., 2003), y promueve la secreción de IL-2 y proliferación en linfocitos T (Axelsson et al., 1988; Miura et al., 2001; Santana et al., 2000). Tanto en células Jurkat (Brown et al., 1996), así como en células progenitoras de médula ósea (Hu et al., 1996) (Bazil et al., 1996) CD43 induce apoptosis. En células hematopoyéticas progenitoras, los mecanismos involucrados con apoptosis mediada por CD43, están relacionados con una ruta de señalización dependiente de la proteína proapoptótica Bad (Cermak et al., 2002).

### **3 Rutas de Señalización de CD43**

Con el objetivo de entender mejor la función de CD43, se han realizado numerosos estudios apoyados en el uso de anticuerpos monoclonales que mimetizan la interacción de CD43 con sus contrareceptores, induciendo de esta forma una amplia variedad de eventos celulares.

Entre los primeros eventos intracelulares en respuesta a la estimulación de linfocitos T a través de CD43 con el anticuerpo monoclonal L10 se encuentra el reclutamiento de las cinasas Lck y Fyn (Alvarado et al., 1995; Pedraza-Alva et al., 1996), las cuales, a su vez, fosforilan a los ITAMs de la cadena  $\zeta$ , convirtiéndolos en sitio de anclaje para la PTK Zap70 (Cruz-Munoz et al., 2003). Cascada abajo están LAT y Shc, dos proteínas adaptadoras que funcionan

como moléculas de andamiaje que promueven la formación de complejos de señalización, facilitando así la transducción de señales intracelulares. Cuando LAT está fosforilada, recluta a la fosfolipasa C  $\gamma$ -2 (PLC- $\gamma$ -2) (Anzai et al., 1999; Layseca-Espinosa et al., 2003), la cual se activa al ser fosforilada por Syk, una PTK de la familia de ZAP70. La función de PLC  $\gamma$ -2 es catalizar la hidrólisis de fosfatidil inositol bi-fosfato (PIP2), generando dos moléculas clave: inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). La primera, promueve la liberación de calcio de los almacenes intracelulares, con lo que se induce un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Mentzer et al., 1987). Este aumento resulta en la activación de la fosfatasa calcineurina, la cual defosforila al factor transcripcional NFAT, descubriendo un sitio de localización nuclear, lo cual favorece la translocación de este último al núcleo. DAG por otro lado, constituye sitios de unión a la membrana para diferentes miembros de la familia de la proteína cinasa C (PKC), las cuales a su vez participan en la activación de la vía de las MAP cinasas y en la activación de factores transcripcionales como NFAT,  $\text{NF}\kappa\text{B}$  y AP-1 (Del Rio et al., 2004; Pedraza-Alva et al., 1998; Santana et al., 2000).

Vav es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) para GTPasas de la familia Rac que se fosforila en tirosinas después de entrecruzar a CD43 con anticuerpos específicos. Este evento lleva al reclutamiento de proteínas adaptadoras como SLP-76 y Grb2, implicadas en la síntesis de IL-2 y rearrreglos de citoesqueleto (Pedraza-Alva et al., 1998). Cbl es otra molécula adaptadora con actividad de E3 ligasa que participa en la vía de señalización de CD43. Interesantemente, Cbl es fosforilada en residuos de serina como resultado de la estimulación de linfocitos T a través de CD43 y en residuos de tirosina en respuesta a la estimulación con el TCR. Según el tipo de fosforilación, Cbl participa de manera positiva (cuando es fosforilada en serinas) o negativa (cuando es fosforilada en tirosinas) en la regulación de la activación de la vía de las MAP cinasas (Pedraza-Alva et al., 2001). Las MAP cinasas son proteínas en las que confluyen distintas rutas de señalización que también son activadas al estimular a la célula T a través de CD43. Tanto ERK, como JNK y

p38 responden a dicho estímulo (Del Rio et al., 2004; Fierro et al., 2006; Pedraza-Alva et al., 1998).

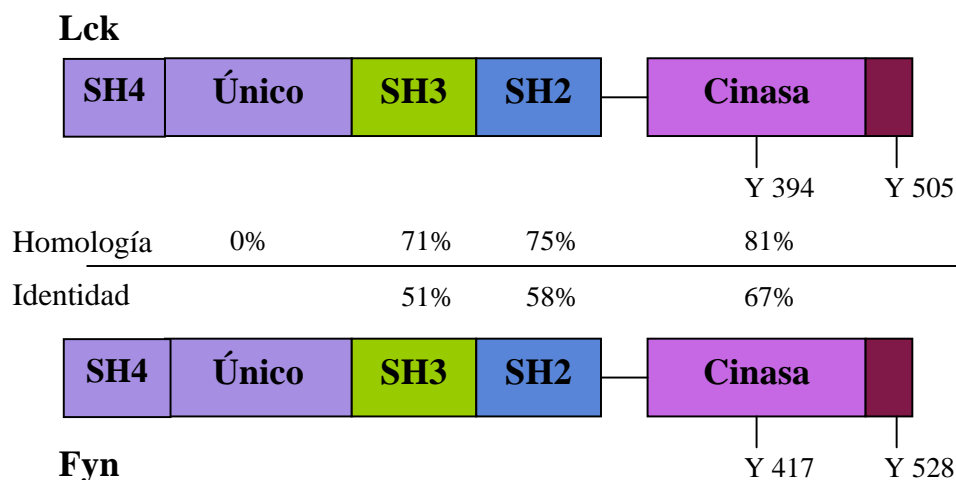
#### **4 Lck y Fyn: ¿dos cinasas con funciones redundantes?**

Un ejemplo típico de PTK's no receptoras son las proteínas de la familia de Src (SFK). Esta familia recibe su nombre de la proteína Src. El gen que codifica para esta proteína es considerado un protooncogen, ya que el virus del sarcoma de Rous (VSR) genera mutaciones en el gene src (v-src) que producen una proteína constitutivamente activa, capaz de inducir transformación celular (Jove & Hanafusa, 1987). Los miembros de esta familia son: Src, Yes, Fyn, Fgr, Lck, Lyn, Hck y Blk. En la célula T, son dos cinasas de la familia de Src (SFK), Lck y Fyn quienes inicialmente son reclutadas a la membrana e inician la cascada de señalización inducida por el TCR, así como de varias moléculas accesorias, y son de vital importancia para una adecuada activación y respuesta de la célula T (Mustelin & Tasken, 2003).

#### **v Características estructurales de Lck y Fyn:**

La organización de los dominios es similar entre los miembros de familia de Src. Tienen una masa molecular de entre 52 y 62 KD y comprenden 6 diferentes dominios funcionales: un dominio de homología a Src 4 (SH4), un dominio único, dominio SH3, dominio SH2, un dominio catalítico SH1 y una región regulatoria C-terminal (Tatosyan & Mizenina, 2000).





Estructuras de Lck y Fyn (Zamoyska et al., 2003)

El dominio SH4 se encuentra en el extremo amino-terminal; comprende los primeros 15 o 17 residuos de aminoácidos, los cuales poseen señales para modificación con lípidos y funcionan como motivos de unión a la membrana (Resh, 1993). La cinasa Src tiene en la posición 2 una glicina miristilada que le permite enlazarse a la membrana celular. Sin embargo, la miristilación probablemente no garantiza la asociación de la proteína a la membrana, ya que es posible encontrar moléculas de Src miristiladas en el citosol. Además de las señales de miristilación, los dominios SH4 de las Src cinasas contienen residuos de aminoácidos básicos, susceptibles de ser palmitoilados. Solo las moléculas miristiladas son palmitoiladas, y ya que la palmitoilación es un proceso reversible, el regular la despalmoilación y repalmoilación puede ser un mecanismo regulador de la localización de las cinasas de la familia de Src en respuesta a un estímulo determinado (Kaplan et al., 1988; Pellman et al., 1985). Como Src, Lck y Fyn cuentan también con una glicina en la posición 2 de su secuencia de aminoácidos, susceptible de miristilación (Timson Gauen et al., 1996), pero tienen distintos sitios de palmitoilación en las cisteínas (C<sup>6</sup> para Fyn, C<sup>3</sup> y C<sup>5</sup> para Lck) (Kabouridis et al., 1997; Koegl et al., 1994). Estas modificaciones son esenciales para el direccionamiento de estas cinasas a la

membrana plasmática y para una correcta función en las rutas de señalización en las que participan.

Los dominios únicos de Lck y Fyn cuentan con sitios potencialmente fosforilables que permiten que estas cinasas interactúen con proteínas tanto de membrana como del citoplasma (Thomas & Brugge, 1997). Interesantemente, la homología entre los dominios únicos de Lck y Fyn es de cero (Zamoyska et al., 2003).

El dominio de cinasa de las proteínas de la familia de Src se encuentra entre los aminoácidos 265 y 516. Las SFK fosforilan tirosinas con secuencia consenso de aminoácidos **EEEIY(G/E)EFD**. Las SFK tienen la capacidad de autofosforilarse en sitios dentro del mismo dominio de cinasa (Y<sup>394</sup> para Lck y Y<sup>417</sup> para Fyn). Esta autofosforilación aumenta su capacidad catalítica de 2 a 4 veces.

Lck y Fyn, además de tener un dominio de cinasa, cuentan también con un dominio Src-Homology 3 (SH3) que les permite enlazarse a regiones ricas en prolina presentes en proteínas blanco. Todos los ligandos conocidos de dominios SH3 tienen una secuencia consenso **PXXP**, y son los aminoácidos adyacentes a esta secuencia los que determinan la especificidad de los dominios SH3 (Rickles et al., 1995). El dominio SH2, permite a las SFK reconocer secuencias cortas de aminoácidos que portan una tirosina fosforilada. De forma análoga a los sitios de reconocimiento para los dominios SH3, los aminoácidos siguientes a la tirosina fosforilada determina la especificidad de cada dominio individual SH2. El dominio SH2 de las cinasas de la familia de Src reconocen preferentemente secuencias del tipo pTyr-X-X-Ile/Pro, donde X representa aminoácidos hidrofílicos. Los dominios SH2 de Lck y Fyn tienen especial afinidad por la secuencia pTyr-Glu-Glu-Ile (Songyang et al., 1993). Tanto el dominio SH3 como el dominio SH2 pueden funcionar además como proteínas adaptadoras e interaccionan con una amplia variedad de proteínas con

motivos ricos en prolina y fosfotirosinas específicas, facilitando el ensamble de complejos macromoleculares (Caron et al., 1992; Straus et al., 1996; Xu & Littman, 1993). Es importante mencionar que los dominios SH2 y SH3 de Lck y Fyn son considerablemente diferentes, lo que explica que estas dos cinasas interaccionen con proteínas en común, pero también, que cada una de ellas tenga sustratos únicos (Caron et al., 1992; Straus et al., 1996; Xu & Littman, 1993).

