



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

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

**REGULACIÓN DE LOS GENES DE CITOCINAS,
QUIMIOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO A
TRAVÉS DE LAS SEÑALES DE CD43 Y EL TCR**

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

P R E S E N T A :

**Q.F.B. Monserrat Alba Sandoval
Hernández**

**DIRECTOR DE TESIS: Dra. Yvonne Jane Rosenstein
Azoulay**



CUERNAVACA, MORELOS 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay

COMITÉ TUTORAL

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay

Dr. Ernesto Pérez Rueda

Instituto de Biotecnología-UNAM

Dr. Jesús Martínez Berneche

Instituto Nacional de Salud Pública

JURADO DE EXAMEN

Dr. Lorenzo Segovia Forcella

Presidente

Dra. Leonor Pérez Martínez

Secretario

Dr. José Moreno

Vocal

Dr. Ismael Secundino Velázquez

Suplente

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, máxima casa de estudios, por permitirme integrarme y formarme bajo su sistema de enseñanza.

IBT, por el sistema que me permitió cursar la maestría. Por el acercamiento para con las diferentes líneas de investigación, los académicos que las dirigen, la vinculación que existe entre proyectos, la infraestructura.

A CONACyT por la beca derivada del proyecto 46505-M.

Dirección General de Asuntos del Personal Académico DGAPA por el apoyo de beca derivada del proyecto IN219307.

Banco de Sangre del Hospital Regional, por proveer del material biológico seguro para la realización de los experimentos.

A la Unidad de Docencia, por realizar oportunamente todos los trámites necesarios.

A mi Comité Tutoral, por el interés, la formación, la constancia en el aporte de ideas, sugerencias, correcciones, que en conjunto dieron forma al presente trabajo a lo largo del periodo formativo.

A los Miembros del Jurado de Examen, por su interés, observaciones, sugerencias, la evaluación hacia este trabajo.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	9
FUNCIÓN DE LAS MOLÉCULAS ACCESORIAS: DEFINICIÓN DE LA CALIDAD E INTENSIDAD DE LA RESPUESTA.	9
CD43: UNA MOLÉCULA ACCESORIA QUE PARTICIPA EN LA PERCEPCIÓN DEL ENTORNO CELULAR	17
ESTRUCTURA	17
LIGANDOS	19
FUNCIONES	20
SEÑALES INTRACELULARES GENERADAS EN LINFOCITOS T A TRAVÉS DE CD43	23
ANTECEDENTES	26
EFFECTO DE LA TEMPORALIDAD DE LAS SEÑALES DE CD43 RESPECTO A LAS DEL TCR	26
2. HIPÓTESIS	27
3. OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GENERAL	27
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES	27
4. METODOLOGÍA	28
4.1 ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T	28
4.2 MACROARREGLOS: INCUBACIÓN-REVELADO	28
4.3 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DETECTADOS POR EL MACROARREGLO: BÚSQUEDA DE CO-REGULACIÓN A TRAVÉS DE LA BICLUSTERIZACIÓN	29
4.3.1 BÚSQUEDA DE PATRONES DE EXPRESIÓN: BICLUSTERIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN EXPERIMENTAL	30
<i>4.3.1.1 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS: OBTENCIÓN DE LECTURAS DENSITOMÉTRICAS, PREPROCESAMIENTO, NORMALIZACIÓN</i>	30
A) <i>OBTENCIÓN DE LECTURAS DENSITOMÉTRICAS</i>	30
B) <i>PREPROCESAMIENTO</i>	30
C) <i>NORMALIZACIÓN</i>	31
<i>4.3.1.2 BICLUSTERIZACIÓN DE DATOS EXPERIMENTALES: GENERACIÓN DE AGRUPAMIENTOS JERÁRQUICOS MEDIANTE CLUSTER 3.0</i>	32
4.3.2 BICLUSTERIZACIÓN DE UN SEGUNDO CONJUNTO DE DATOS BIOLÓGICOS: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PREDICHOS.	33
<i>4.3.2.1 ANÁLISIS IN SÍLICO: IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN POSIBLEMENTE RECLUTADOS A LOS PROMOTORES DE LAS 42 PROTEÍNAS DEL ARREGLO</i>	33
A) <i>OBTENCIÓN DE SECUENCIAS PROMOTORAS DE LAS 42 CITOCINAS-QUIMIOquinas-FACTORES DE CRECIMIENTO CONTENIDAS EN EL MACROARREGLO</i>	34

B) ANÁLISIS IN SÍLICO DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN CON PATCH-TRANSFAC	34
C) GENERACIÓN DE TABLA-MATRIZ: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PREDICHOS Y CITOCINAS- QUIMIOCINAS - FACTORES DE CRECIMIENTO	35
4.3.2.2 BICLUSTERIZACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PREDICHOS: ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS	35
A) IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PARA LOS DOS ESTÍMULOS PRINCIPALES: DE ACUERDO A LAS DOS AGRUPACIONES PRINCIPALES DE GENES	35
B) RECONOCIMIENTO DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ESPECÍFICOS PARA CADA ESTÍMULO: SEGREGACIÓN DEL CONJUNTO DE GENES DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO	36
C) RECONOCIMIENTO DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ESPECÍFICOS DE CADA ESTÍMULO A PARTIR DEL TOTAL DE GENES DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO INDUCIDOS	36
5. RESULTADOS	37
1. DINÁMICA DE EXPRESIÓN DE GENES DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO EN LINFOCITOS T ACTIVADOS A TRAVÉS DE CD43 Ó CD43 Y EL TCR VARIANDO EL ORDEN DE LOS ESTÍMULOS.	37
2. BÚSQUEDA DE CO-REGULACIÓN A TRAVÉS DE LA BICLUSTERIZACIÓN: BÚSQUEDA DE PATRONES DE EXPRESIÓN	38
3. BÚSQUEDA DE CO-REGULACIÓN A TRAVÉS DE LA BICLUSTERIZACIÓN DE UN SEGUNDO CONJUNTO DE DATOS BIOLÓGICOS: LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PREDICHOS.	40
<i>FIGURA 5.4. PARTICIPACIÓN DIFERENCIAL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PREDICHOS EN LOS ESTÍMULOS CD43-TCR Y CD43+TCR.</i>	44
6. DISCUSIÓN	54
7. CONCLUSIONES	62
TABLA A4.2 DISTRIBUCIÓN DEL ARREGLO DE DETECCIÓN DE CITOCINAS/ QUIMIOCINAS/ FACTORES DE CRECIMIENTO HUMANOS.	63
8. BIBLIOGRAFIA	64

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ANG	Angiogenina
CPA	Célula presentadora de antígeno
EGF	Facto de crecimiento epidermal
ENA-78 ó CXCL5	quimiocina (motivo C-X-C) ligando 5
GCSF ó CSF3	Factor estimulador de colonias 3 (granulocitos)
GMCSF ó CSF2	Factor estimulador de colonias de Granulocitos y macrófagos
GRO- α , β ó CXCL1, 2	estimulador de crecimiento de melanoma alfa ó quimiocina (motivo C-X-C) ligando 1
I-309 ó CCL1	quimiocina (motivo C-C) ligando 1
IFN- γ	Interferon γ
IGF-1	Factor de crecimiento-Insulina
IL-12	Interleucina 12
IL-15	Interleucina 15
IL-1 α	Interleucina 1 α
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-7	Interleucina 7
IL-8 ó CXCL8	Interleucina 8
LT	Linfocito T
MCP-1 ó CCL2	quimiocina (motivo C-C) ligando 2
MCP-2 ó CCL8	quimiocina (motivo C-C) ligando 8
MCP-3 ó CCL7	quimiocina (motivo C-C) ligando 7
MCSF ó CSF1	Factor estimulador de colonias de macrófafos 1
MDC ó CCL22	quimiocina (motivo C-C) ligando 22
MIG ó CXCL9	quimiocina (miotivo C-X-C) ligando 9
MIP-1 α ó CCL3	quimiocina (motivo C-C) ligando 3
OSM	Oncostatina M
PDGF β	Factor de crecimiento derivado de plaquetas β
RANTES ó CCL5	quimiocina (motivo C-C) ligando 5
SCF ó KITLG	Ligando KIT
SDF-1 ó CXCL12	Factor derivado de células de estoma 1 quimiocina (motivo C-X-C) ligando 12
TARC ó CCL17	quimiocina (motivo C-C) ligando 17
TCR	Receptor del linfocito T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
Th1	Respuesta tipo 1 generada por linfocitos cooperadores
Th2	Respuesta tipo 2 generada por linfocitos cooperadores
THPO	Trombopoyetina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TNF- β	Factor de necrosis tumoral beta ó LT- α Linfotoxina alfa
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

RESUMEN

La molécula accesoria CD43, abundante en la superficie de linfocitos T, genera señales intracelulares a través de su dominio intracelular de manera independiente a la vez que modula las del TCR. Se ha demostrado que la temporalidad con la que participa CD43 con respecto al TCR genera diferencias evidentes en la calidad y tipo de respuesta y que esto depende del establecimiento de un circuito de retroalimentación en el que participan la MAPK ERK y la fosfatasa de tirosinas SHP-1 (Fierro et al. 2006)

En este trabajo, a partir de los datos experimentales reportados por Fierro et al. 2006, y con herramientas bioinformáticas, se elaboró un esbozo de las posibles redes de regulación activadas y sujetas a las señales de CD43. Mediante un análisis *in silico*, se definió el conjunto de factores de transcripción que podrían ser reclutados de manera específica en respuesta a las señales generadas por el estímulo aislado de CD43 así como cuando anteceden o se combinan con las del TCR.

Los resultados mas importantes de este análisis fueron los siguientes:

- 1) Los universos de factores de transcripción predichos cuando las células son estimuladas solo a través de CD43, CD43 previo o al mismo tiempo que el TCR son los mas amplios, y muy redundantes entre ellos, resaltando sin embargo algunos factores de transcripción específicos de cada estimulo.
- 2) El análisis del conjunto de los factores de transcripción predichos en cada condición experimental permite inferir los que podrían reclutarse por el efecto final de las señales dependientes de CD43.
- 3) Las funciones en las que participan los factores de transcripción son muy diversas y cubren básicamente todas las facetas de la vida celular ya que intervienen en desarrollo y diferenciación, respuesta inmunológica, supresión de apoptosis y rearrreglos de la cromatina.
- 4) Entre los factores de transcripción predichos, aquéllos involucrados en modificaciones que favorecen el remodelamiento de la cromatina, sugieren que el papel de las señales de CD43, como el de las señales de CD28, es el de regular la transcripción mediante el remodelamiento de la cromatina.

Estos resultados sientan las bases para estudiar con mayor detalle la participación de CD43 en la regulación de activación celular en distintas condiciones experimentales. así mismo, será importante definir cuales de los factores de transcripción son críticos y cuáles permisivos; cuales funcionan como activadores y cuales de ellos son al contrario, represores; cual es la cinética de reclutamiento, lo mismo que la de sus genes blanco expresados.

1. INTRODUCCIÓN

FUNCIÓN DE LAS MOLÉCULAS ACCESORIAS: DEFINICIÓN DE LA CALIDAD E INTENSIDAD DE LA RESPUESTA.

El sistema inmune genera mecanismos de defensa frente a agentes patógenos involucrando las respuestas inmune innata y adaptativa. Una vez que los patógenos han traspasado el primer nivel de vigilancia constituido por las barreras epiteliales como piel, mucosas, lágrimas y saliva, el segundo nivel de vigilancia, la respuesta innata, entra en acción, con la participación de células cebadas, neutrófilos, macrófagos y células NK. Las acciones concertadas de estas células y de sus productos permiten eliminar parcialmente a los agentes extraños y generar señales que indiquen la presencia de estos últimos, activando la inmunidad adaptativa. En este tercer nivel de vigilancia, se movilizan células especializadas como las células dendríticas, linfocitos T y B. Esta respuesta, a diferencia de la innata, desarrolla especificidad, diversidad y memoria.