## **5 Regulación de la activación de Lck y Fyn**

El dominio carboxi-terminal de las SFK tiene una tirosina en una posición constante ( $Y^{505}$  para Lck y  $Y^{528}$  para Fyn) que está rodeada por aminoácidos conservados. La fosforilación de esta tirosina por la tirosin cinasa Csk (Latour & Veillette, 2001) inhibe la actividad de cinasa en más del 98%, por lo que esta región es de vital importancia en la regulación de la actividad catalítica de las SFK (van Hoek et al., 1997). Recientemente se ha demostrado, que en metástasis de cáncer de colon humano, Src tienen mutaciones en el dominio carboxi terminal (Irby et al., 1999). Cuando se substituye a la tirosina reguladora ( $Y^{505}$  para Lck y  $Y^{528}$  para Fyn) por fenilalanina, se genera una mutante con actividad de cinasa constitutiva (Marth et al., 1988), lo que puede resultar, *in vivo*, en la formación de tumores (Abraham et al., 1991a). Los dominios SH2 tanto de Lck como de Fyn interactúan con estas tirosinas reguladoras cuando están fosforiladas, adoptando la molécula una conformación cerrada que hace inaccesible el dominio de cinasa (Latour & Veillette, 2001; Thomas, 1995). A su vez, el dominio SH3 puede tener una función reguladora, ya que este dominio interactúa en forma intramolecular con la región "linker" y estabiliza la conformación cerrada que resulta de la interacción del dominio SH2 con la región reguladora (Sicheri & Kuriyan, 1997; Xu et al., 1999). CD45 es una fosfatasa transmembranal de la superficie de linfocitos T, y es la encargada de defosforilar a la  $Y^{505}$  de Lck y la  $Y^{528}$  de Fyn (Hermiston et al., 2003), haciendo

de este modo que el dominio de cinasa quede libre. El papel de CD45 como regulador positivo es crítico, ya que estudios en líneas de células T deficientes en CD45 muestran a Lck y a Fyn fosforilados en la tirosina reguladora así como una drástica reducción en la inducción de fosfotirosinas cuando se estimula a través del TCR (Koretzky et al., 1991; Ostergaard et al., 1989; Stone et al., 1997). A su vez, los ratones deficientes en CD45 cuentan con solo algunas células T periféricas, debido al deterioro en la señalización a través del TCR durante el desarrollo en el timo (Kishihara et al., 1993). Como ya mencionamos, la cinasa encargada de fosforilar a Lck y Fyn en su tirosina reguladora es Csk (C-*Src* Kinase 1), llevando a estas cinasas a su estado inactivo (Latour & Veillette, 2001).

Lck y Fyn tienen también en su dominio de cinasa, tirosinas que regulan su actividad de forma positiva (Y<sup>394</sup> para Lck y Y<sup>417</sup> para Fyn). Estas tirosinas, cuando están fosforiladas promueven una conformación activa y aumentan la capacidad catalítica de Lck y Fyn de dos a cuatro veces (Palacios & Weiss, 2004).

En lo referente a la ubicación de estas dos cinasas, se ha demostrado que Lck y Fyn tienen diferente localización dentro de la célula T (Filipp et al., 2003). Lck tiene una alta estequiometría de interacción con CD4 (Abraham et al., 1991b; Veillette et al., 1988), y está localizado en un 95% en fracciones solubles de la membrana plasmática, mientras que más del 98% de Fyn se concentra en microdominios especializados de la membrana plasmática llamados balsas lipídicas o lipid rafts (LR). También se ha asociado a Fyn con estructuras intracelulares tales como el huso mitótico (Ley et al., 1994), además de interactuar específicamente con la familia de cinasas de adhesión focal (FAKs) (Kanazawa et al., 1996).

## 6 Diferencias entre rutas de señalización de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>

Uno de los mecanismos más importantes del sistema inmune en contra de agentes infecciosos es la respuesta mediada por los linfocitos T, las cuales reconocen antígenos derivados de patógenos desplegados en la superficie de células presentadoras de antígeno. En base a la expresión diferencial de las moléculas de superficie CD4 y CD8, los linfocitos T se clasifican principalmente en dos subpoblaciones: linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Swain, 1983). Cada subpoblación tiene distintas funciones efectoras. Las células CD8<sup>+</sup>, también llamadas células T citotóxicas, literalmente matan a las células infectadas con virus, secretando factores como perforina y granzima, que disrumen la membrana plasmática de la célula infectada (Harty & Badovinac, 2002). El segundo tipo de células T, los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, secretan, cuando reconocen un antígeno, factores solubles como citocinas que regulan tanto positiva como negativamente la respuesta inflamatoria y alertan a otras células del sistema inmune, de ahí que sean conocidas también como células T ayudadoras (O'Garra, 1998).

Varios estudios indican que la regulación y la función de las señales específicas del TCR son diferentes en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Kaech & Ahmed, 2001; Lee et al., 2002; van Stipdonk et al., 2001; Wong & Pamer, 2001; Wong & Pamer, 2003). Por ejemplo, las células CD4<sup>+</sup>, al ser estimuladas a través del TCR producen grandes cantidades de IL-2 en comparación con las células CD8<sup>+</sup>, mientras que estas últimas, cuando se estimulan a través del TCR, secretan perforina y granzima (Wong & Pamer, 2003). Entre las primeras moléculas de señalización que se activan en respuesta a la estimulación a través del TCR, se encuentran las cinasas de la familia de Src, p56 (Lck) y p59 (Fyn) (Palacios & Weiss, 2004). Estas cinasas participan de forma importante en el desarrollo, mantenimiento y activación de células T (Zamoyska et al., 2003). Durante el desarrollo, Lck es capaz de proveer todas las señales requeridas para la selección del pre-TCR $\beta$ , aunque Fyn parece cubrir solo de

forma parcial esa función (Anderson et al., 1992; Anderson et al., 1993). Así mismo, la selección positiva de células CD4<sup>+</sup> parece depender de la expresión de Lck, pero no de Fyn, mientras que la diferenciación a células CD8<sup>+</sup> procede en forma relativamente eficiente en ausencia de Lck (Schmedt & Tarakhovsky, 2001; Zamoyska et al., 2003).

La vía de las MAP cinasas, es generalmente un punto de convergencia de diversas rutas de señalización. Las rutas de señalización de la cinasa aminoterminal de c-jun (JNK) y de la MAP cinasa p38 tienen diferentes funciones en células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y más aún, ambas rutas no son redundantes para cada una de las dos poblaciones de células T (Rincon & Pedraza-Alva, 2003). c-jun, un miembro de la familia de factores de transcripción Activación Protein-1 (AP-1), fue el primer sustrato identificado de JNK (Derijard et al., 1994). En células CD4<sup>+</sup>, la producción de IL-2 parece ser independiente de JNK, ya que puede detectarse IL-2 previo a la detección de actividad de JNK y AP-1 en células CD4<sup>+</sup> (Weiss et al., 2000), sugiriendo que la activación de AP-1 no es crítica para la producción temprana de IL-2 en este tipo de células. Mas aún, en ausencia tanto de JNK1 como de JNK2, o en ausencia del activador río arriba de estas cinasas MKK7, no se reduce la producción de IL-2 en células CD4<sup>+</sup> (Dong et al., 2000). Por otra parte, las células T CD8<sup>+</sup> producen pequeñas cantidades de IL-2, y estas normalmente usan IL-2 proveniente de células T CD4<sup>+</sup>. Pero, interesantemente, las células T CD8<sup>+</sup> deficientes en JNK2 (JNK2<sup>-/-</sup>) producen elevados niveles de IL-2 comparados con las células T CD8<sup>+</sup> silvestres (Conze et al., 2002), además de que las células CD8<sup>+</sup> proliferan más en ausencia de JNK2. Al contrario de las células CD8<sup>+</sup> JNK2<sup>-/-</sup>, las células CD8<sup>+</sup> JNK1<sup>-/-</sup>, son hipoproliferativas, y producen bajos niveles de IL-2 (Conze et al., 2002).

Una buena parte de los estudios para elucidar las rutas de señalización de CD43 se han realizado en linfocitos T totales, aislados de sangre periférica de donadores sanos, sin diferenciar entre linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. El hecho de que las dos isoformas de CD43 se expresen en distintas proporciones en linfocitos T

CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> cuando estos se encuentran en reposo y que además, al activarse, ambos tipos de células, aumenten la expresión de una de las isoformas (la forma de 130 kDa) y disminuyan paralelamente la expresión de la otra isoforma (la forma ligera de 115 kDa) (Remold-O'Donnell et al., 1987b) sugiere que CD43 podría tener una participación diferente pero igualmente importante en la modulación de las señales generadas al estimular receptores y correceptores de superficie celular en ambas subpoblaciones.

**II**  
**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **II HIPÓTESIS**

Es frecuente observar que un mismo receptor no señala de la misma manera en dos tipos de células distintas. Por lo que cabe preguntarse si la vía de señalización de CD43 es la misma en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

## **III OBJETIVO**

Comparar la vía de señalización de CD43 en linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

## **IV OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Evaluar la activación de la PTK Lck en la vía de señalización de CD43 en linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

**III**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## **1. Anticuerpos y reactivos.**

Se utilizó el anticuerpo monoclonal L10, IgG1 (Remold-O'Donnel et al, 1986) que reconoce a la molécula CD43 a través de un epítipo independiente de ácido siálico y que se encuentra en todas las isoformas de CD43; el anticuerpo monoclonal anti-CD4, OKT4, IgG2a (American Type Culture Collection); el anticuerpo monoclonal anti-CD8, OKT8, IgG2a (American Type Culture Collection); y el anticuerpo monoclonal anti-CD3/TCR, OKT3, IgG2a (American Type Culture Collection). Los anticuerpos fueron purificados a partir de sobrenadante de cultivo o de líquido de ascitis por cromatografía con sefarosa-proteína A. Para activar a las células, se utilizó como entrecruzador, un anticuerpo de conejo dirigido contra IgG de ratón (RAMIG). El anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón acoplado a perlas magnéticas BioMag se adquirió de Polysciences, Inc. El anticuerpo anti-pLck (que reconoce a la Y<sup>192</sup> y a la S<sup>194</sup> cuando están fosforiladas), los anticuerpos anti-Lck, anti-Fyn, anti-ERK2, anti-SLP76 y anti-pERK (que reconoce la forma fosforilada de ERK1 y ERK2) son de Santa Cruz Biothecnology. Los anticuerpos secundarios acoplados a HRP para inmunoblot son de Biomeda. TPA (12-O-tetradecanoylforbol-13-acetato 50 ng/ml) y los inhibidores de proteasas y fosfatasas: [Antipaina ( 50 µg/ml), Aprotinina ( 10 µg/ml), PMSF (1 mM), βGP (10mM), NaF (10mM), DTT (0.5 mM), Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> (200 µM), Leupeptina (1 µg/ml)] son de Sigma.

## **2. Aislamiento y purificación de Linfocitos T de sangre periférica.**

Todos los experimentos se realizaron en linfocitos T aislados de concentrados linfocitarios de sangre humana, obtenida a través del Banco de Sangre del Hospital de Zona del IMSS en Cuernavaca, Mor., proveniente de donadores voluntarios, adultos y sanos.

El aislamiento de los linfocitos se hizo sobre un colchón de Ficoll-hypaque (Ficoll, 1983). El ficoll permite, en base a la densidad de los eritrocitos y los linfocitos, separar ambas poblaciones. Los concentrados linfocitarios diluidos volúmen/volúmen en PBS 1x (amortiguador salino de fosfatos: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 mM, pH 7.3), se depositaron sobre un colchón de Ficoll-hypaque y se centrifugaron a 350 xg a 4°C por 30 min. Los linfocitos quedan en la interfase entre el PBS y el Ficoll, de donde se extraen. Estos se lavaron dos veces con PBS, centrifugándose a 350 xg por 15 min para eliminar los excesos de Ficoll. Una vez lavados, los linfocitos se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (cuyas siglas indican el Roswell Park Memorial Institute, donde fue desarrollado este medio) completo [5% de suero fetal bovino (FCS), 5% de suero de bovino recién nacido (BCS), 2mM de L-glutamina, 100 U de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina y 50 µg de β-mercaptoetanol], se contaron y se dejaron en cajas Petri toda la noche a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para permitir la adhesión de células monocíticas. Al término de la incubación, las células no adherentes se tomaron y centrifugaron a 350 x g por min, se resuspendieron en RPMI 1640 completo y se incubaron por 1 hr a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en columnas de lana de nylon. Posteriormente, se eluyeron las células T de las columnas con RPMI 1640 completo (37°C)(Boyum, 1968) mientras que los linfocitos B permanecen pegados a la lana de nylon. Con el propósito de tener linfocitos no activos, las células T se incubaron por 24 hrs a 37° C, 5% CO<sub>2</sub> en RPMI 2% FCS. El grado de pureza y actividad de las células T obtenidas se analizó por citometría de flujo como se describe en la sección correspondiente.

### 3. Separación de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a partir de linfocitos T totales.

Posterior al proceso de purificación de los linfocitos T totales, se aislaron las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> por selección negativa. Se ajustó la concentración de las células en un rango de entre 1X10<sup>6</sup> y 5x10<sup>6</sup> células por mililitro y se incubaron con sobrenadantes de cultivo (SNC) de los anticuerpos monoclonales OKT4 ú OKT8 para purificar las subpoblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> ó CD4<sup>+</sup> respectivamente. La cantidad de anticuerpo a utilizar se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Mililitros de SNC} = \text{No de células a separar} \times \frac{50}{2 \times 10^6}$$

Las células se incubaron con el anticuerpo por 30 min. con agitación lenta a 4<sup>o</sup> C. Al cabo de los 30 min., los linfocitos se centrifugaron por 5 min. a 350 xg para eliminar el exceso de anticuerpo. Se resuspendieron en medio de cultivo RPMI incompleto y se ajusto nuevamente la concentración en el rango de entre 1x10<sup>6</sup> y 5x10<sup>6</sup> cel/ml para después incubar en frascos de cultivo T75 por 30 min. con agitación lenta cada 10 min. a 4<sup>o</sup> C con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo anti-IgG específico contra IgG de ratón. La cantidad en mililitros del anticuerpo acoplado a perlas magnéticas que se utilizó para la purificación se determinó mediante la siguiente formula:

$$\text{Mililitros de perlas BioMag} = (\text{No. de células a separar}) \times (2 \times 10^8)$$

Transcurrido el tiempo de incubación, el frasco se colocó 10 min. sobre un separador magnético BioMag, observándose la formación de un pellet en el fondo del frasco. Se recuperó el sobrenadante sin enturbiar el pellet producto de la atracción magnética entre el imán y las perlas que se unieron a la población de células que se excluirán. Para recuperar la mayor cantidad de células, se

repitió el procedimiento lavando los frascos con PBS. Se centrifugaron las células T CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup> por 5 min a 350 xg y se incubaron por 24 hrs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en RPMI 2% FCS con el propósito de tener linfocitos no activos. El grado de pureza de los linfocitos CD4<sup>+</sup> ó linfocitos CD8<sup>+</sup> se determinó por citometría de flujo.

#### **4. Activación celular**

En todos los experimentos, los anticuerpos anti-CD43 (L10), y el anticuerpo entrecruzador anti-IgG (RAMIG), se utilizaron a una concentración de 4 µg/ml. Para la activación, se ajustó la concentración celular a 5x10<sup>6</sup> cel/0.5 mL de RPMI incompleto. Las células fueron pre-incubadas con el anticuerpo primario por 15 minutos a 4° C, después de lo cual se añadió el anticuerpo secundario y las células fueron transferidas a un baño maría a 37° C para ser activadas por los tiempos indicados. Para las activaciones de más de 60 minutos, las células fueron colocadas en la incubadora a 37° C, con 5% de CO<sub>2</sub>. Al termino de la activación, las células fueron lisadas depositándolas en una solución de buffer de lisis (HEPES 25 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA 0.2 mM, Tritón X-100 0.5% (v/v), DTT 20 mM, β-glicerofosfato 20 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 5 mM, PMSF 4 mM, leupeptina 1 µg/ml, aprotinina 1 µg/ml y antipaina 50 µg/ml) por 30 min a 4°C.

#### **5. Evaluación de la fosforilación de Lck y Erk**

Los lisados obtenidos a partir de las células activadas, siguiendo los protocolos descritos con anterioridad, se analizaron por SDS-PAGE e inmunoblot. De los lisados celulares totales se ocupó el equivalente a 1X10<sup>6</sup> células (ceqs) por punto y se sometieron a un campo electroforético en geles de SDS-poliacrilamida a 100 mAmp. Las proteínas se electrotransfirieron a una

membrana de nitrocelulosa de 0.22  $\mu\text{m}$ . La membrana se bloqueó con 5% de BSA disuelto en TBS-T (10mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl y 0.05% Tween) toda la noche. Posteriormente se incubó con anti-pLck ó anti-Erk (1:1000 en TBS-T, 5% BSA) una hora a temperatura ambiente. Se lavó la membrana tres veces con TBS-T y se incubó con un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (anti-IgG de ratón 1:10,000 en TBS-T, 1% BSA) durante una hora a temperatura ambiente. Las proteínas se visualizaron en película utilizando la técnica de quimioluminiscencia (ECL, Amersham,) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el propósito de verificar que todos los carriles tuvieran la misma cantidad de proteína, se evaluaron los niveles de Lck ó Erk. Para ello se eliminó el anticuerpo dirigido contra la forma fosforilada de Lck o de Erk y se verificó la remoción del mismo por ECL. Para esto se lavaron las membranas 2 o 3 veces a 37° C durante 30 min. cada lavado con glicina 0.1M pH 3. Una vez eliminado el anticuerpo, se incubó la membrana con el anticuerpo anti-Lck o anti-Erk (1:1000 y 1:2000 respectivamente) en TBS-T 1% BSA) una hora a temperatura ambiente o a 4° C por toda la noche y se evaluó la presencia de estas proteínas siguiendo el mismo protocolo que para p-Lck.

## **6. Proliferación celular**

Se activaron  $2 \times 10^4$  linfocitos T con diferentes protocolos de activación: células pre-activadas con CD43 por 2 h y co-activadas con el TCR por 7 días, células pre-activadas con el TCR por 2 h y co-activadas con CD43 por 7 días o células activadas con CD43 y el TCR de manera simultánea (en todos los casos, los anticuerpos L10 y OKT3 se adicionaron a la suspensión celular 10 minutos antes de adicionar los anticuerpos entrecruzadores) y se evaluó proliferación celular por conversión de MTT. Todos los anticuerpos se usaron a una concentración de 0.5 mg/ml. Para determinar la proliferación de las células, se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de una solución de MTT 0.5mg/ml a cada pozo. Las células se incubaron por 3 h a 37°C y se adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de SDS al 20% en HCl

0.001 N y se incubaron las placas por 18 h a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector de Elisa (Biotek Instruments). En cada ensayo se determinó el número de células comparando la absorbancia con una curva estándar.

## **7. Citometria de Flujo.**

Se utilizaron  $1 \times 10^6$  células por punto, las cuales se lavaron con la solución de lavado (PBS, 0.02% de azida de sodio y 2% de FCS) centrifugando a 350 xg a 4°C por 5 min; se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 50  $\mu$ l de solución de lavado y 50  $\mu$ l del primer anticuerpo [anti-CD43 (L10, sobrenadante de cultivo)], anti-CD3 (OKT3 sobrenadante de cultivo), y se incubaron 30 min. a 4°C. Posteriormente se les adicionaron 4 ml de la solución de lavado, se centrifugaron a 350 xg a 4°C, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 50  $\mu$ l de solución de lavado y se incubaron con un anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón marcado con Alexa 488 por 30 min a 4° en la oscuridad. El exceso de anticuerpo se eliminó lavando las muestras con 4 ml de solución de lavado, centrifugando a 350 xg por 5 min. a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 50  $\mu$ l de solución de lavado y 50  $\mu$ l de paraformaldehido 2% en PBS. Se adicionó solución salina a las muestras en el momento de adquirir los datos en un citometro de flujo (FACSsort) utilizando el programa Cellquest. Los datos fueron analizados con el programa Flowjo Versión 6.1.1.



**IV**  
**RESULTADOS**

**1) Evaluación de la pureza de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> purificados de sangre de donadores sanos.**

Para realizar este trabajo, se utilizaron linfocitos T aislados de donadores sanos. El proceso de purificación se realizó tal y como se indica en la sección de Materiales y Métodos. En la Figura 1A se muestran los histogramas que representan los niveles de expresión tanto del TCR (tinción con OKT3) como de CD43 (tinción con L10) de linfocitos T totales purificados, como una forma de evaluar la eficiencia de la separación. Como se puede observar, mas del 95% los linfocitos purificados es OKT3<sup>+</sup> y L10<sup>+</sup>, lo que indica que la gran mayoría de los linfocitos son efectivamente linfocitos T. En cuanto a los niveles de expresión del TCR, se observa en el histograma un pequeño hombro que corresponde a células que expresan niveles ligeramente inferiores de TCR, y que podrían ser células activadas, ya que se sabe que los niveles de expresión del TCR disminuyen cuando las células son activadas.

Con el propósito de obtener poblaciones aisladas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> ó CD4<sup>+</sup>, se siguió el protocolo de separación por selección negativa, para el cual, las células T purificadas se incubaron con los anticuerpos OKT8 u OKT4, que reconocen a las proteínas de superficie CD8 o CD4 respectivamente, para después incubar con un anticuerpo secundario acoplado a perlas magnéticas que reconoce a la región Fc del primer anticuerpo. Se separó con un magneto a las células que se acoplaron a las perlas, para recolectar después en el sobrenadante a las células no reconocidas por el anticuerpo (proceso de selección negativa). La figura 1B muestra la calidad de la purificación. En esta se muestran poblaciones únicas de linfocitos CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup>. Para el caso de células CD4<sup>+</sup>, se observa una sola población positiva cuando se tiñen con OKT4 y una sola población negativa cuando se tiñen con OKT8. De igual forma, se muestra una sola población positiva de linfocitos T CD8<sup>+</sup> cuando se tiñen con OKT8, mientras que tenemos una sola población negativa, tiñendo esta subpoblación con OKT4.

## 2) Niveles de expresión de CD43 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

Para poder comparar las rutas de señalización de CD43 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, es necesario primero evaluar los niveles de CD43 en cada una de estas poblaciones. Para ello, teñimos los linfocitos CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> con una batería de anticuerpos anti-CD43 que reconocen distintos epítopes de la molécula. Los niveles de expresión de CD43 se analizaron en células en reposo o activadas con PMA por 24 hrs, con el fin de evaluar si el nivel de expresión de ésta molécula varía en función del estado de activación de la célula.