Entre las células que forman el enlace entre la respuesta inmune innata y adaptativa se encuentran las células presentadoras de antígeno (CPA) entre las cuales figuran células dendríticas, macrófagos y linfocitos B; y las células responsables del reconocimiento específico del antígeno: los linfocitos B y T. La fase inicial de reconocimiento involucra la internalización del agente patógeno, procesamiento y presentación de los péptidos antigénicos que serán expuestos como complejos [MHC-péptido] para ser reconocidos por linfocitos T. Las células T y B vírgenes circulantes, cuyos receptores no han tenido contacto previo con tales antígenos, son activadas una vez que su receptor, TCR, reconoce el complejo [MHC-péptido] presentado por las CPA (Janeway et al., 2001).

En los linfocitos T, el receptor para el antígeno (TCR) es un complejo multimolecular que consta de una unidad de reconocimiento (cadenas α y β) asociada a un complejo de señalización CD3 formado por dos cadenas ϵ , una δ , dos γ y dos ζ . En conjunto el complejo CD3 tiene 10 motivos de

activación de tirosinas asociado al inmuno-receptor (ITAM). Una vez que la unidad de reconocimiento ha establecido contacto con el complejo [MHC-péptido] expuesto en la CPA, el complejo CD3 genera una serie de señales en el interior de la célula.

A pesar de que el reconocimiento del antígeno es el detonador, las señales intracelulares generadas por el receptor para el antígeno resultan insuficientes para la activación adecuada de los linfocitos T requiriéndose además la participación de moléculas co-receptoras, accesorias, y de adhesión cuyas señales en conjunto modulan positiva o negativamente las del receptor para el antígeno. La ausencia del estímulo proporcionado por las moléculas coestimuladoras, conduce a un estado de anergia. En este estado, la célula, a pesar de haber reconocido específicamente al antígeno, y de haber generado ciertas señales intracelulares, no es capaz de rebasar el umbral necesario para una activación completa y productiva, la cual requiere de diferenciación, proliferación, y adquisición de funciones efectoras. Incluso, estas señales incompletas pueden llevar a la anergia y muerte por apoptosis (Dure and Macian, 2008).

La interacción de las moléculas co-estimuladoras con sus contra-receptores en la superficie de la misma célula en la que el receptor para el antígeno reconoce a su antígeno, estabiliza la unión entre linfocitos T y CPA y genera señales intracelulares que regulan positiva o negativamente las del receptor para el antígeno (Figura 1). De esta manera, la activación y diferenciación de la célula se ven influenciadas por el microambiente generado por las señales del receptor del antígeno, de las moléculas de adhesión (LFA-1-ICAM), de los coestimuladores (CD28, CD43), señales adicionales como las generadas por CD2, y por las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, factores solubles producidos por el conjunto de células participantes (Kaiko et al., 2008).

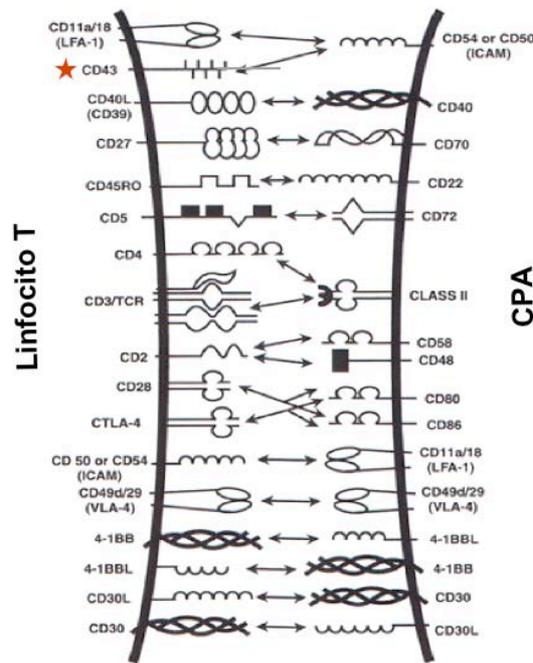


FIGURA 1. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN, ACCESORIAS, COESTIMULADORAS Y CO-RECEPTORES EXPRESADOS EN LA SUPERFICIE DE LOS LINFOCITOS. Su interacción con los contra-receptores presentes en la célula presentadora de antígeno (CPA).

La combinación de las señales del receptor para el antígeno y las del conjunto de moléculas accesorias define el nivel y la calidad de la activación que se llevará a cabo en la célula. Son múltiples los eventos resultantes de estas señales, y abarcan desde cambios en el citoesqueleto que regulan funciones como migración, adhesión, liberación de gránulos citotóxicos, hasta la regulación de la expresión génica a través de la activación controlada de factores de transcripción que se unen de manera específica a los elementos *cis* del ADN.

Las solas señales del TCR no bastan para que se produzca suficiente IL-2, la cual funciona de manera autócrina y parácrina como factor de crecimiento y como inductor de la proliferación. Cuando las señales proporcionadas por moléculas accesorias como CD28 (Diehn et al., 2002; Fierro et al., 2006; Murayama et al., 2006; Northrop et al., 2006; Santana et al., 2000; Thomas et al., 2005), CD4 (Bierer et al., 1989; Sleckman et al., 1988), CD2 (Hahn et al., 1992), CD8 (Rosenstein et al., 1989) y CD43 (Rosenstein et al., 1991) se suman a las del TCR, se produce IL-2 y los linfocitos proliferan y se diferencian.

Las señales activadas por CD28, inducen un estado transcripcionalmente activo de la cromatina en la región promotora del gen de IL-2, el cual se caracteriza por la acetilación de histonas y la desmetilación de elementos reguladores específicos, (Murayama et al., 2006; Northrop et al., 2006; Thomas et al., 2005). Así, dependiendo de la combinación particular de las moléculas accesorias en un momento y en un compartimiento dados, las moléculas accesorias preparan a la célula a responder de una manera específica, en un contexto celular y ambiental extracelular. Una vez activados, los linfocitos se convierten en células efectoras capaces de proliferar, con expansión de las clonas, cada una específica para un epítipo en particular.

La agrupación de genes de citocinas en loci específicos favorece una pronta y eficiente respuesta celular a un estímulo. Al estar contiguos en el mismo cromosoma, constituyendo un locus definido, los genes se comportan de manera semejante ante un mismo estímulo. Ejemplo de ello es el "locus de citocinas Th2". Este locus, conformado por los genes de las interleucinas IL-5, IL-4 e IL-13, está organizado en una región de 140 kb en el cromosoma 5q en el humano, conservándose esta disposición en el ratón, en el cromosoma 11. Entre otros loci descritos para citocinas, se encuentra el de la interleucina 2 (IL-2), ubicado en el cromosoma 4; interferon gamma (IFN- γ), en el cromosoma 12; y TNF (LT- β , TNF- α y LT- α), en el cromosoma 6 (Fields et al., 2004; Kaneko et al., 2007; Kim et al., 2007; Lee et al., 2006; Santangelo et al., 2002; Spilianakis and Flavell, 2004, 2007; Tsytsykova et al., 2007). Cada uno de estos loci está coordinado por los diferentes elementos reguladores en el ADN, tales como los promotores proximales de cada uno de los genes incluidos en el locus, así como también los enhancers y las regiones controladoras de locus (LCR). El LCR del locus Th2 se ubica en la región intrónica 3' del gen constitutivo RAD50, río arriba de los genes de IL-4 e IL-13, y en dirección contraria a IL-5. Las señales de activación generadas a través de CD28, así como por factores de crecimiento expresados tempranamente y con efecto autócrino, como ocurre con IL-2, promueven un estado activo de la cromatina de este LCR. Consecuentemente, esto induce el establecimiento de interacciones

intracromosomales entre los genes de este locus, promoviendo la respuesta Th2 (Lee et al., 2006; Spilianakis and Flavell, 2004).

Un linfocito T activado, no diferenciado aún (Th0), es capaz de responder rápidamente expresando citocinas características tanto tipo Th1 (IFN- γ) como Th2 (IL-4). Esta capacidad de respuesta rápida se explica a través de las interacciones intercromosomales establecidas entre el gen del IFN- γ y la región controladora del locus de citocinas tipo Th2 en el núcleo de linfocitos T vírgenes lo que les permite responder rápidamente a las señales de activación, expresando las proteínas codificadas por ambos loci, pero solo en niveles bajos (Spilianakis et al., 2005).

La presencia de ciertos factores solubles polarizantes en el microambiente controla el encendido de loci específicos (Kaiko et al., 2008; Macian, 2005), contribuyendo al direccionamiento de la *diferenciación* de los linfocitos T efectores hacia los tipos principales Th1, Th2, Th17 y Treg, cada uno de los cuales tiene un fenotipo, una firma de citocinas y funciones específicos. Como se describe en la figura 2, las células Th1 secretan principalmente IFN- γ y factor de necrosis tumoral beta (TNF- β ó linfoxina alfa), protegiendo contra infecciones intracelulares causadas por bacterias, virus y microorganismos que crecen en macrófagos, así como en la eliminación de células cancerosas y TNF alfa (TNF- α) (Spilianakis and Flavell, 2007). Las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13, teniendo como blanco la eliminación de parásitos extracelulares así como la producción de IgE. Mediante la IL-4, los linfocitos Th2 activan a los linfocitos B para producir IgE. La IL-5 induce eosinofilia, en tanto que la IL-13 e IL-4 estimulan la proliferación de células cebadas y su degranulación. Las células Th17, las cuales secretan IL-17, IL-17F, IL-6, IL-22 y factor de necrosis TNF- α con un papel integral tanto en la inflamación como en la activación de neutrófilos, combaten bacterias extracelulares. Por otro lado, las células T reguladoras (Treg) producen IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), los cuales modulan la actividad de las células regulando negativamente algunas de sus funciones, inducen la tolerancia.