La figura 2 muestra los resultados obtenidos con el panel de anticuerpos. Se observan variaciones en el pegado que tiene cada anticuerpo anti-CD43, siendo L10, DFT1 y MEM59 los anticuerpos que mejor se enlazan a esta molécula, debido probablemente a una mayor abundancia de los epítopes que reconocen estos anticuerpos. El pegado de estos tres anticuerpos no varía entre células en reposo y activadas con PMA tanto en linfocitos CD4<sup>+</sup> como en CD8<sup>+</sup>, salvo en el caso de MEM59 en células CD4<sup>+</sup>, donde se observa un ligero aumento en el pegado del anticuerpo en células estimuladas con PMA respecto a las no estimuladas. En lo que se refiere a CBF78 y MC7, de una manera general, la intensidad de fluorescencia que se obtiene con estos anticuerpos es menor que la que se observa con L10, DFT-1 ó MEM-59. Sin embargo, CBF78 a diferencia de MC7, no presenta diferencias en el pegado entre linfocitos T CD4<sup>+</sup> en reposo y activados (figura 2).

Se encontró que L10 es un anticuerpo que se une a CD43 en forma estable en ambas subpoblaciones, además de que no se observan diferencias en el pegado entre células en reposo y activadas con PMA, razón por la cual se utilizó este anticuerpo para activar a las células en los ensayos que se describen a continuación.

### **3) CD43 induce la fosforilación de Lck y de Erk a tiempos largos en linfocitos T totales.**

Las Src cinasas Lck y Fyn se reclutan muy rápidamente en respuesta a las señales del TCR (van Leeuwen & Samelson, 1999) ó de CD43 (Cruz-Munoz et al., 2003; Layseca-Espinosa et al., 2003; Pedraza-Alva et al., 1996). Lo mismo sucede con la MAP cinasa ERK. Sin embargo, la mayoría de los reportes solo miden la fosforilación en tirosinas de estas moléculas, sin caracterizar las tirosinas que son fosforiladas. Así mismo, por lo general se considera que los eventos tempranos son determinantes en la activación. Nos propusimos caracterizar con mayor detalle la fosforilación de Lck en respuesta a las señales de CD43, midiendo la fosforilación de la Y<sup>192</sup> resultado de la actividad enzimática de Syk (Couture et al., 1994) a lo largo del tiempo. Se estimularon las células con el anticuerpo anti-CD43 L10 (4 µg/ml) con una cinética de tiempo que incluye tanto tiempos cortos (1 min a 1h) como tiempos largos (2 y 24 h), teniendo como control negativo células estimuladas solo con el anticuerpo entrecruzador, y como control positivo, células estimuladas con PMA como se describe en Materiales y Métodos. Una vez concluida la activación, las células se lisaron. Los lisados obtenidos se separaron por SDS-PAGE y las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se evaluó la fosforilación de Lck y ERK mediante inmunoblot con anticuerpos específicos para las formas fosforiladas de estas moléculas y se verificó que todos los carriles tuvieran la misma cantidad de proteína con anticuerpos que reconocen la proteína, independientemente de las modificaciones bioquímicas a las que sea sometida.

En la figura 3 se observa que CD43 es capaz de inducir la fosforilación de Lck a tiempo cortos, desde el primer minuto, alcanzando un primer pico a los 5 min. posteriores al estímulo. En lo que respecta a tiempos largos, se observa a Lck muy fosforilado, tanto a las 2 h, como, sorprendentemente, a las 24 h posteriores al estímulo. Además, consistentemente con datos previos de nuestro laboratorio obtenidos en linfocitos T totales, esta fosforilación

correlaciona con un aumento en la fosforilación de ERK en células estimuladas con L10, tanto a tiempos cortos como largos (Fierro et al., 2006; Pedraza-Alva et al., 1998). En cuanto a los niveles totales de proteína a tiempos intermedios, se observa un decremento en la cantidad de proteína Lck detectada. Como en el caso de Lck, observamos que los niveles totales de ERK en el citoplasma descienden ligeramente entre los 30 min. y 2 h de estimulación, pero regresan a valores normales a las 24 h.

**4) El entrecruzamiento de CD43 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> induce niveles comparables de fosforilación de la MAP cinasa ERK.**

Con el fin de determinar si la señales de CD43 eran comparables en linfocitos CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, se evaluó en un primer tiempo la fosforilación de Erk después de estimular a las células por 10 minutos con distintas concentraciones del anticuerpo anti-CD43 (L10). Como se observa en la Figura 4, ambas subpoblaciones de linfocitos responden a las señales de CD43, fosforilando a la cinasa ERK, siendo la intensidad de la respuesta semejante en un rango de 1 a 10 µg/ml del anticuerpo L10. En función de estos resultados, en los siguientes experimentos se decidió estimular a las células con 4µg/ml de L10.

**5) CD43 induce la fosforilación de Lck y de ERK tanto en linfocitos T CD4<sup>+</sup> como en CD8<sup>+</sup>.**

La fosforilación en la Y<sup>192</sup> y la S<sup>194</sup> de Lck aumenta la actividad de cinasa de Lck de 2 a 3 veces (Couture et al., 1994). Como mencionamos anteriormente, el entrecruzamiento de CD43 en la superficie de linfocitos T totales recluta a la cinasa Lck desde los primeros minutos. Para evaluar el probable reclutamiento diferencial de Lck en la cascada de señalización mediada por CD43 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, se estimuló a cada subpoblación con L10

con una cinética similar a la del experimento de la figura 3, y se evaluó la fosforilación de Lck en la tirosina 192 y la serina 194, así como los niveles de activación de ERK, teniendo también como control negativo a las células sin estímulo, y células estimuladas con PMA como control positivo. Estos experimentos fueron realizados en paralelo con células CD4 y CD8 provenientes de un mismo individuo.

La figura 5 muestra que el entrecruzamiento de CD43 induce la fosforilación de Lck en ambas subpoblaciones, pero con intensidades distintas. En células CD4<sup>+</sup>, la intensidad de la fosforilación de Lck aumenta en función del tiempo hasta las 2 h, siendo ligeramente menor a las 24 h que a las 2 h, pero mayor que en las células control no estimuladas por 24 h. En cambio en linfocitos T CD8<sup>+</sup>, la fosforilación de Lck parece ser más transitoria, alcanzando un máximo a los diez minutos, después de lo cual decae. En el blot en el que se muestran los niveles de Lck, se observa un cambio en la movilidad electroforética de Lck, que refleja el estado de fosforilación de la proteína. Interesantemente, este efecto se observa mejor en células CD4<sup>+</sup> que en células CD8<sup>+</sup>. En células CD4<sup>+</sup>, la movilidad electroforética de Lck varía ligeramente en función del tiempo de activación a través de CD43, alcanzando un nivel máximo a las 2 h. Esto no parece observarse en linfocitos CD8<sup>+</sup>. Conforme a lo esperado en respuesta a la estimulación con PMA, la fosforilación de Lck no aumenta a tiempos cortos, pero sí a tiempos largos, alcanzando el máximo a las 2 h en los linfocitos CD4<sup>+</sup>, mientras que en los linfocitos CD8<sup>+</sup> se mantiene elevada hasta las 24 h.

Los niveles de fosforilación de ERK son muy semejantes en ambas poblaciones, siendo que se observa un máximo de fosforilación entre los 5 y 10 minutos después de estimular a las células, y a tiempos largos (mayores a 2 h), las señales de CD43 no parecen promover la fosforilación de ERK. Los niveles totales de proteína a lo largo de la cinética, son también muy semejantes en

ambas poblaciones, aunque a las 2 h, se observa un decremento en los niveles de ERK en linfocitos CD8<sup>+</sup> y no así en linfocitos CD4<sup>+</sup>.

**6) La fosforilación de Lck es regulada de manera distinta en células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.**

Las cascadas de señalización intracelular se caracterizan por estar sujetas a distintos niveles de control. Pueden ser reforzadas por mecanismos de retroalimentación positiva o por lo contrario, de retroalimentación negativa en distintos puntos de la vía. En linfocitos T, el estado de fosforilación de ERK y la duración de este evento regula el nivel de actividad de Lck (Stefanova et al., 2003). Una fosforilación intensa y prolongada de ERK, producto de una estimulación vigorosa, fosforila la S<sup>59</sup> de Lck, lo cual a su vez impide que la tirosin fosfatasa SHP-1 se asocie a Lck y ejerza su actividad enzimática sobre moléculas tales como Lck, ZAP-70, LAT. La asociación de SHP-1 a LCK contribuye a apagar las señales tempranas de activación, mientras que la no-asociación prolonga e intensifica las señales de activación.

Evaluamos el efecto de los inhibidores PP2 (inhibidor de las cinasas de la familia de Src) y PD98059 (inhibidor de la cinasa de ERK MEK1/2), sobre las moléculas Lck y ERK en la cascada de señalización mediada por CD43 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Para ello, se diseñó un experimento con una cinética que incluye condiciones en las que se preincubó a las células con PP2 (10 µM) ó con PD98059 (30 µM) por 30 min., para después estimular esas células a distintos tiempos con L10. Cabe señalar que las concentraciones a las que se emplearon los inhibidores no fueron tóxicas para las células, aún a tiempos largos y que la viabilidad celular siempre fue superior al 95% en el momento del ensayo. Es interesante que, los inhibidores tuvieron un efecto distinto en cada subpoblación, como se muestra en la figura 6. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> preincubados con el inhibidor PP2 y estimulados por 10 min. con L10 muestran

una total inhibición de la fosforilación de ERK. Por el contrario, bajo las mismas condiciones, en linfocitos CD8<sup>+</sup> se observa una disminución en la fosforilación de Lck. Al analizar el efecto del inhibidor a las 2 h posteriores al estímulo con L10, se observa una disminución en la fosforilación en Lck en las células CD4<sup>+</sup> preincubadas con PP2, mientras que en los linfocitos CD8<sup>+</sup> se observa un aumento en la fosforilación de Lck. Respecto a las células preincubadas con el inhibidor PD98059, también se observa un aumento en la fosforilación de Lck en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y no así en linfocitos CD8<sup>+</sup> a los 10 min posteriores al estímulo con L10, respecto a las células no tratadas con el inhibidor. A las 2 h posteriores al estímulo, los niveles de fosforilación de Lck decaen tanto en linfocitos T CD4<sup>+</sup> como en CD8<sup>+</sup> cuando son pretratados con el inhibidor PD98059 (figura 6).

La fosforilación de ERK se ve inhibida a todos los tiempos analizados, tanto en CD4<sup>+</sup> como en CD8<sup>+</sup> ya sea cuando se preincubó con PP2 o con PD98059, aunque a las 2 h posteriores al estímulo, se detectó menos proteína ERK en células sin inhibidores y en las preincubadas con PP2 y no en las preincubadas con PD98059. Estos resultados sugieren que, en ambas subpoblaciones, ERK se encuentra abajo de Lck cuando las células son estimuladas a través de CD43 o que la fosforilación de ERK se induce deficientemente en linfocitos CD8<sup>+</sup> (figura 6).