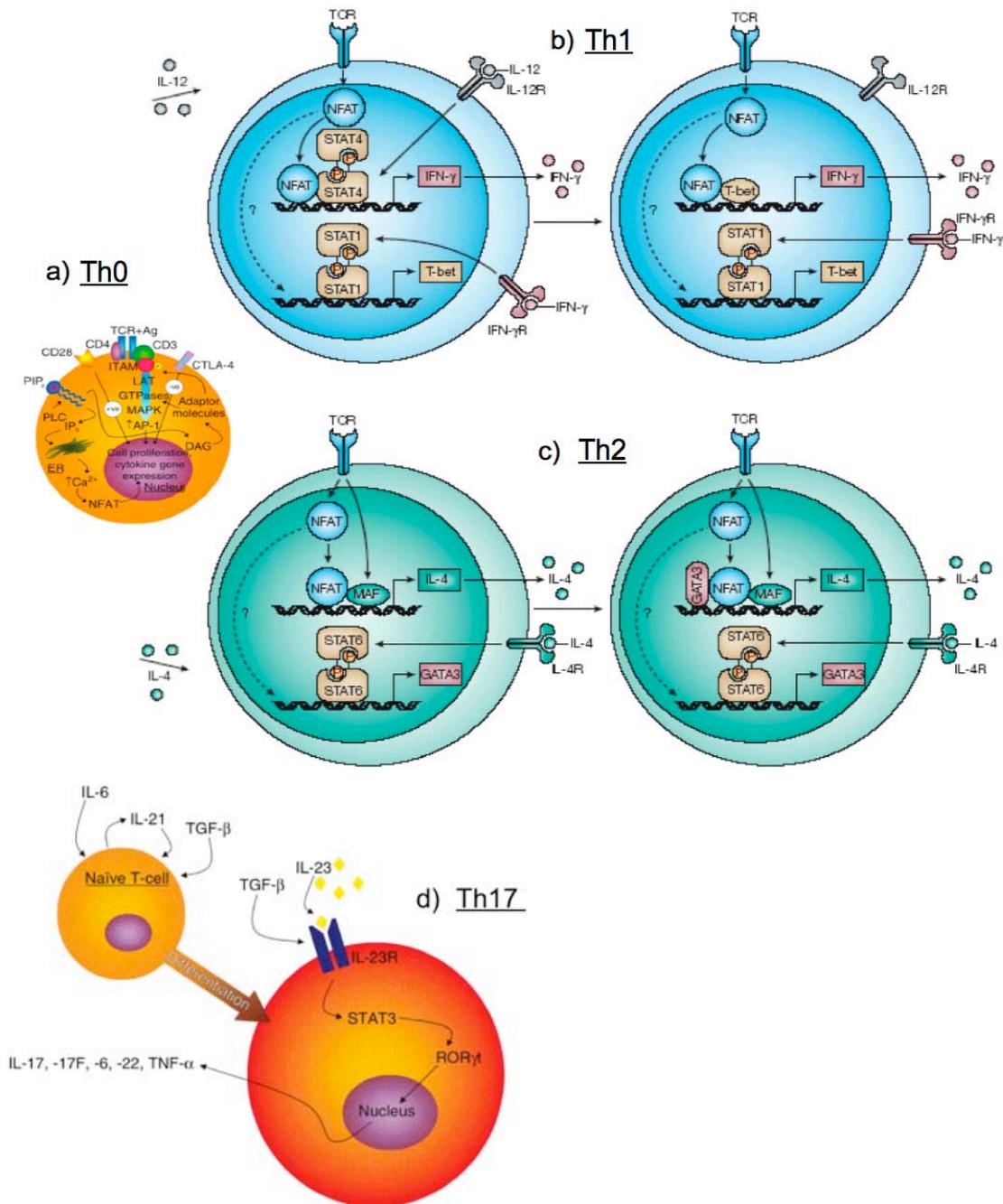


FIGURA 2. DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS T. La respuesta Th1, se ve favorecida con la interleucina 12 (IL-12) e interferones de tipo 1 (IFN- α y β) expresados a partir de macrófagos y células dendríticas tras su activación por patógenos intracelulares. En linfocitos T, la señalización de la interleucina 12 (IL-12) a través de su receptor (IL-12R) activará el factor de transcripción STAT4, que junto con el factor de transcripción NFAT, inducido por las señales del TCR y coestimuladores, cooperarán en la producción de interferon gamma (IFN- γ). Posteriormente, la señalización del IFN- γ a través de su receptor (IFN- γ R) induce la activación del factor de transcripción STAT1 vía JAK1 y 2. La traslocación de STAT1 al núcleo induce la expresión del factor de transcripción T-bet. T-bet induce el remodelamiento del locus del gen de IFN- γ y su expresión, y la expresión

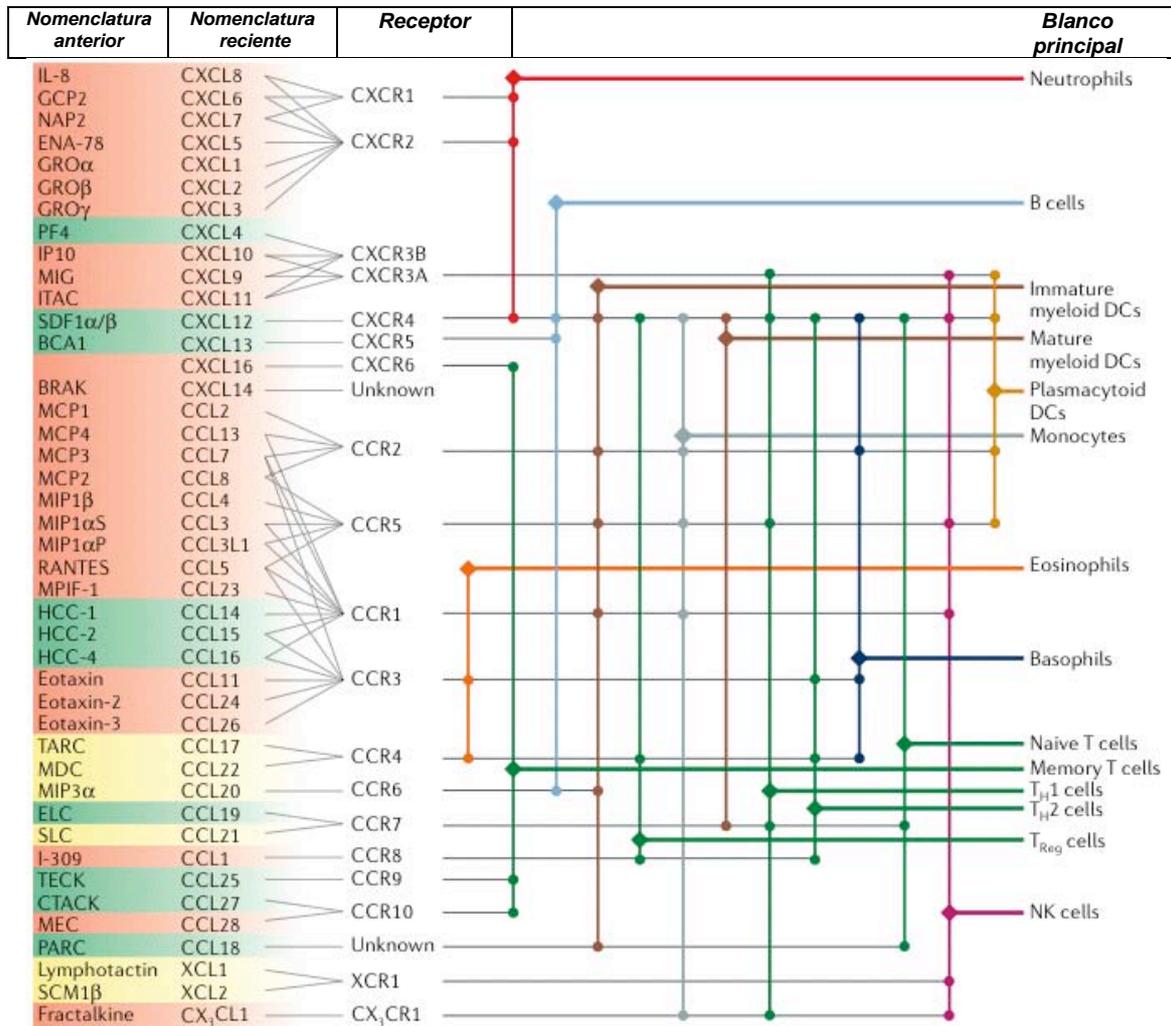
del receptor de IL-12. Este último, refuerza la diferenciación Th1, ya que su señalización activa los factores de transcripción STAT3, STAT4 y NFkappaB para producir las citocinas comprometidas con el fenotipo Th1 y remodelamiento de la cromatina. Más tarde, la activación y acceso de NFAT a sus blancos amplifica la respuesta.

En el caso de la respuesta Th2, esta se ve favorecida por los factores de transcripción MAF y NFAT, los cuales inducen la expresión de interleucina 4 (IL-4). La señalización generada por la asociación de IL-4 con su receptor (IL-4R) genera la activación de STAT6, el cual promueve la expresión del factor de transcripción GATA-binding protein 3 (GATA3). GATA3 produce el remodelamiento del locus Th2, y es el principal factor controlador de la diferenciación TH2, que resulta en la producción de las citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IL-9 y IL-10. En el segundo paso, las proteínas NFAT cooperan con T-bet en las células Th1, y GATA3 en las Th2 para mantener la diferenciación a través de la inducción de IFN- γ e IL-4, respectivamente. De esta forma, un loop de autorregulación positiva asegura la expresión de T-bet y GATA3. T-bet y GATA3 son factores de transcripción antagonistas. T-bet es reprimido cuando GATA3 está incrementado así como la IL-4. En contraparte, GATA3 es inhibido cuando T-bet está incrementado, junto con IFN- γ e IL12. Otro factor de transcripción Th2 linaje-específico, es c-Maf, el cual regula la activación del promotor de IL-4. Como resultado de estas señales, la participación de los factores de transcripción no linaje específicos, AP1 y NFAT, induce una aguda transcripción de IL-4. Así mismo, en etapas tempranas, la alta producción de IL-4 induce la síntesis de IL-6 a través de la inhibición de STAT1 previniéndose la producción de IFN- γ , modificado de (Kaiko et al., 2008; Macian, 2005).

Además de las citocinas, las quimiocinas, proteínas pequeñas que secretadas, actúan principalmente como quimioattractantes, regulan la angiogénesis y la fibrosis, la proliferación y la susceptibilidad a la apoptosis (Colobran et al., 2007). En el cuadro 1 se señalan las quimiocinas clasificadas de acuerdo con la condición en la que se producen: en verde, las homeostáticas, en rojo, las inflamatorias y en amarillo, aquellas con doble función, también se muestran sus blancos principales.

CUADRO 1. QUIMIOCINAS HUMANAS. CLASIFICACIÓN Y BLANCOS PRINCIPALES.

Tomado de (Mantovani et al., 2006).



De acuerdo al número y posición de residuos de cisteínas, como características estructurales, a las quimiocinas se les clasifica en dos subfamilias mayores (CXC y CC) y dos menores (C y CXC₃). Aunque también pueden clasificarse de acuerdo a las condiciones en las que se producen, como homeostáticas, debido a su expresión constitutiva y como inflamatorias, dada su producción por un estímulo inmune (Colobran et al., 2007; Mantovani et al., 2006; Nomiyama et al., 2001).

De acuerdo a su localización genómica, se reconoce la agrupación de las quimiocinas en dos clusters principales: el cluster CXC (GRO α , GRO β , GRO γ , ENA-78, IL-8, Mig, SDF-1), localizado en el cromosoma 4q12–21, y el cluster CC (MCP-1, -2, -3 y -4) en el cromosoma 17q11.2 (Colobran et al., 2007) (Figura 3).

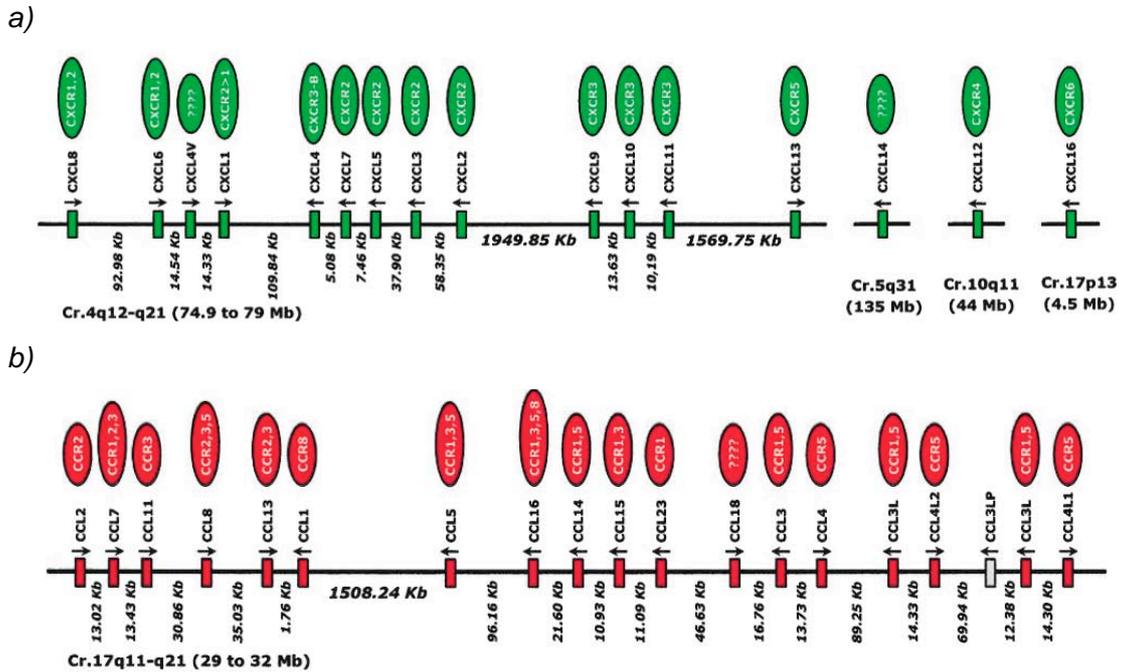


FIGURA 3. ORGANIZACIÓN GENÓMICA DE QUIMIOCINAS: a) CXC, cromosoma 4 y b) CC, cromosoma 17 tomado de (Colobran et al., 2007).

CD43: UNA MOLÉCULA ACCESORIA QUE PARTICIPA EN LA PERCEPCIÓN DEL ENTORNO CELULAR

ESTRUCTURA

CD43, también conocida como sialoforina, leucosialina o gp115, es una proteína transmembranal expresada de manera abundante (1.5×10^5 moléculas/célula) en las células hematopoyéticas de la serie linfóide y mieloide (exceptuando los eritrocitos) (Mentzer et al., 1987; Pallant et al., 1989; Remold-O'Donnell et al., 1984; Remold-O'Donnell et al., 1987). La expresión de CD43, inicialmente descrita para el sistema inmune, ocurre de manera normal en otros tejidos como el cerebro (Losy et al., 1989), en enterocitos diferenciados in vitro (Amano et al., 2001), así como durante la implantación del blastocisto, junto con otras moléculas (CD44, ICAM-1 e ICAM-2) (Matsumoto et al., 2004). Adicionalmente, se ha reportado su expresión en tumores no hematopoyéticos como adenomas y carcinomas de colon (Amano et al., 2001; Baekstrom et al.,

1995; Chorvath et al., 1992; Fernandez-Rodriguez et al., 2002; Sikut et al., 1999). CD43 es una proteína a la que se han atribuido múltiples funciones, antagonistas en algunos casos tales como: la adhesión/antiadhesión, la locomoción, la diferenciación, la proliferación/apoptosis y la activación celular (revisado en Aguilar-Delfin et al., 2006).

Su dominio extracelular está constituido por 235 aminoácidos, el transmembranal por 23 y el dominio intracitoplásmico de 123 aminoácidos. El dominio extracelular contiene un 39 % de residuos de serina y treonina, muchos de los cuales se encuentran O-glicosilados por ácido siálico, galactosa, N-acetil-glucosamina y N-acetil-galactosamina principalmente (Fukuda et al., 1986). Este dominio extracelular se extiende, sin plegamiento, hasta 45 nm de la superficie celular, caracterizando a CD43 como una de las glicoproteínas de membrana más largas (Cyster et al., 1991). Las diferencias en el patrón postranscripcional de O-glicosilación (Piller et al., 1988) originan dos glicoisofomas de 115 y 130 kDa de masa relativa (Mr), encontrándose la primera mayormente en timocitos, linfocitos T CD4⁺ y monocitos; y la segunda en linfocitos T CD4⁺ activados, linfocitos T CD8⁺ activados y no activados, neutrófilos, plaquetas y células B maduras (Carlsson et al., 1986; Remold-O'Donnell et al., 1987). Por sus características de glicosilación, estructura alargada y rígida y presencia de varios repetidos en la región extracelular, hoy día se considera que CD43 pertenece a la familia de las mucinas (Varki et al., 2008).

El dominio citoplásmico está altamente conservado entre especies (70%) es extremadamente elongado y permanece como monómero (Takai et al., 2008). Posee una región rica en prolina, dos dominios de unión a proteínas ERM (ezrina, radixina, moesina), y múltiples residuos de serinas y treoninas potencialmente fosforilables, que en conjunto, son necesarios para la activación de señales intracelulares (Pedraza-Alva et al., 1996; Serrador et al., 1998; Wong et al., 1990; Yonemura et al., 1998). La asociación entre el dominio FERM de las ERM permite que CD43 interactúe con la pequeña GTPasa Rho (Takai et al., 2008), lo cual favorece la redistribución de CD43 fuera de la

sinapsis inmunológica (Allenspach et al., 2001; Delon et al., 2001; Savage et al., 2002), formando agregados (Takai et al., 2008).

En una línea de carcinoma de colón se ha descrito que el dominio yuxtamembranal de CD43 que reconoce al dominio FERM (N-terminal) de la proteínas ERM se traslapa con una secuencia de reconocimiento nuclear (NLS). La proteólisis de la región citoplásmica favorece la traslocación a núcleo de la NLS, y su interacción con β -catenina, lo cual resulta en la activación de los genes *c-Myc* y *Cyclin D1* (Andersson et al., 2004).

LIGANDOS

CD43 es una molécula muy promiscua, con múltiples ligandos: ICAM-1 (Rosenstein et al., 1991), MHC-I (Stockl et al., 1996), galectina-1 (Perillo et al., 1995), seroalbumina (Nathan et al., 1993), Siglec-1 (van den Berg et al., 2001), E-selectina (Fuhlbrigge et al., 2006; Matsumoto et al., 2005) y nucleolina (Hirano et al., 2005).

La información acerca de las funciones reguladas a través de la interacción de CD43 con cada uno de sus ligandos es muy escasa o nula. Se piensa que la interacción de ICAM-1 con CD43 puede regular la adhesión entre la célula T y la CPA a través de integrinas. Galectina-1 es abundante en la superficie de células tímicas, y a partir de esta interacción se ha propuesto la participación de CD43 en la selección negativa de timocitos (Brown et al., 1996). A través del análisis de adhesión espontánea entre células T y CPA, se encontró que CD43 es capaz de interactuar también con moléculas de MHC-I (Stockl et al., 1996). En neutrófilos, se ha reportado que CD43 es capaz de interactuar con albúmina sérica humana (HSA). Es importante resaltar que todos estos ligandos, son también ligandos de otras moléculas de la superficie de células linfoides. Así, tenemos por ejemplo que CD8 interactúa también con MHC-I (Blue et al., 1988; Parnes, 1989; Rosenstein et al., 1989), LFA-1 con ICAM-1 (Dustin and Springer, 1988), galectina con CD45 (Baum et al., 1995). Esto sugiere que CD43 podría regular las funciones de otras moléculas accesorias. Además, no se sabe si cada una de estas moléculas interactúa con las diferentes isoformas de CD43, independientemente del tipo celular.

Por otra parte, CD43 participa de manera aún poco entendida en diversas patologías. Se ha demostrado que, *Mycobacterium tuberculosis* (Fratuzzi et al., 2000) así como la transialidasa de *Trypanosoma cruzi* (Todeschini et al., 2002) y la hemaglutinina A del virus de la influenza (Abramson and Hudnor, 1995; Hartshorn et al., 1995) interactúan con CD43. Así mismo, pacientes infectados con VIH presentan anticuerpos circulantes contra una forma hiposialilada de CD43 (Ardman et al., 1990), y las señales de CD43 incrementan la transcripción de los genes VIH y la producción del virus en linfocitos T CD4 (Barat and Tremblay, 2002). Se desconoce si estos anticuerpos anti-CD43 circulantes puedan actuar como ligandos de CD43.

En conjunto, la multiplicidad y variedad de proteínas con las que CD43 interacciona sugieren que esta glicoproteína participa en diversas facetas de la vida de una célula. La falta de información de las funciones que pudiera desempeñar al interactuar con cada uno de sus contrarreceptores es provocativa e incita a adentrarnos en este complejo mundo.

FUNCIONES

Las funciones de CD43 parecen ser múltiples e incluso opuestas. Debido al hecho que esta molécula ha sido estudiada principalmente en células linfoides, la información que se conoce acerca de sus funciones se refiere esencialmente en estas células. En células no linfoides, normales o tumorales poco se ha dicho acerca de las funciones de esta molécula.

Siendo una mucina, CD43 regula las interacciones célula-célula, tanto positiva como negativamente. Los resultados obtenidos con células transfectadas con el gen humano de CD43 o células deficientes en la expresión de CD43 (CD43^{-/-}) indican que la carga negativa conferida por el alto contenido en ácido siálico contribuye a interferir con la adhesión de linfocitos T con células blanco o células presentadoras de antígeno (Manjunath et al., 1995; Manjunath et al., 1993). Sin embargo, el alto contenido de carbohidratos de CD43 además de conferir una carga negativa, anti-adhesiva, favorece la interacción con ligandos diversos y constituye un factor decisivo en la especificidad de las señales generadas a través de esta molécula así como

en la comunicación célula-célula. Los experimentos realizados en ratones CD43^{-/-} sugieren que CD43 modula la migración de los linfocitos a los órganos linfoides secundarios y a los tejidos (Stockton et al., 1998; Woodman et al., 1998). Estos animales desarrollan infiltrados leucocitarios de menor tamaño en las lesiones ateroscleróticas. De hecho, recientemente se reportó que CD43, en colaboración con PSGL-1, modula la migración de linfocitos T hacia la piel inflamada, un proceso que depende de P-y E-selectina (Matsumoto et al., 2007). En neutrófilos, CD43 puede funcionar como una molécula antiadhesiva que atenúa las interacciones neutrófilo-endotelio, pero que puede funcionar como una molécula pro-adhesiva, cuando las células endoteliales expresan E-selectina, la cual es un ligando de CD43 (Matsumoto et al., 2008).

Numerosos reportes asocian a CD43 a distintas patologías. La carencia de CD43 conduce a un retraso de la contracción de la población de linfocitos CD8⁺ citotóxicos específicos después de un reto viral (Onami et al., 2002), lo cual altera la homeostasis de la respuesta inmune y podría conducir a padecimientos autoinmunes. En este sentido, se ha reportado que un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD43 retarda significativamente el establecimiento de diabetes e inhibe específicamente el reclutamiento de linfocitos T a los islotes del páncreas, así como a las glándulas salivales y lacrimales, bloqueando los procesos inflamatorios (Johnson et al., 1999). Datos preliminares de nuestro laboratorio, sugieren que en el suero de pacientes con artritis reumatoide hay niveles aumentados de CD43 soluble comparando con individuos sanos (Montiel JL, sometido). En la fase asintomática, todos los pacientes con SIDA tienen autoanticuerpos que reconocen una forma hiposialilada de CD43 (Ardman et al., 1990; Giordanengo et al., 1995), y las señales de CD43 asociadas con las del TCR potencian la transcripción y replicación de HIV, por una vía de señalización independiente de CD28 (Barat and Tremblay, 2002). Recientemente se ha reportado que CD43, junto con CD11b, CD45 y CD50 no sólo sirven de ligandos para las adhesinas de *Streptococcus gordinii*, (el principal agente etiológico de endocarditis infecciosa (Urano-Tashiro et al., 2008) sino que

probablemente participan en la generación de las primeras señales de activación de los polimorfonucleares (PMN) en respuesta a estas bacterias (Ruhl et al., 2000). En las mismas células, CD43 es también un ligando del virus de la influenza A; interesantemente, las señales intracelulares que se producen cuando los PMN son expuestos al virus inactivan a las células (Abramson and Hudnor, 1995). CD43 es también un ligando de la *trans*-sialidasa de *Trypanosoma Cruzi*; aún en ausencia de actividad catalítica, esta enzima es capaz de activar linfocitos CD4⁺, aparentemente a través de CD43, semejando la activación por lectinas (Todeschini et al., 2002).

En linfocitos B, la expresión de CD43 es muy regulada, y parece participar en el desarrollo y/o activación de estas células. En un modelo murino, la sobre-expresión de CD43 en linfocitos B induce una inmunodeficiencia humoral y prolonga la supervivencia de linfocitos B (Misawa et al., 1996; Ostberg et al., 1996). La expresión anormal de CD43 podría desencadenar una reacción de autoinmunidad así como favorecer la progresión de células B pre-malignas hacia un estado totalmente transformado. De hecho, la expresión de CD43 se considera como un marcador de tumores derivados de células linfoides, particularmente de linfomas. Esta molécula considerada como restringida a células del sistema linfóide, también se expresa en otros tejidos, particularmente en el epitelio intestinal, así como en diversos tumores de origen epitelial (mama, estómago, colon, pulmón, tiroides) (Santamaria et al., 1996).

Esta información en conjunto sugiere que CD43 representa un blanco terapéutico, sin embargo, las funciones que desempeña CD43 deben de ser estudiadas con mayor detalle.

SEÑALES INTRACELULARES GENERADAS EN LINFOCITOS T A TRAVÉS DE CD43

Para desempeñar sus funciones, CD43 requiere de la región citoplásmica. Más aún, las señales de CD43 parecen ser capaces de suplir las de CD28 en el ratón CD28^{-/-} (Sperling et al., 1995). Como ya se mencionó anteriormente la multiplicidad de ligandos de CD43 lleva a proponer, que al interactuar con cada uno de ellos, esta molécula genera señales distintas que se traducen en diferentes funciones efectoras a nivel de la célula. Esta posibilidad se ve fortalecida por el hecho de que distintos anticuerpos anti-CD43 que reconocen diferentes epítopes de la molécula de CD43 inducen señales intracelulares ligeramente distintas que podrían conducir a distintas funciones efectoras (Rosenstein Y, datos no publicados).