#### **7) Linfocitos T CD8<sup>+</sup> proliferan más que linfocitos T CD4<sup>+</sup> cuando se estimulan a través de CD43 y del TCR.**

Los resultados de los experimentos anteriores sugieren que las señales de CD43 no son idénticas en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Para evaluar un probable efecto diferencial a nivel fisiológico, se estimularon linfocitos T CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup> bajo distintas condiciones: solo con L10, OKT3, o bien, combinando estímulos, es decir, ya sea estimulando simultáneamente a través del TCR y CD43, previamente a través de CD43 y después a través del TCR, o bien,



preestimulando a través del TCR y después a través de CD43. Después de 5 días, se valoraron los niveles de proliferación bajo esas condiciones en ambas subpoblaciones. Como se observa en la Figura 7, cuando se estimula a través de una sola molécula, ya sea CD3 o el TCR, no se alcanzan niveles notables de proliferación, sin embargo, tanto para linfocitos T CD4<sup>+</sup> como para CD8<sup>+</sup>, las células proliferan más cuando se estimula simultáneamente a través del TCR y CD43 o cuando se preestimula a través de CD43 y después a través del TCR y no proliferan cuando el TCR es el primer estímulo. También se observa que aunque ambas subpoblaciones proliferen en respuesta al estímulo combinado de CD43 y el TCR, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> proliferan notablemente más que los linfocitos CD4<sup>+</sup>. Estos datos, aunados a los de las figuras anteriores sugieren que si bien ambas subpoblaciones de linfocitos T proliferan en respuesta a la combinación de señales inducidas a través de CD43, no parecen hacerlo por vías absolutamente idénticas.

**V**  
**DISCUSIÓN**

La activación coordinada de los linfocitos T por antígenos derivados de patógenos, lleva a la expansión clonal, diferenciación, citotoxicidad o inducción de muerte celular programada. La activación de la célula T es iniciada por el receptor para antígeno de la célula T (TCR), el cual reconoce péptidos derivados del antígeno, mostrados por las molécula MHC en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC's). Aunque las señales del TCR determinan la especificidad de la respuesta de la célula T hacia el agente detonador, las señales generadas por moléculas accesorias o co-estimuladoras como CD2, CD4, CD8, o CD43 al interactuar con sus contra-receptores, ejercen un papel crucial en la respuesta específica de los linfocitos T al contribuir a través de sus señales a la modulación del umbral de la respuesta.

CD43 se destaca por ser una molécula muy abundante en la membrana de linfocitos T y que además se extiende hasta 45 nm de la superficie celular. Como se mencionó en la Introducción, CD43 tiene múltiples funciones y participa en diversas patologías (Rosenstein et al., 1999). Se han realizado esfuerzos para conocer las señales intracelulares que genera esta molécula. La mayoría de los estudios para elucidar las rutas de señalización de CD43 se han efectuado en linfocitos T totales, sin diferenciar entre linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, el hecho de que las dos isoformas de CD43 se expresen en distintas proporciones en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> cuando estos se encuentran en reposo y que además, al activarse, ambos tipos de células, aumenten la expresión de una de las isoformas (la forma de 130 kDa) y disminuyan paralelamente la expresión de la otra isoforma (la forma ligera de 115 kDa) (Remold-O'Donnell et al., 1987b) sugiere que CD43 podría tener una participación diferente en la modulación de las señales generadas en cada una de estas subpoblaciones. En este trabajo evaluamos si existen diferencias en la cascada de señalización mediada por CD43 en linfocitos T respecto a linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>. Enfocamos nuestra atención en dos moléculas clave en la señalización en linfocitos T: Lck, un miembro de la familia de las Src cinasas y ERK, un miembro de la familia de las MAP cinasas.

La técnica de selección negativa nos permitió separar eficientemente poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, con un grado de pureza > 95%. Antes de evaluar las señales generadas a través de CD43 en cada una de estas subpoblaciones, comparamos los niveles de expresión de CD43 en poblaciones purificadas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, marcando las células con un panel de cinco anticuerpos que reconocen distintos epítopes de la molécula. Todos estos anticuerpos, excepto L10, reconocen en CD43 epítopes que dependen de la presencia de ácido sialico, ya que tras el tratamiento con neuraminidasa de *Vibrio cholerae*, la cual remueve estos residuos, los anticuerpos ya no reconocen a su antígeno en la superficie celular (Mendoza Chamu, 2006). Los resultados obtenidos a partir de los linfocitos aislados de más de cinco donadores distintos mostraron que los epítopes reconocidos con los anticuerpos L10, DFT1 y CBF.78 se expresan en cantidades equivalentes en ambas subpoblaciones, y que su expresión no varía de manera significativa a las 24 h posteriores a la activación con PMA. Sin embargo, en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y no en CD8<sup>+</sup>, los epítopes de CD43 reconocidos por los anticuerpos MEM-59 y MC-7, parecen quedar más expuestos después de la activación con PMA, lo cuál se ve reflejado en un ligero aumento en el pegado de estos anticuerpos a CD43. Datos no publicados de nuestro laboratorio sugieren que los anticuerpos MC-7 y MEM-59 reconocen la isoforma de 130 kDa de CD43. Esto es consistente con el hecho que estos anticuerpos se pegan en mayor cantidad a los linfocitos CD4<sup>+</sup>, los cuales después de ser activados expresan una mayor cantidad de esta isoforma de CD43 (Remold-O'Donnell et al., 1987a). Así mismo, estos resultados indican que tanto los linfocitos CD4<sup>+</sup> como los CD8<sup>+</sup> expresan distintas isoformas de CD43 simultáneamente. Los epítopes reconocidos por los anticuerpos L10 y DFT1 son los más abundantes y los que permanecen más uniformes, independientemente del estado de activación de las células. Por disponer de la clona que produce el mAb L10, y porque este anticuerpo reconoce las dos isoformas de CD43, realizamos nuestro estudio con este anticuerpo.

Las cinasas de la familia de Src, Lck y Fyn, se reclutan en respuesta a señales mediadas por CD43 (Cruz-Munoz et al., 2003; Pedraza-Alva et al., 1996). Nuestros resultados indican que además de inducir la fosforilación de Lck y ERK a tiempos cortos, las señales de CD43 inducen también la fosforilación de estas dos cinasas a tiempos largos, 2 y 24 h. Al evaluar las probables diferencias en la ruta de señalización de CD43 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, observamos que en ambas subpoblaciones, el entrecruzamiento con L10 induce la fosforilación de las cinasas Lck y ERK. Sin embargo, las cinéticas e intensidades de fosforilación son distintas en cada subpoblación, siendo que en linfocitos CD4<sup>+</sup>, Lck permanece fosforilada hasta las 24 h después del estímulo, mientras que en linfocitos CD8<sup>+</sup>, la fosforilación de Lck es transitoria y solo se observa a los 10 minutos, después de lo cual decae.

Se ha reportado que la cinasa Syk, es un regulador positivo de Lck, (Couture et al., 1994) siendo que la fosforilación de la Y<sup>192</sup> de Lck mediada por Syk propicia cambios conformacionales en la estructura de Lck, que favorecen una mayor actividad enzimática de Lck. Reportes previos obtenidos en el laboratorio indican que CD43 recluta también a Syk en su cascada de señalización (Layseca-Espinosa et al., 2003). Nuestros resultados (Figura 3) muestran que CD43 también induce la fosforilación de la Y<sup>192</sup> de Lck, lo que sugiere que la fosforilación de la Y<sup>192</sup> de Lck en respuesta a las señales de CD43 resulta de la activación de Syk (para demostrar esto último, sería necesario inhibir la actividad de Syk con picetanol antes de estimular a las células). Está reportado que la asociación entre Lck y PLC $\gamma$ 1 depende de la interacción del dominio SH2 de PLC $\gamma$ 1 con la secuencia pTyr<sup>1021</sup> Ile-Ile-Pro (Ronnstrand et al., 1992; Songyang et al., 1993). Es interesante que, la secuencia de aminoácidos río abajo de la Tyr 192 de Lck (Ile-Ser-Pro) se asemeja a esa secuencia. Sería interesante investigar si la fosforilación de la Y<sup>192</sup> de Lck, podría ser un mecanismo alternativo por el cuál se recluta a PLC $\gamma$ 1.

En la cinética de activación que se muestra en la Figura 3, se observa que los niveles totales de Lck disminuyen notoriamente entre los 15 y 60 min posteriores al entrecruzamiento de CD43. También se observa un decremento en la fosforilación de Lck a esos tiempos. Recientemente se ha reportado que la agregación celular induce la degradación de la cinasa Lck, mediada por la E3 ubiquitin ligasa Itch con una cinética semejante (Heissmeyer et al., 2004). Queda por demostrar si la degradación de Lck que observamos en respuesta a las señales de CD43 es también mediada a través del reclutamiento de Itch. La utilización de un inhibidor de Fyn induciría una mayor activación de Itch, lo cual a su vez se traduciría por una mayor degradación de Lck. Cabe señalar que datos de nuestro laboratorio indican que las señales de CD43 regulan negativamente las funciones de Cbl, otra ubiquitin ligasa (Pedraza-Alva et al., 2001). En conjunto estos datos sugieren que las señales de CD43 favorecen una actividad de Lck mas prolongada.

Por otra parte, el hecho de que en linfocitos T CD4<sup>+</sup> tratados con el inhibidor de la MEK de ERK, previo al estímulo con L10, la fosforilación de Lck sea menor que en células estimuladas por 10 min a través de CD43 pero no tratadas con el inhibidor, sugiere que ERK controla la intensidad de las señales de Lck. Esto es consistente con el circuito de retroalimentación positiva en el que las señales intensas y prolongadas de ERK impiden la asociación de SHP-1 a Lck y su subsiguiente desfosforilación e inactivación (Stefanova et al., 2003). En linfocitos T CD8<sup>+</sup>, la intensidad de las señales a nivel de Lck parecen ser más independientes de la cinasa ERK. Por otra parte, como se observa en esta misma figura, la inhibición de la actividad enzimática de las Src cinasas con PP2 induce en linfocitos CD4<sup>+</sup> una mayor fosforilación de Lck en la Y<sup>192</sup>, no así en linfocitos CD8<sup>+</sup>. Esto podría reflejar una regulación distinta de los niveles y/o actividad enzimática de Syk en cada una de estas subpoblaciones.

El estímulo a través de CD43, previo o simultaneo al estímulo a través del TCR, favorece la producción de IL2, secreción de citocinas proinflamatorias y

proliferación celular en linfocitos T totales (Fierro et al., 2006). Nuestros resultados muestran que el estímulo a través de CD43 previo o simultáneo al estímulo a través del TCR induce la proliferación celular, tanto en linfocitos T CD4<sup>+</sup> como en CD8<sup>+</sup>. El hecho de que las células CD8<sup>+</sup> proliferen más que las células CD4<sup>+</sup>, pudiera reflejar que las diferencias encontradas en las cinéticas e intensidades de fosforilación de las cinasas Lck y ERK en ambas subpoblaciones tiene un efecto directo en la respuesta de cada subpoblación a un mismo estímulo.

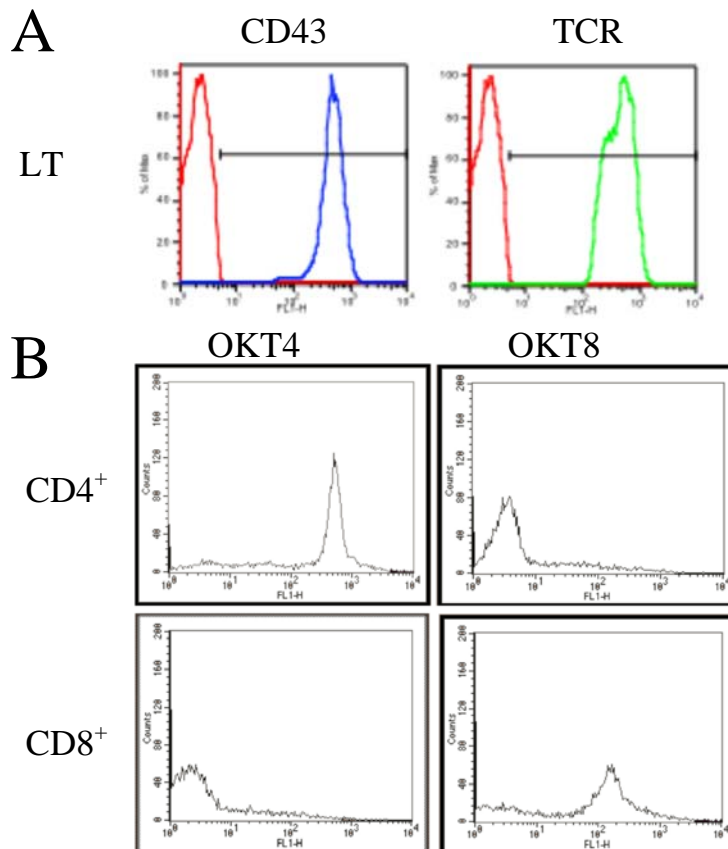
En resumen, nuestros resultados indican que tanto en linfocitos humanos “naif” CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> las vías de señalización iniciadas a partir de CD43 inducen la fosforilación de la Y<sup>192</sup> de Lck y la fosforilación de Erk. Sin embargo, los resultados muestran que el comportamiento de cada una de estas subpoblaciones no es exactamente idéntico ya que las cinéticas e intensidades de fosforilación no son las mismas. A su vez, estas diferencias podrían reflejar la existencia de distintos circuitos regulatorios en cada una de las subpoblaciones. A nivel fisiológico, estas diferencias se reflejan en distintos niveles de proliferación.

Este trabajo sentó las bases para futuros experimentos en los que será necesario evaluar la participación de moléculas tales como Syk e Itch en respuesta a las señales de CD43 en cada una de las subpoblaciones, así como evaluar las posibles diferencias a nivel de otras respuestas fisiológicas tales como la producción de citocinas.

**VI**  
**FIGURAS**



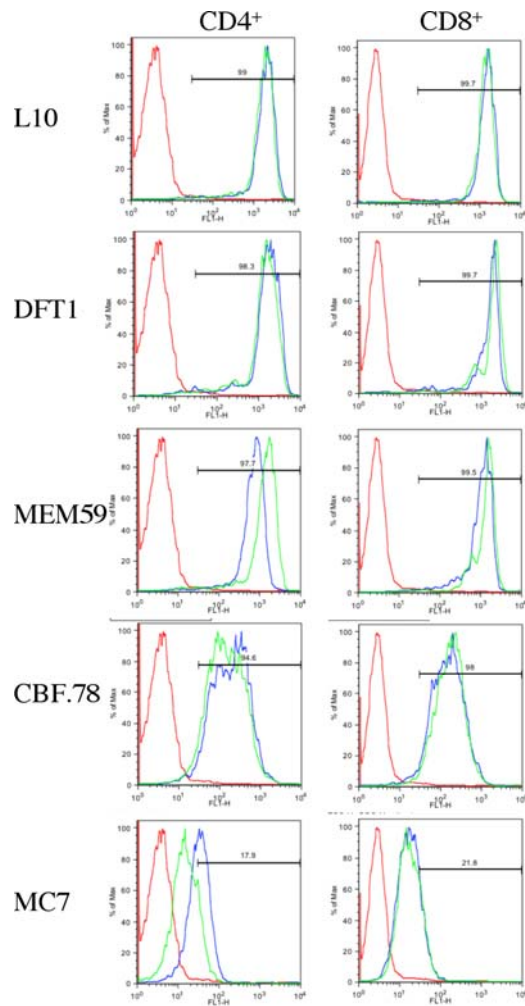
Figura 1



**Análisis de pureza de linfocitos T CD4 ó CD8+ obtenidos de concentrados leucocitarios.**

A) Se utilizó el anticuerpo L10 y OKT3 para evaluar la expresión de CD43 y del TCR en linfocitos T totales. Línea roja: control negativo; línea azul: CD43; línea verde: TCR. B) Después de separar a las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a partir de linfocitos T totales, se evaluó la calidad de la separación en función de la presencia de las proteínas CD4 y CD8 en cada subpoblación con los anticuerpos OKT4 y OKT8.

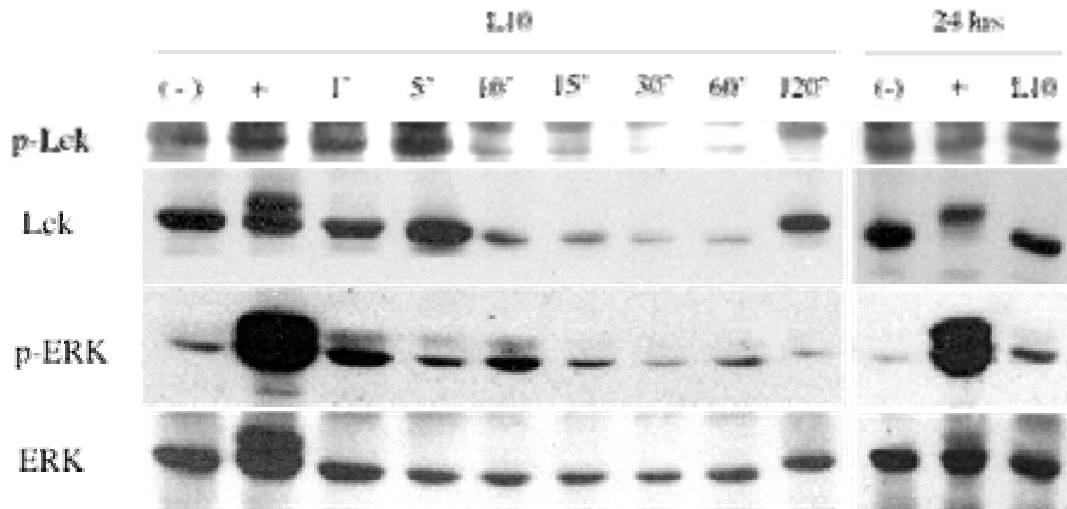
## Figura 2



### Niveles de expresión de CD43 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

Se evaluó, por citometría de flujo el nivel de expresión de CD43 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en reposo ó activados por 24h, utilizando para ello una batería de anticuerpos monoclonales que reconocen distintos epítopes de la molécula. Línea roja: control negativo; línea azul: células no estimuladas; línea verde: células estimuladas con PMA.

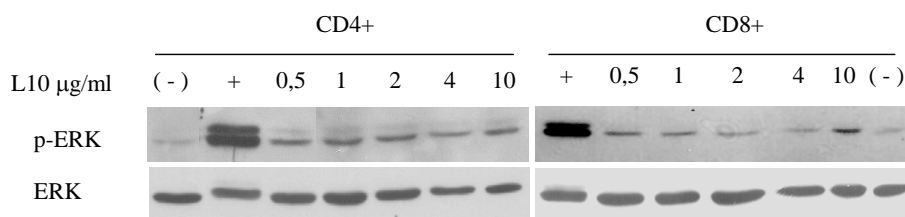
### Figura 3



**En linfocitos T, el entrecruzamiento de CD43 induce la fosforilación en la Y<sup>192</sup> y la S<sup>194</sup> de Lck.**

Linfocitos T purificados fueron estimulados como se describe en "Materiales y Métodos" con L10 por los tiempos indicados. Lisados celulares (1 X 10<sup>6</sup> equivalentes celulares) se resolvieron por SDS-PAGE y electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se evaluaron las intensidades de fosforilación de Lck y ERK por inmunoblot.

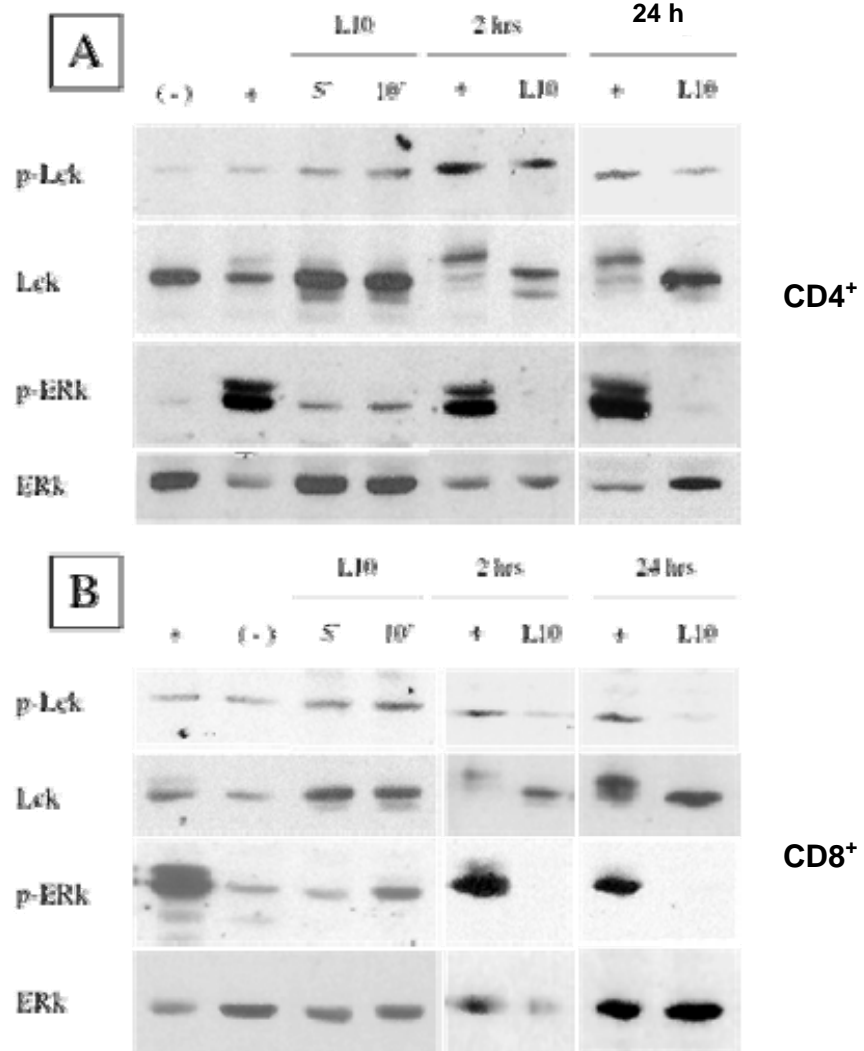
### Figura 4



**CD43 induce la fosforilación de ERK, tanto en linfocitos T CD4<sup>+</sup> como en CD8<sup>+</sup>.**

Linfocitos T CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup> fueron estimuladas a 37° C por 10 min con diferentes concentraciones del anticuerpo L10. Se evaluaron los niveles de fosforilación de ERK por inmunoblot.