El solo entrecruzamiento de CD43 en la superficie de linfocitos T, sin la participación de moléculas adicionales, genera múltiples señales intracelulares. Uno de los eventos más tempranos en respuesta a esta estimulación, es la activación de las PTK de la familia Src: Lck y Fyn, probablemente originada mediante la asociación de un dominio rico en prolinas presente en la región carboxiterminal de CD43 con el dominio SH3 de cada PTK. Activadas Lck y Fyn, pueden fosforilar las tirosinas de los ITAM de las cadenas ξ , las cuales sirven de anclaje para los dominios SH2 de la PTK ZAP70. ZAP70 activada, fosforila entre otros a LAT, una proteína citoplásmica que funciona como adaptadora y promotora de un gran complejo de proteínas necesario para la propagación de la señal río abajo (Cruz-Munoz et al., 2003; del Rio et al., 2004; Pedraza-Alva et al., 1996, 1998; Pedraza-Alva et al., 2001).

Los residuos de tirosina fosforilados de LAT sirven de punto de anclaje para diversas moléculas: la molécula adaptadora Grb2, las fosfolipasas C- γ 1/2, así como para la subunidad p85 de la fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K). La proteína Grb2 atrae este complejo macromolecular a la molécula SLP-76 una molécula adaptadora que se asocia con Vav (un intercambiador de nucleótidos de guanina, que activa a la proteína GTPasa Rac, la cual participa en rearrreglos de citoesqueleto. La formación de este complejo macromolecular conlleva a la activación de tres vías de señalización principales: la vía de PI3K, de PLC- γ 1, y

de las Ras-MAPK (mitogen-activated protein kinases) (Pedraza-Alva et al., 1998; Pedraza-Alva et al., 2001).

La vía de PI3K, está asociada a cambios en citoesqueleto en respuesta a las señales de CD43 (Layseca-Espinosa et al., 2003), e importantemente en la activación de la cinasa de serina/treonina PKB o AKT que participa en la regulación de señales de sobrevivencia/entrada a ciclo celular ().

La activación de PLC- γ a través de las PTKs reclutadas y activadas por CD43, genera la hidrólisis del fosfolípido de membrana fosfatidil-inositol-bi-fosfato (PIP₂), produciendo inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) (Layseca-Espinosa et al., 2003). El IP₃ induce la liberación de calcio de los depósitos intracelulares y con ello el aumento de Ca²⁺ intracelular, mientras que DAG favorece la traslocación del citoplasma a membrana plasmática a la proteína cinasa C θ (PKC θ), que fosforila residuos de serina de diversas proteínas intracelulares. Por un lado, la calmodulina, que interacciona con el Ca²⁺ intracelular liberado activa a calcineurina, una fosfatasa de tirosinas. A su vez, calcineurina descubre un sitio de localización nuclear en NF-AT al defosforilar una tirosina, permitiendo la traslocación de este factor de transcripción al núcleo, y su unión a secuencias específicas en la región promotora del gen de IL-2 (del Rio et al., 2004; Santana et al., 2000).

Por otra parte, las señales de CD43 activan, en linfocitos T, las vías de las MAPK cinasas ERK como JNK y p38, probablemente a través de VAV, incidiendo directamente en la activación de diversos factores transcripcionales. (Pedraza-Alva et al., 1996, 1998; Santana et al., 2000). El factor de transcripción AP-1 engloba a una familia de moléculas de unión a ADN que funcionan como dímeros constituidos por proteínas que se unen entre sí a través de una estructura de "cierres de leucina". Los miembros mejor caracterizados de esta familia son las proteínas Fos y Jun. La activación de AP-1 requiere de la síntesis de novo de Fos y de la activación de Jun en el núcleo. La transcripción de Fos depende de la vía de ERK (extracellular signal-regulated kinase) y de PKC, en tanto que la activación de Jun depende de JNK. La formación del dímero AP-1 constituye entonces un punto de convergencia de varias vías de señalización.

A su vez, la cinasa PKC, activada por el entrecruzamiento con CD43, conduce a la activación de la cinasa de I κ B, que posteriormente fosforila a I κ B en residuos en serina, señalándolo para ser ubiquitinado, y degradado. Lo anterior permite la liberación de NF κ B y su traslocación a núcleo, para unirse así a regiones reguladoras específicas para la síntesis de citocinas (del Rio et al., 2004).

En resumen, estos tres factores de transcripción NF-AT, AP-1 y NF κ B, activados en respuesta a las señales generadas a través del entrecruzamiento de CD43, así como por el receptor para el antígeno (Figura 4), están involucrados en la regulación de la transcripción de numerosas citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento.

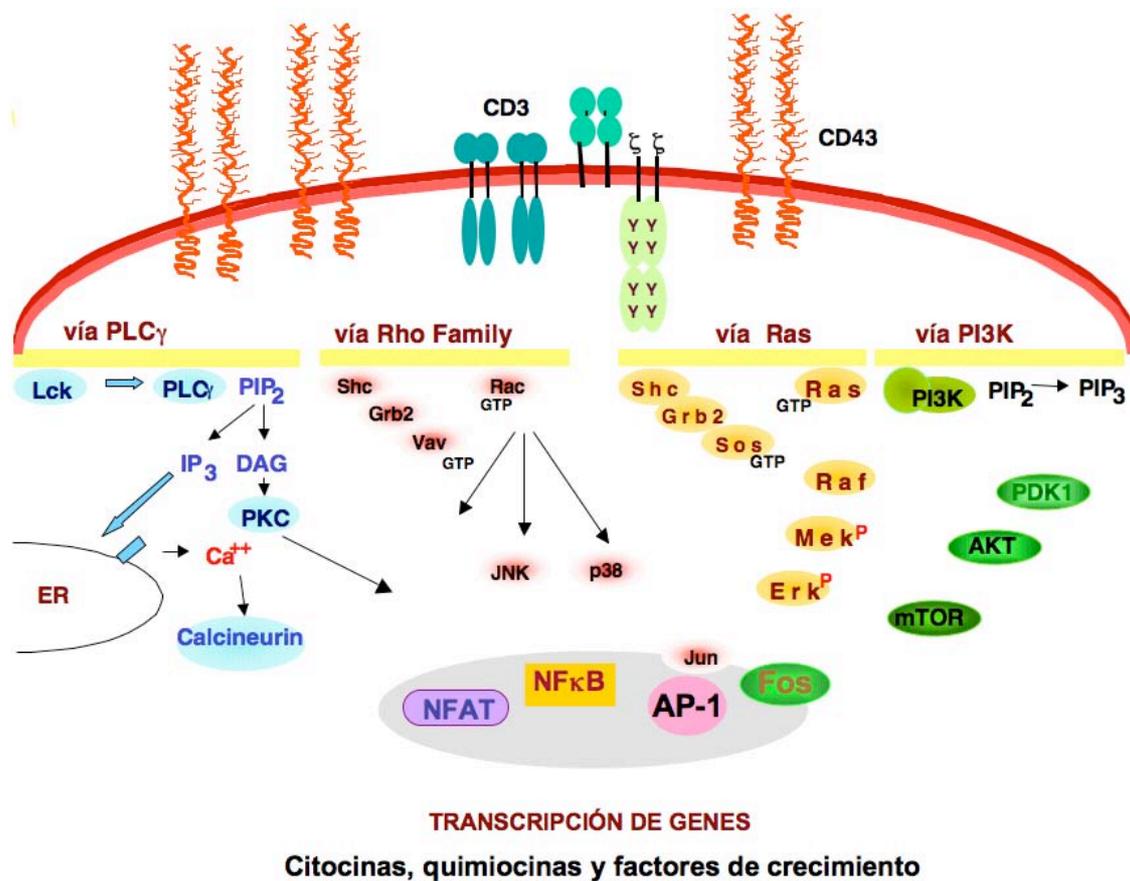


FIGURA 4. SEÑALES INTRACELULARES DE CD43.

ANTECEDENTES

EFFECTO DE LA TEMPORALIDAD DE LAS SEÑALES DE CD43 RESPECTO A LAS DEL TCR

Además de su capacidad para generar señales intracelulares de manera aislada, CD43 actúa como coestimuladora a la acción del TCR.

De manera importante, la temporalidad de la participación de CD43, respecto a la del TCR, genera diferencias evidentes en la amplitud y calidad de la respuesta. En particular, la intensidad y duración de la fosforilación de la MAPK ERK es un evento clave en la regulación de los mecanismos moleculares responsables de calibrar la respuesta generada por los estímulos TCR y CD43 (Fierro et al., 2006). Cuando las señales de CD43 son previas o simultáneas a las del TCR, la fosforilación de ERK es más intensa y prolongada que cuando cada uno de los estímulos se aplica por separado. Esta activación derivada de ERK favorece que ERK fosforile en la serina 59 a Lck, lo cual funciona como una palanca que "prolonga" la actividad de Lck así como de las moléculas río abajo. Como sistema de reforzamiento de este mecanismo, cabe mencionar que la fosforilación en la serina 59 a Lck es antagónica a la actividad de la fosfatasa de tirosinas SHP-1 (Fierro et al., 2006).

Así mismo, las señales dependientes de CD43, a diferencia de las de TCR, y a través de PKC θ , fosforilan en serinas y no en tirosinas a la molécula Cbl, bloqueando su actividad de ubiquitin ligasa, y por ende prolongando la duración de la señal (Pedraza-Alva, datos no publicados).

Se han descrito más de 160 sustratos para ERK, desde citosólicos y nucleares, hasta aquellos localizados en otros organelos. Entre estos se incluyen factores de transcripción, cinasas, fosfatasas, elementos del citoesqueleto, reguladores de la apoptosis y otras proteínas (Yoong and Senger, 2006). Definir cuáles de estos son activados por efecto de CD43, y más importante y ambicioso aún, cuál es el universo de factores de transcripción y las vías de señalización activados por efecto de CD43, es el punto de partida del presente estudio.

2. HIPÓTESIS

Si las señales de CD43 y el TCR, aisladas o en distintas combinaciones, inducen diferentes universos de citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, entonces, la identificación de los diferentes factores de transcripción que regulan la expresión de estos, permitirá visualizar vías de señalización dependientes de CD43 aún no identificadas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Usando herramientas bioinformáticas, realizar un análisis de los factores transcripcionales que regulan la expresión de las diferentes citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que se inducen a través de las señales de CD43 para profundizar nuestro conocimiento de la vía de señalización de CD43.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Hacer un análisis cuantitativo de las citocinas-quimiocinas-factores de crecimiento expresados en linfocitos T humanos activados a través de CD43, el TCR, o CD43 y el TCR variando el orden de los estímulos.
2. Realizar un análisis computacional de los promotores de las diferentes quimiocinas/citocinas/factores de crecimiento para hacer una predicción de los factores de transcripción que regulan la expresión de estos genes.

4. METODOLOGÍA

Siendo esta tesis esencialmente un proyecto de predicción basado en el análisis bioinformático, en esta sección hemos incluido gran parte de la estrategia de análisis que desarrollamos, para concentrarnos en la sección de resultados en el análisis de la información arrojada por el análisis bioinformático.

4.1 ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T

Los linfocitos T humanos, aislados de concentrados leucocitarios de donadores de banco de sangre fueron tratados conforme a las normas de bioseguridad y bioética vigentes en el IBT, UNAM. El aislamiento y la activación los linfocitos T aislados de sangre periférica de donadores sanos de banco de sangre han sido descritos en Fierro et al (2006), fueron tratadas con el primer estímulo dos horas antes de agregar el segundo estímulo. Los estímulos se realizaron a través de:

- cada una de las moléculas independientemente: CD43 ó TCR
- CD43 y el TCR simultáneamente: CD43+TCR
- CD43 (2 hr) antes de aplicar el estímulo a través del TCR: CD43-TCR
- TCR (2 hr) antes de aplicar el estímulo a través de CD43: TCR-CD43

En todos los casos las células se incubaron a 37°C con 5% CO₂ por 48 horas, después de lo cual se colectó el sobrenadante y se evaluó la presencia de diferentes proteínas por inmunoblot, con un macroarreglo.