Figura 5

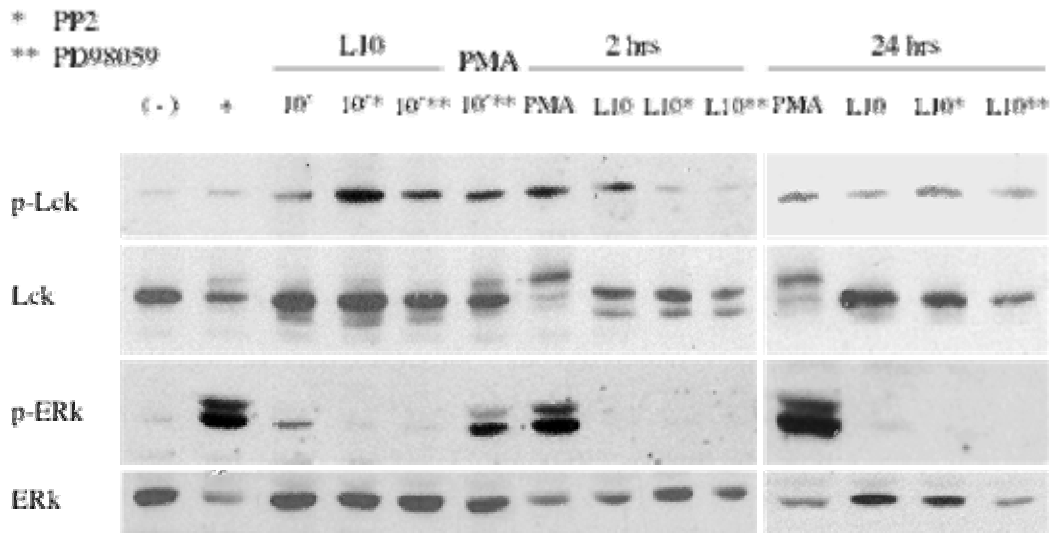


**CD43 induce la fosforilación de Lck en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.**

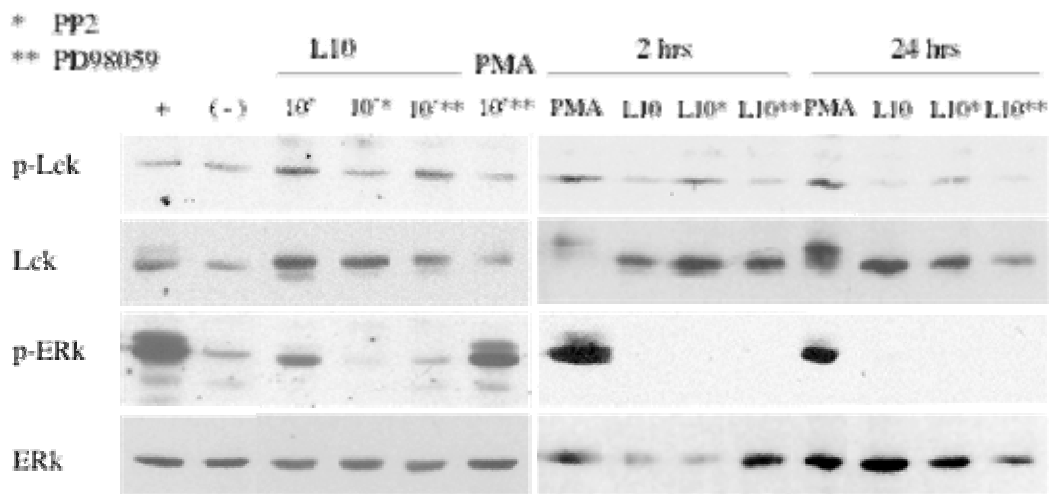
Linfocitos T CD4<sup>+</sup> (panel A) y CD8<sup>+</sup> (panel B) fueron estimulados con L10, por los tiempos indicados. Lisados celulares (1 X 10<sup>6</sup> equivalentes celulares) se resolvieron por SDS-PAGE y electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se evaluaron las intensidades de fosforilación de Lck y ERK por inmunoblot.

Figura 6

**A**



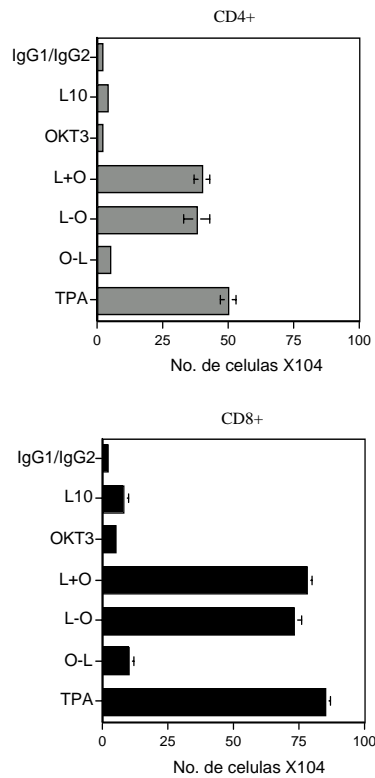
**B**



Los inhibidores de las cinasas de Src y de las cinasas MEK 1/2 afectan la fosforilación de Lck en forma diferente en linfocitos T CD4<sup>+</sup> (A) y CD8<sup>+</sup> (B).

(\* células pretratadas 30 min con el inhibidor de las cinasas de Src PP2; \*\* células pretratadas 30 min con el inhibidor de la cinasa MEK 1/2).

# Figura 7



**Linfocitos T CD8+ proliferan más que linfocitos T CD4+ en respuesta a la estimulación simultánea a través de CD43 y el TCR.**

Linfocitos T CD4<sup>+</sup> ó CD8<sup>+</sup> fueron estimulados por 7 días a través de CD43 (L10), TCR (OKT3), pre-activados a través de CD43 por 2 h y co-activados con el TCR por 7 días (L+O), pre-activados con el TCR por 2 h y co-activadas con CD43 por 7 días (O+L), activados con CD43 y el TCR de manera simultánea (L-O).

**VII**  
**REFERENCIAS**

- Abraham KM, Levin SD, Marth JD, Forbush KA and Perlmutter RM. (1991a). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3977-81.
- Abraham N, Miceli MC, Parnes JR and Veillette A. (1991b). *Nature*, **350**, 62-6.
- Abramson JS and Hudnor HR. (1995). *Blood*, **85**, 1615-9.
- Alvarado M, Klassen C, Cerny J, Horejsi V and Schmidt RE. (1995). *Eur J Immunol*, **25**, 1051-5.
- Allenspach EJ, Cullinan P, Tong J, Tang Q, Tesciuba AG, Cannon JL, Takahashi SM, Morgan R, Burkhardt JK and Sperling AI. (2001). *Immunity*, **15**, 739-50.
- Anderson SJ, Abraham KM, Nakayama T, Singer A and Perlmutter RM. (1992). *Embo J*, **11**, 4877-86.
- Anderson SJ, Levin SD and Perlmutter RM. (1993). *Nature*, **365**, 552-4.
- Anzai N, Gotoh A, Shibayama H and Broxmeyer HE. (1999). *Blood*, **93**, 3317-26.
- Axelsson B, Youseffi-Etemad R, Hammarstrom S and Perlmann P. (1988). *J Immunol*, **141**, 2912-7.
- Bagriacik EU, Tang M, Wang HC and Klein JR. (2001). *Immunol Cell Biol*, **79**, 303-7.
- Barat C and Tremblay MJ. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 28714-24.
- Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K and et al. (1994a). *Cell*, **76**, 597-8.
- Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA and Leffler H. (1994b). *J Biol Chem*, **269**, 20807-10.
- Baum LG, Pang M, Perillo NL, Wu T, Delegeane A, Uittenbogaart CH, Fukuda M and Seilhamer JJ. (1995a). *J Exp Med*, **181**, 877-87.
- Baum LG, Seilhamer JJ, Pang M, Levine WB, Beynon D and Berliner JA. (1995b). *Glycoconj J*, **12**, 63-8.
- Bazil V, Brandt J, Chen S, Roeding M, Luens K, Tsukamoto A and Hoffman R. (1996). *Blood*, **87**, 1272-81.
- Boyum A. (1968). *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, **97**, 77-89.
- Brown TJ, Shuford WW, Wang WC, Nadler SG, Bailey TS, Marquardt H and Mittler RS. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 27686-95.
- Carlsson SR and Fukuda M. (1986). *J Biol Chem*, **261**, 12779-86.
- Caron L, Abraham N, Pawson T and Veillette A. (1992). *Mol Cell Biol*, **12**, 2720-9.
- Cermak L, Simova S, Pintzas A, Horejsi V and Andera L. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 7955-61.
- Conze D, Krahl T, Kennedy N, Weiss L, Lumsden J, Hess P, Flavell RA, Le Gros G, Davis RJ and Rincon M. (2002). *J Exp Med*, **195**, 811-23.
- Couture C, Baier G, Oetken C, Williams S, Telford D, Marie-Cardine A, Baier-Bitterlich G, Fischer S, Burn P, Altman A and et al. (1994). *Mol Cell Biol*, **14**, 5249-58.
- Cruz-Munoz ME, Salas-Vidal E, Salaiza-Suazo N, Becker I, Pedraza-Alva G and Rosenstein Y. (2003). *J Immunol*, **171**, 1901-8.
- Cyster J, Somoza C, Killeen N and Williams AF. (1990). *Eur J Immunol*, **20**, 875-81.
- Del Rio R, Rincon M, Layseca-Espinosa E, Fierro NA, Rosenstein Y and Pedraza-Alva G. (2004). *Biochem Biophys Res Commun*, **325**, 133-43.
- Delon J, Kaibuchi K and Germain RN. (2001). *Immunity*, **15**, 691-701.
- Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M and Davis RJ. (1994). *Cell*, **76**, 1025-37.



- Dong C, Yang DD, Tournier C, Whitmarsh AJ, Xu J, Davis RJ and Flavell RA. (2000). *Nature*, **405**, 91-4.
- Dustin ML and Springer TA. (1988). *J Cell Biol*, **107**, 321-31.
- Fajka-Boja R, Szemes M, Ion G, Legradi A, Caron M and Monostori E. (2002). *Immunol Lett*, **82**, 149-54.
- Ficoll. (1983). *Pharmacia Biotech*.
- Fierro NA, Pedraza-Alva G and Rosenstein Y. (2006). *J Immunol*, **176**, 7346-53.
- Filipp D, Zhang J, Leung BL, Shaw A, Levin SD, Veillette A and Julius M. (2003). *J Exp Med*, **197**, 1221-7.
- Fratazzi C, Manjunath N, Arbeit RD, Carini C, Gerken TA, Ardman B, Remold-O'Donnell E and Remold HG. (2000). *J Exp Med*, **192**, 183-92.
- Fukuda M and Carlsson SR. (1986). *Med Biol*, **64**, 335-43.
- Giordanengo V, Limouse M, Desroys du Roure L, Cottalorda J, Doglio A, Passeron A, Fuzibet JG and Lefebvre JC. (1995). *Blood*, **86**, 2302-11.
- Harty JT and Badovinac VP. (2002). *Curr Opin Immunol*, **14**, 360-5.
- Heissmeyer V, Macian F, Im SH, Varma R, Feske S, Venuprasad K, Gu H, Liu YC, Dustin ML and Rao A. (2004). *Nat Immunol*, **5**, 255-65.
- Hermiston ML, Xu Z and Weiss A. (2003). *Annu Rev Immunol*, **21**, 107-37.
- Hu L, Hatano M, Ruther U and Tokuhsa T. (1996). *J Immunol*, **157**, 3804-11.
- Irby RB, Mao W, Coppola D, Kang J, Loubeau JM, Trudeau W, Karl R, Fujita DJ, Jove R and Yeatman TJ. (1999). *Nat Genet*, **21**, 187-90.
- Janeway CA, Jr. (1992). *Annu Rev Immunol*, **10**, 645-74.
- Jove R and Hanafusa H. (1987). *Annu Rev Cell Biol*, **3**, 31-56.
- Kabouridis PS, Magee AI and Ley SC. (1997). *Embo J*, **16**, 4983-98.
- Kaech SM and Ahmed R. (2001). *Nat Immunol*, **2**, 415-22.
- Kanazawa S, Ilic D, Hashiyama M, Noumura T, Yamamoto T, Suda T and Aizawa S. (1996). *Blood*, **87**, 865-70.
- Kaplan JM, Mardon G, Bishop JM and Varmus HE. (1988). *Mol Cell Biol*, **8**, 2435-41.
- Kishihara K, Penninger J, Wallace VA, Kundig TM, Kawai K, Wakeham A, Timms E, Pfeffer K, Ohashi PS, Thomas ML and et al. (1993). *Cell*, **74**, 143-56.
- Klasen S, Pages F, Peyron JF, Cantrell DA and Olive D. (1998). *Int Immunol*, **10**, 481-9.
- Koegl M, Zlatkine P, Ley SC, Courtneidge SA and Magee AI. (1994). *Biochem J*, **303** (Pt 3), 749-53.
- Koretzky GA, Picus J, Schultz T and Weiss A. (1991). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 2037-41.
- Lanteri M, Giordanengo V, Hiraoka N, Fuzibet JG, Auberger P, Fukuda M, Baum LG and Lefebvre JC. (2003). *Glycobiology*, **13**, 909-18.
- Latour S and Veillette A. (2001). *Curr Opin Immunol*, **13**, 299-306.
- Layseca-Espinosa E, Pedraza-Alva G, Montiel JL, del Rio R, Fierro NA, Gonzalez-Amaro R and Rosenstein Y. (2003). *J Leukoc Biol*, **74**, 1083-93.
- Lee WT, Pasos G, Cecchini L and Mittler JN. (2002). *J Immunol*, **168**, 1682-9.
- Ley SC, Marsh M, Bebbington CR, Proudfoot K and Jordan P. (1994). *J Cell Biol*, **125**, 639-49.
- Manjunath N, Correa M, Ardman M and Ardman B. (1995). *Nature*, **377**, 535-8.
- Manjunath N, Johnson RS, Staunton DE, Pasqualini R and Ardman B. (1993). *J Immunol*, **151**, 1528-34.

- Marth JD, Cooper JA, King CS, Ziegler SF, Tinker DA, Overell RW, Krebs EG and Perlmutter RM. (1988). *Mol Cell Biol*, **8**, 540-50.
- McEvoy LM, Sun H, Frelinger JG and Butcher EC. (1997). *J Exp Med*, **185**, 1493-8.
- Mentzer SJ, Remold-O'Donnell E, Crimmins MA, Bierer BE, Rosen FS and Burakoff SJ. (1987). *J Exp Med*, **165**, 1383-92.
- Miura Y, Mizutani C, Nishihara T, Hishita T, Yanagi S, Tohyama Y, Ichiyama S, Yamamura H, Uchiyama T and Tohyama K. (2001). *Biochem Biophys Res Commun*, **288**, 80-6.
- Mustelin T and Tasken K. (2003). *Biochem J*, **371**, 15-27.
- Nathan C, Xie QW, Halbwachs-Mecarelli L and Jin WW. (1993). *J Cell Biol*, **122**, 243-56.
- O'Garra A. (1998). *Immunity*, **8**, 275-83.
- Onami TM, Harrington LE, Williams MA, Galvan M, Larsen CP, Pearson TC, Manjunath N, Baum LG, Pearce BD and Ahmed R. (2002). *J Immunol*, **168**, 6022-31.
- Ostergaard HL, Shackelford DA, Hurley TR, Johnson P, Hyman R, Sefton BM and Trowbridge IS. (1989). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8959-63.
- Pace KE, Hahn HP, Pang M, Nguyen JT and Baum LG. (2000). *J Immunol*, **165**, 2331-4.
- Palacios EH and Weiss A. (2004). *Oncogene*, **23**, 7990-8000.
- Pallant A, Eskenazi A, Mattei MG, Fournier RE, Carlsson SR, Fukuda M and Frelinger JG. (1989). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 1328-32.
- Park JK, Rosenstein YJ, Remold-O'Donnell E, Bierer BE, Rosen FS and Burakoff SJ. (1991). *Nature*, **350**, 706-9.
- Parkman R, Remold-O'Donnell E, Kenney DM, Perrine S and Rosen FS. (1981). *Lancet*, **2**, 1387-9.
- Pedraza-Alva G, Merida LB, Burakoff SJ and Rosenstein Y. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 27564-8.
- Pedraza-Alva G, Merida LB, Burakoff SJ and Rosenstein Y. (1998). *J Biol Chem*, **273**, 14218-24.
- Pedraza-Alva G, Sawadikosol S, Liu YC, Merida LB, Cruz-Munoz ME, Ocegüera-Yanez F, Burakoff SJ and Rosenstein Y. (2001). *J Biol Chem*, **276**, 729-37.
- Pellman D, Garber EA, Cross FR and Hanafusa H. (1985). *Nature*, **314**, 374-7.
- Remold-O'Donnell E, Kenney D and Rosen FS. (1987a). *Biochemistry*, **26**, 3908-13.
- Remold-O'Donnell E, Zimmerman C, Kenney D and Rosen FS. (1987b). *Blood*, **70**, 104-9.
- Resh MD. (1993). *Biochim Biophys Acta*, **1155**, 307-22.
- Rickles RJ, Botfield MC, Zhou XM, Henry PA, Brugge JS and Zoller MJ. (1995). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10909-13.
- Rincon M and Pedraza-Alva G. (2003). *Immunol Rev*, **192**, 131-42.
- Ronnstrand L, Mori S, Arridsson AK, Eriksson A, Wernstedt C, Hellman U, Claesson-Welsh L and Heldin CH. (1992). *Embo J*, **11**, 3911-9.
- Rosenstein Y, Park JK, Hahn WC, Rosen FS, Bierer BE and Burakoff SJ. (1991). *Nature*, **354**, 233-5.
- Rosenstein Y, Ratnofsky S, Burakoff SJ and Herrmann SH. (1989). *J Exp Med*, **169**, 149-60.
- Rosenstein Y, Santana A and Pedraza-Alva G. (1999). *Immunol Res*, **20**, 89-99.

- Santana MA, Pedraza-Alva G, Olivares-Zavaleta N, Madrid-Marina V, Horejsi V, Burakoff SJ and Rosenstein Y. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 31460-8.
- Schmedt C and Tarakhovsky A. (2001). *J Exp Med*, **193**, 815-26.
- Serrador JM, Nieto M, Alonso-Lebrero JL, del Pozo MA, Calvo J, Furthmayr H, Schwartz-Albiez R, Lozano F, Gonzalez-Amaro R, Sanchez-Mateos P and Sanchez-Madrid F. (1998). *Blood*, **91**, 4632-44.
- Shelley CS, Remold-O'Donnell E, Davis AE, 3rd, Bruns GA, Rosen FS, Carroll MC and Whitehead AS. (1989). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2819-23.
- Sicheri F and Kuriyan J. (1997). *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 777-85.
- Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ and et al. (1993). *Cell*, **72**, 767-78.
- Stefanova I, Hemmer B, Vergelli M, Martin R, Biddison WE and Germain RN. (2003). *Nat Immunol*, **4**, 248-54.
- Stockl J, Majdic O, Kohl P, Pickl WF, Menzel JE and Knapp W. (1996). *J Exp Med*, **184**, 1769-79.
- Stockton BM, Cheng G, Manjunath N, Ardman B and von Andrian UH. (1998). *Immunity*, **8**, 373-81.
- Stone JD, Conroy LA, Byth KF, Hederer RA, Howlett S, Takemoto Y, Holmes N and Alexander DR. (1997). *J Immunol*, **158**, 5773-82.
- Straus DB, Chan AC, Patai B and Weiss A. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 9976-81.
- Swain SL. (1983). *Immunol Rev*, **74**, 129-42.
- Tatosyan AG and Mizenina OA. (2000). *Biochemistry (Mosc)*, **65**, 49-58.
- Thomas ML. (1995). *Semin Immunol*, **7**, 279-88.
- Thomas SM and Brugge JS. (1997). *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 513-609.
- Timson Gauen LK, Linder ME and Shaw AS. (1996). *J Cell Biol*, **133**, 1007-15.
- van Hoek ML, Allen CS and Parsons SJ. (1997). *Biochem J*, **326 ( Pt 1)**, 271-7.
- van Leeuwen JE and Samelson LE. (1999). *Curr Opin Immunol*, **11**, 242-8.
- van Stipdonk MJ, Lemmens EE and Schoenberger SP. (2001). *Nat Immunol*, **2**, 423-9.
- Veillette A, Bookman MA, Horak EM and Bolen JB. (1988). *Cell*, **55**, 301-8.
- Walzel H, Blach M, Hirabayashi J, Kasai KI and Brock J. (2000). *Glycobiology*, **10**, 131-40.
- Walzel H, Schulz U, Neels P and Brock J. (1999). *Immunol Lett*, **67**, 193-202.
- Weiss L, Whitmarsh AJ, Yang DD, Rincon M, Davis RJ and Flavell RA. (2000). *J Exp Med*, **191**, 139-46.
- Wong P and Pamer EG. (2001). *J Immunol*, **166**, 5864-8.
- Wong P and Pamer EG. (2003). *Annu Rev Immunol*, **21**, 29-70.
- Woodman RC, Johnston B, Hickey MJ, Teoh D, Reinhardt P, Poon BY and Kubes P. (1998). *J Exp Med*, **188**, 2181-6.
- Xu H and Littman DR. (1993). *Cell*, **74**, 633-43.
- Xu W, Doshi A, Lei M, Eck MJ and Harrison SC. (1999). *Mol Cell*, **3**, 629-38.
- Zamoyska R, Basson A, Filby A, Legname G, Lovatt M and Seddon B. (2003). *Immunol Rev*, **191**, 107-18.