4.2 MACROARREGLOS: INCUBACIÓN-REVELADO

Los macroarreglos que se emplearon para este estudio son membranas constituidas por un arreglo de anticuerpos que permiten identificar 42 citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento humano. Las membranas fueron incubadas con el sobrenadante de cultivo obtenido después de estimular las células con los distintos estímulos por 48 horas y tratadas siguiendo el protocolo establecido por el fabricante (RayBiotech, APÉNDICE 4.2). La

presencia o ausencia de las citocinas en los sobrenadantes se reveló por quimioluminiscencia en placas fotográficas. Todas las membranas de un mismo experimento fueron tratadas simultáneamente durante todo el proceso.

4.3 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DETECTADOS POR EL MACROARREGLO: BÚSQUEDA DE CO-REGULACIÓN A TRAVÉS DE LA BICLUSTERIZACIÓN

Los estudios centrados en la expresión de genes a través de macroarreglos (detección de proteínas) y microarreglos (RNA mensajero), tienen como objetivo registrar la respuesta de la célula ante estímulos específicos, con el fin de visualizar el panorama particular y global de la respuesta celular en un momento dado. Para ello es necesaria reducir la dimensión de los datos de expresión. Esta se logra mediante la agrupación de genes co-regulados putativamente. La agrupación de los datos es determinada por semejanzas entre éstos y se genera a través de diversos algoritmos y métricas. Lo que se persigue finalmente, es la creación de redes globales de regulación de genes (Bar-Joseph et al., 2003; Dozmorov et al., 2008; Reiss et al., 2006; Tanay et al., 2002), que permiten identificar los elementos reguladores tanto de las respuestas particulares como aquellos importantes en un panorama global. Desde esta perspectiva, una red de regulación constituye un marco teórico inicial a través del cual estudiar y/o inferir sobre el efecto experimental que tendría la eliminación/adición/modificación de elementos reguladores.

La reducción de la dimensión de los datos de expresión y el reconocimiento de co-regulación de genes se logra a través de la biclusterización, considerada como la mejor estrategia de agrupamiento. Esta estrategia de agrupamiento toma en cuenta la asociación de dos conjuntos de información de forma simultánea, siendo el primer conjunto, aquel correspondiente a las diferentes condiciones de estímulo y el segundo las proteínas o el RNA mensajero expresadas/detectado. A través de la biclusterización se puede analizar el comportamiento de genes bajo diferentes condiciones, revelando la co-regulación que estos tienen solo bajo estímulos o condiciones específicas.

Para nuestro estudio partimos de los datos experimentales obtenidos a través de un macroarreglo con linfocitos T estimulados a través de dos moléculas (CD43 y TCR).

4.3.1 BÚSQUEDA DE PATRONES DE EXPRESIÓN: BICLUSTERIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN EXPERIMENTAL

Para poder comparar del efecto inducido por cada estímulo es necesaria la normalización de los datos. Esto permite generar valores absolutos y eliminar la variación generada por artefactos experimentales.

4.3.1.1 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS: OBTENCIÓN DE LECTURAS DENSITOMÉTRICAS, PREPROCESAMIENTO, NORMALIZACIÓN

A) OBTENCIÓN DE LECTURAS DENSITOMÉTRICAS

Cada membrana incluye, además de seis puntos como control positivo y seis como negativo, anticuerpos para la captura por duplicado de 42 proteínas.

El *análisis densitométrico* del arreglo de puntos revelado para cada membrana se realizó con el programa FluorChem del sistema de imagen Alpha-Innotech, substrayendo el ruido de fondo de cada membrana. Las lecturas densitométricas de cada membrana se obtuvieron generando una plantilla de 96 círculos de área idéntica posicionada sobre el arreglo de puntos revelado. La sustracción del ruido de fondo en cada membrana se realizó restando a cada uno de las 96 puntos la lectura obtenida por una área circular adicional ubicada en un lugar cualquiera de la membrana excenta de puntos y alejada de la zona de los controles positivos (APÉNDICE 4.3.1.1). Siendo la dispersión de los datos pequeña $\leq 10\%$.

B) PREPROCESAMIENTO

Los datos del análisis densitométrico requieren de un *preprocesamiento* que permita obtener valores absolutos una vez eliminada la variación causada por artefactos experimentales, para poder así comparar el efecto generado por cada estímulo (Pevsner J. 2003).

Debido a que los controles positivos y negativos son contiguos en la membrana, la intensidad de la señal producida por los controles positivos es tal

que, en algunos casos, genera ruido de fondo en los negativos. Para eliminar este artefacto, se calculó la lectura promedio de los controles negativos en el conjunto de las membranas analizadas, estableciéndose esta lectura como el valor numérico mínimo que se podría asignar a cualquier punto (APÉNDICES 4.3.1.1 a-e).

Una vez establecida la escala de lecturas para cada proteína, se procedió a calcular el promedio de las densidades numéricas, generándose una matriz de promedios, ya que cada proteína identificada en estas membranas viene por duplicado (APÉNDICES 4.3.1.1 f y g).

c) NORMALIZACIÓN

Para evaluar el efecto de los estímulos estudiados en relación con la condición basal o la ausencia de estímulo, se normalizaron los promedios calculados, dividiendo los valores obtenidos para cada proteína con cada estímulo entre el valor obtenido para la misma proteína en condiciones basales en células sometidas a los mismos pasos experimentales, pero sin estimular (APÉNDICE 4.3.1.1 a). Debido a que una escala decimal revela más semejanzas que diferencias entre condiciones experimentales, se realizó la transformación de los valores a escala logarítmica base 2 (Pevsner J. 2003). Esta transformación genera una distribución central que permite distinguir con mayor facilidad el incremento o la disminución de la expresión. En esta escala, valores cercanos a cero reflejan la falta de cambio de expresión, en tanto que los mayores a cero el incremento, y los menores, la disminución respecto a la expresión basal.

Hasta aquí, la normalización de los datos nos ha llevado a la generación de una matriz logarítmica bidimensional constituida por 7 estímulos y 42 proteínas más dos controles (APÉNDICE 4.3.1.1 g).

4.3.1.2 BICLUSTERIZACIÓN DE DATOS EXPERIMENTALES: GENERACIÓN DE AGRUPAMIENTOS JERÁRQUICOS MEDIANTE CLUSTER 3.0

Una vez normalizados y convertidos a escala logarítmica, los datos de la matriz se agrupan a través del programa CLUSTER 3.0, haciendo uso de diferentes algoritmos y métricas. La representación gráfica de la "biclusterización" generada, denominada dendrograma, permitirá identificar posibles patrones de expresión de proteínas resultantes de los diferentes estímulos.

Para el análisis de los datos experimentales se seleccionó la "agrupación jerárquica", ya que, como se menciona en los fundamentos teóricos del APÉNDICE 4.3.1.2, no se requiere establecer un número predeterminado de grupos. Las métricas utilizadas fueron: la "distancia euclidiana" y "la correlación centrada. Los métodos de agrupamiento seleccionados fueron del vecino más cercano ("single linkage"), lejano ("complete linkage") y por promedio ("average linkage").

Condiciones de agrupamiento	
Métrica	Métodos de agrupamiento
Distancia Euclidiana	"single linkage" (Nearest neighbor)
Correlación centrada (coeficiente de correlación de Pearson)	"complete linkage" (Furthest neighbor)
	"average linkage"

Especificaciones de agrupamiento
I) "single linkage" usando distancia euclidiana
II) "single linkage" usando correlación centrada
III) "complete linkage" usando distancia euclidiana
IV) "complete linkage" usando correlación centrada
V) "average linkage" usando distancia euclidiana
VI) "average linkage" usando correlación centrada

4.3.2 BICLUSTERIZACIÓN DE UN SEGUNDO CONJUNTO DE DATOS BIOLÓGICOS: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PREDICHOS.

El proceso de biclusterización, mediante el cual se asume una co-regulación putativa entre grupos de genes y estímulos, requiere de la integración de un conjunto de información biológica que restrinja y defina si la co-expresión es reflejo de co-regulación. Además, la integración de dicha información biológica adicional restringiría los falsos positivos y tendencias que el ruido experimental podría generar en la agrupación experimental.

Entre los eventos involucrados en la co-regulación de la expresión de genes, cabe mencionar; entre otros, la presencia de motivos *cis* reguladores, la unión a reguladores comunes, la proximidad en el genoma así como la localización subcelular. Puede considerarse que cada uno de estos elementos proporciona información biológica adicional que complementa la biclusterización de los datos experimentales y contribuye a precisar si el fenómeno de co-expresión putativa observado está sustentado en co-regulación.

Considerando que la expresión de genes es regulada por factores de transcripción, que al unirse a los elementos reguladores de los genes, activan o inhiben la transcripción, para este estudio se consideró el universo de factores de transcripción como el conjunto de información adicional que restringiría y tendría una implicación directa en la co-regulación (Dozmorov et al., 2008; Reiss et al., 2006; Stormo, 2000).

4.3.2.1 ANÁLISIS IN SÍLICO: IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN POSIBLEMENTE RECLUTADOS A LOS PROMOTORES DE LAS 42 PROTEÍNAS DEL ARREGLO

Partiendo del hecho que los diferentes estímulos a los que se sometieron las células resultan en patrones claramente distintos de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, se elaboró un conjunto adicional de datos biológicos. El reconocimiento de una secuencia consenso específica para un factor de transcripción aunada a las asociaciones resultantes de la biclusterización de los datos experimentales proporcionará un elemento adicional para asociar citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento detectados experimentalmente.

Mediante un análisis *in silico* de los promotores de cada una de las moléculas detectadas en el macroarreglo, se predijeron los posibles factores de transcripción que se reclutarían al promotor de cada una de ellas. La predicción de los factores de transcripción potencialmente reclutados se realizó con base en la secuencia consenso de reconocimiento que los factores de transcripción presentan en el ADN.

A) OBTENCIÓN DE SECUENCIAS PROMOTORAS DE LAS 42 CITOCINAS-QUIMIOquinas-FACTORES DE CRECIMIENTO CONTENIDAS EN EL MACROARREGLO

Las secuencias promotoras se obtuvieron de la base de datos Ensembl, bajo una longitud uniforme de 1000 pb río arriba y 200 río abajo del sitio ATG para cada una de las 42 citocinas. Ver APÉNDICE 4.3.2.1 a

B) ANÁLISIS IN SÍLICO DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN CON PATCH-TRANSFAC

La identificación de sitios de unión de factores de transcripción sobre la región promotora se realizó a través de **Patch**, una herramienta integrada en la base de datos **TRANSFAC**, la cual contiene información de organismos eucariontes-vertebrados, y entre estos, el humano. A partir de la amplia compilación de sitios de unión para factores de transcripción comprobados experimentalmente en la regulación de genes contenida en matrices, se pueden generar predicciones en promotores aún no estudiados.

La identificación/predicción *in silico* se genera a partir del emparejamiento de secuencias de reconocimiento (pattern matching). La puntuación o el valor asignado a la predicción corresponde al grado de emparejamiento /apareamiento hacia cualquier secuencia de longitud definida, esto a través de matrices de peso (position weight matrix, PWM).

Entre las especificaciones para restringir la búsqueda, se considera la longitud de la secuencia consenso a buscar; el número máximo de nucleótidos no emparejados (mismatching nucleotides) así como la penalización. Por otro lado, la información de la predicción incluye: posición y sentido de los sitios, número de nucleótidos no emparejados, puntuación del emparejamiento

(matching site) donde 100 significa 100% de identidad y finalmente, los factores que potencialmente se pueden unir y la secuencia de reconocimiento.

Las predicciones obtenidas de los factores de transcripción sobre las secuencias promotoras de las 42 citocinas se incluyen en el APÉNDICE **4.3.2.1 b**

c) GENERACIÓN DE TABLA-MATRIZ: FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PREDICHOS Y CITOCINAS- QUIMIOCINAS - FACTORES DE CRECIMIENTO

Las predicciones se restringieron a la búsqueda del emparejamiento de secuencias consenso sobre la región promotora a partir de matrices de vertebrados, y el análisis se realizó sobre el conjunto de factores de transcripción con matrices de mamíferos: hombre, rata y ratón (APÉNDICE **4.3.2.1.xls**). Se eliminaron aquellos factores de transcripción, cuya predicción se obtuvo para el 100% de los factores solubles estudiados. Esta nueva base de datos de factores de transcripción se combinó para generar una tabla – matriz adicional en la que las citocinas-quimiocinas-factores de crecimiento están dispuestos en columnas y los factores de transcripción predichos, en filas y codificada en un sistema binario, donde la ausencia es 0 y presencia (predicción) de un factor de transcripción es 1 (APÉNDICE **4.3.2.1 c**).

4.3.2.2 BICLUSTERIZACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PREDICHOS: ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS

A) IDENTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PARA LOS DOS ESTÍMULOS PRINCIPALES: DE ACUERDO A LAS DOS AGRUPACIONES PRINCIPALES DE GENES

Se establecieron diferentes estrategias para el análisis de los datos.

Como primera estrategia se analizó la agrupación de los factores de transcripción, conservando, para el conjunto de genes (citocinas-quimiocinas-factores de crecimiento) el orden de agrupación obtenido a partir de la primera biclusterización, ya que a partir de ésta se supuso un fenómeno de co-expresión, para cuyo sustento es esta segunda biclusterización. Con la base de datos de los factores de transcripción se generaron dos tablas matrices, cada una de las cuales incluye todos los factores de transcripción constituyendo las

filas, y en columnas, sólo los genes incluidos en cada una de las dos grandes agrupaciones de citocinas-quimiocinas-factores de crecimiento originadas por los dos estímulos principales CD43-TCR y CD43+TCR.

En formato de texto, las tablas matrices se sometieron a biclusterización a través del programa CLUSTER, utilizando también la combinación de algoritmos y métricas mencionadas en el punto 4.3.1.2. Esta segunda biclusterización generada a partir de estas dos tablas-matrices nos permitió evaluar, si la agrupación del conjunto de genes se aproximó a la agrupación generada por la biclusterización de los datos experimentales (**APÉNDICE 4.3.2.2 inciso I**), y definir cuáles serían los factores de transcripción específicos de cada estímulo, y que podrían considerarse como probables responsables de las diferencias entre los estímulos que se compararon.

B) RECONOCIMIENTO DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ESPECÍFICOS PARA CADA ESTÍMULO: SEGREGACIÓN DEL CONJUNTO DE GENES DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

La identificación de los factores de transcripción específicos para cada estímulo condujo a la segregación del conjunto de genes de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento inducidos por cada estímulo. En total se subgeneraron tres tablas-matrices para cada tratamiento CD43-TCR, CD43+TCR, CD43, TCR y TCR-CD43. Las diferentes biclusterizaciones desarrolladas siguiendo las combinaciones de algoritmos y métricas anteriormente citados se muestran en el inciso II del **APÉNDICE 4.3.2.2**.

C) RECONOCIMIENTO DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ESPECÍFICOS DE CADA ESTÍMULO A PARTIR DEL TOTAL DE GENES DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO INDUCIDOS

Al considerar todas las proteínas expresadas a través de cada tratamiento, se lograron identificar los factores de transcripción predichos de manera específica por cada tratamiento. De igual forma se generaron diferentes biclusterizaciones con las combinaciones de algoritmos y métricas anteriormente citados y estos se muestran en el **APÉNDICE 4.3.2.2 inciso III**.

5. RESULTADOS

1. DINÁMICA DE EXPRESIÓN DE GENES DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO EN LINFOCITOS T ACTIVADOS A TRAVÉS DE CD43 Ó TCR Y EL TCR VARIANDO EL ORDEN DE LOS ESTÍMULOS.

Los datos experimentales generados previamente en el laboratorio (Figura 5.1) muestran que las señales de CD43 regulan positivamente las del TCR e inducen a las células a transcribir los genes de un variado abanico de quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento (Fierro et al., 2006). APÉNDICES Tablas A4.2, A5.1 y cuadro A5.1.

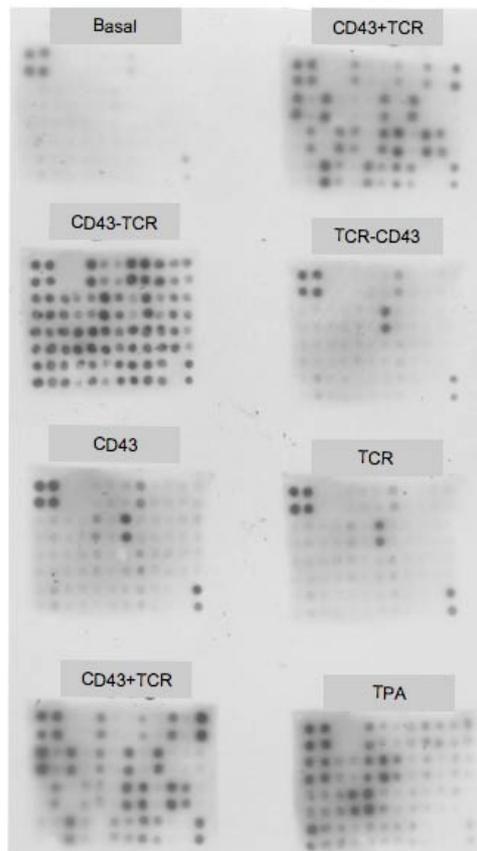


FIGURA 5.1: EL PATRÓN DE CITOCINAS INDUCIDAS EN RESPUESTA A LAS SEÑALES DE CD43 Y EL TCR, VARÍA EN FUNCIÓN DEL ORDEN DE LOS ESTÍMULOS. Linfocitos T aislados de sangre periférica de donadores sanos fueron estimulados con el primer estímulo dos horas antes de agregar el segundo estímulo, después de lo cual las células se incubaron a 37°C con 5% CO₂ por 48 horas. Las células estimuladas con CD43 o el TCR individualmente fueron sometidas a las mismas manipulaciones, aplicándose el estímulo al inicio del experimento. Las citocinas producidas fueron identificadas por inmunoblot a partir del sobrenadante de cultivo. Los estímulos empleados fueron: CD43 ó TCR independientemente; CD43 y el TCR simultáneamente [CD43+TCR]; CD43 (2 hr) antes de aplicar el estímulo a través del TCR [CD43-TCR]; TCR (2 hr) antes de aplicar el estímulo a través de CD43 [TCR-CD43]; y TPA.

2. BÚSQUEDA DE CO-REGULACIÓN A TRAVÉS DE LA BICLUSTERIZACIÓN: BÚSQUEDA DE PATRONES DE EXPRESIÓN

Este análisis de expresión fue realizado a través de la "biclusterización" o bi-agrupación de dos conjuntos de datos: el de los resultados experimentales (valores densitométricos normalizadas de los datos mostrados en la figura 5.1 y que corresponden a los niveles de expresión de los distintos factores solubles cuantificados a partir del macroarreglo empleado) para cada una de las diferentes condiciones de estímulo y el de los factores solubles expresados.

Mediante diferentes combinaciones de algoritmos y métricas, se generaron varias agrupaciones, las cuales están incluidas en el APÉNDICE 5. La biclusterización mostrada en la figura 5.2 fue seleccionada por ser aquella que mostraba mas claramente una segregación de los productos celulares en función de dos tratamientos. Los estímulos: CD43 previo al del TCR [CD43-TCR], así como el estímulo simultáneo de CD43 y el TCR [CD43+TCR], sobresalen como los inductores de un número mayor de proteínas y en mayores proporciones. La agrupación de las proteínas (factores solubles), resultante por estos estímulos, permite identificar dos grandes grupos, señalados como I y II.

Además, el estímulo [CD43-TCR] sobresalió entre estos dos estímulos principales como el único que indujo la expresión de los 42 factores solubles detectables en el arreglo proteico. El estímulo [CD43+TCR], solamente indujo alrededor del 50% de las proteínas, todas del subgrupo II, que incluye desde IL-2 hasta EGF. A través de este estímulo se observa también que la expresión de TNF- β /LT- α , graficado en azul, disminuye respecto a los niveles basales.

Resulta interesante que las señales del estímulo solo de CD43, generen, aunque en menor nivel que las señales del tratamiento [CD43+TCR], la expresión de citocinas. En cambio, los estímulos de TCR previo a CD43 [TCR-CD43] y del TCR solo, inducen la expresión de un número menor de citocinas y quimiocinas, entre las cuales IL-6, IL-8, GRO β y RANTES se inducen en mayores niveles. El tratamiento con TPA, control de activación en el experimento, indujo la expresión de 39 de las 42 proteínas.

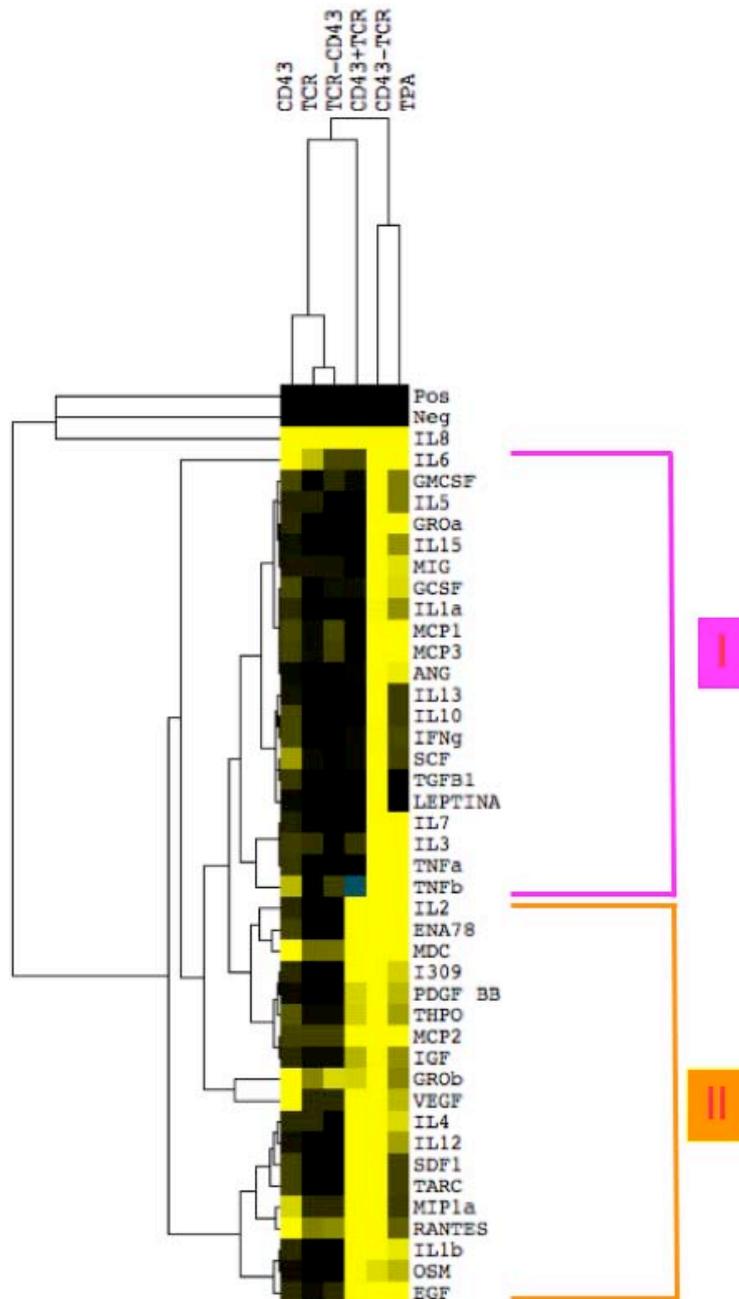


FIGURA 5.2. PATRONES DE EXPRESIÓN: BICLUSTERIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN EXPERIMENTAL. La biclusterización de los datos experimentales generada con el algoritmo “average linkage” y la métrica de correlación centrada, muestra en el margen superior, la asociación entre los seis estímulos estudiados: TPA, TCR, TCR-CD43, CD43, CD43-TCR y CD43+TCR; en tanto que en el margen lateral izquierdo, la asociación de las 42 citocinas, quimiocinas o factores de crecimiento producidos en los linfocitos T totales después de 48 horas de estímulo detectados por el arreglo proteico en los sobrenadantes de cultivo. En el dendrograma, visualizado en escala de tres colores, el color azul se asocia a valores negativos-disminución, el amarillo a positivos-incremento y el negro, que representa el cero en la escala logarítmica, indica la ausencia de cambio de expresión, respecto de la condición sin estímulo en las células. Los tonos del obscuro al brillante indican valores mínimos y máximos respectivamente.

3. BÚSQUEDA DE CO-REGULACIÓN A TRAVÉS DE LA BICLUSTERIZACIÓN DE UN SEGUNDO CONJUNTO DE DATOS BIOLÓGICOS: LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PREDICHOS.

La semejanza en los patrones de expresión observados en función de los diferentes estímulos, podría reflejar la activación de elementos que participen simultáneamente o no, haciendo posible la co-expresión de los factores solubles identificados experimentalmente. Continuando con esta estrategia de biclusterización, la matriz en la que se agruparon los factores solubles de acuerdo al estímulo, se asoció un nuevo conjunto de datos biológicos, el de factores de transcripción que se asociarían potencialmente a los promotores de factores solubles del macroarreglo.

El análisis predictivo, basado en el reconocimiento de secuencias consenso en el ADN en las regiones promotoras de los genes de estos factores solubles generó el conjunto de factores de transcripción probablemente implicado en la regulación de la expresión de las proteínas identificadas. La base de datos que se generó se depuró, eliminando aquellos factores de transcripción predichos para todos los factores solubles estudiados, dando lugar a una base de datos que contiene los factores de transcripción únicos de cada factor soluble. Esta última se combinó con la matriz que contiene el conjunto de proteínas expresadas agrupadas en función del tratamiento experimental. La nueva matriz que se generó se analizó con base en tres estrategias.

La *primera estrategia* tuvo como objetivo identificar los factores de transcripción específicos para los dos estímulos principales, CD43-TCR y CD43+TCR, de acuerdo a las dos agrupaciones principales de genes obtenidas con la primera biclusterización. Las agrupaciones de estos estímulos, se muestran en la figura 5.3. Los resultados indican que la agrupación de los genes basada en los factores de transcripción se aproximó a la generada por los estímulos en la agrupación de los datos experimentales (APÉNDICE 4.3.2.2) y sugieren que la co-expresión de ciertos factores solubles refleja una co-regulación de las señales intracelulares necesarias para su producción. Esta agrupación nos permitió también identificar factores de transcripción específicos, además de los comunes, propios de cada

b)

II: CD43-TCR, CD43+TCR

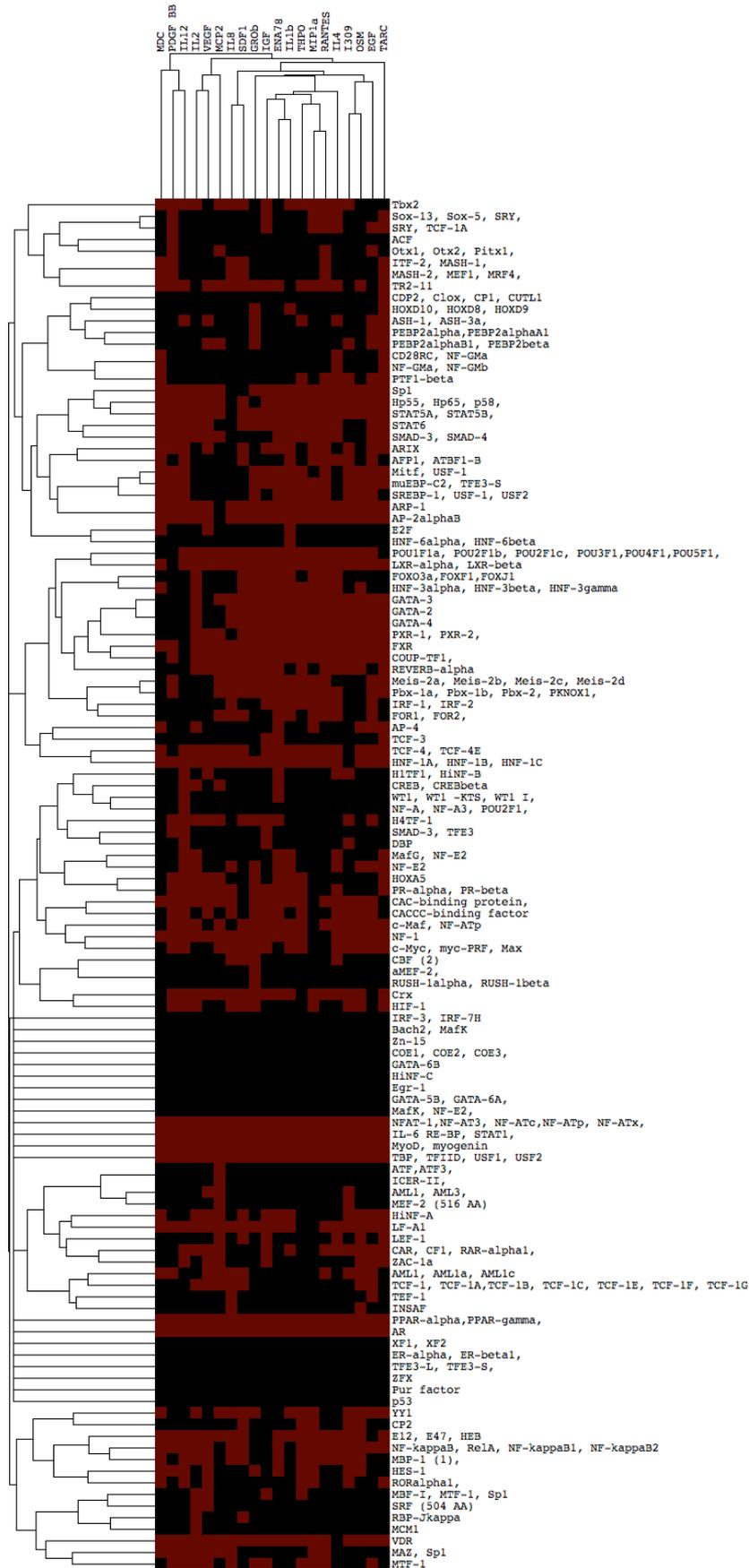


FIGURA 5.3. BICLUSTERIZACIÓN DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO GENERADOS BAJO LA INFLUENCIA DE LOS DOS ESTÍMULOS PRINCIPALES CD43-TCR Y CD43+TCR Y DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PREDICHOS. En el margen superior se visualiza la asociación entre las citocinas, quimiocinas o factores de crecimiento inducidos por los estímulos a) CD43-TCR y b) CD43-TCR y CD43+TCR y, en el margen lateral izquierdo, la asociación de los factores de transcripción predichos *in silico* a través de PATCH-TRANSFAC. Biclusterización obtenida con el algoritmo “average linkage” y la métrica correlación centrada. En el dendrograma, el color rojo indica la positividad de la predicción y el negro la ausencia de predicción de cada factor de transcripción para cada gen.

Los factores comunes y específicos predichos para los diferentes estímulos se muestran en la figura 5.4. Entre los factores de transcripción comunes identificados en respuesta a los dos estímulos más fuertes [CD43+TCR] y [CD43-TCR] se encuentran factores con funciones tanto como activadoras como inhibitorias de la respuesta inmune, como lo son CREB (Butscher et al., 2001; De Cesare et al., 1999; Hai and Hartman, 2001; Haus-Seuffert and Meisterernst, 2000), RBP-Jkappa (Amsen et al., 2007), GATA3 (Kim et al., 2007). Otros como HIF-1, activado en condiciones de hipoxia (Dery et al., 2005) y con un efecto inductor de VEGF y otros factores de crecimiento (Cascio et al., 2008). Hay un mayor número de factores en el caso del estímulo [CD43-TCR] asociados con funciones diversas, como ocurre para IRF-3, involucrado en la señalización del IFN- γ ; los factores GATA 5 y 6 asociados con etapas tempranas del desarrollo de tejidos meso- y endodérmicos (Viger et al., 2008); Egr-1, un factor de pronta respuesta en células inmunes (Cheadle et al., 2005); HiNF-C, con función en la transcripción de histonas (van Wijnen et al., 1989), y cuya predicción fue específica para el caso de TNF- β /LT- α , cuya expresión se indujo a través de [CD43-TCR] y se redujo, por el contrario, por efecto de [CD43+TCR]; hasta ZFX, involucrado en la supresión de la apoptosis (Saatcioglu et al., 1990) o interesantemente p53, predicho específicamente para el caso de IL-13 y, que participa en la activación/supresión de blancos relacionados en la inducción de apoptosis (Riley et al., 2008; Vrba et al., 2008). En el caso específico de [CD43+TCR], se distinguen dos factores de transcripción TCF-3, y el receptor

nuclear HNF-6, asociados con morfogénesis en el desarrollo (Widelitz, 2004) y el metabolismo hepático (Kim and Ren, 2006).

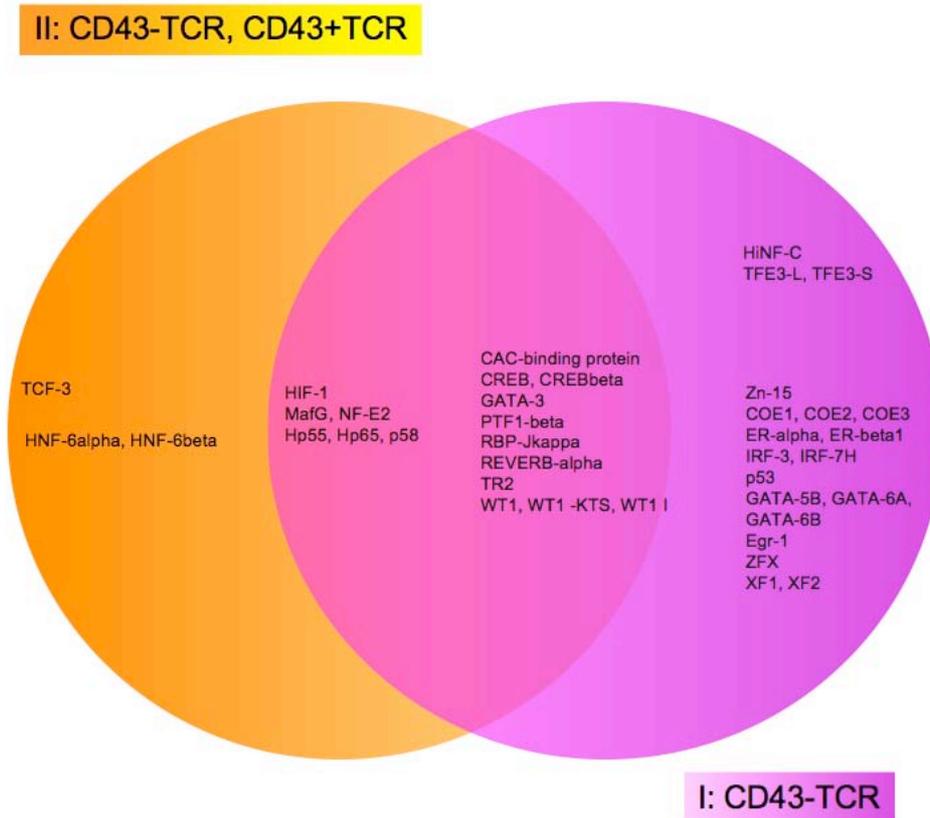


FIGURA 5.4. PARTICIPACIÓN DIFERENCIAL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PREDICHOS EN LOS ESTÍMULOS CD43-TCR Y CD43+TCR.

Asociados en diagramas de Venn, se muestran los factores de transcripción cuya participación es diferencial para las dos agrupaciones principales de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento obtenidas con la biclusterización experimental inicial inducida por los estímulos: I) sólo CD43-TCR, II) CD43-TCR y CD43+TCR.

La *segunda estrategia* consistió en comparar el conjunto de factores de transcripción predicho para las citocinas, quimiocinas o factores de crecimiento identificados para cada uno de los estímulos analizados. De las tres tablas-matrices subgeneradas para cada tratamiento CD43-TCR, CD43+TCR, CD43, TCR y TCR-CD43, se muestran en diagramas de Venn, (Figura 5.5), los factores específicos y comunes predichos.

En el caso de las citocinas, se distinguen como estímulos inductores mayoritarios aquellos en los que la participación de CD43 ocurre sola, o bien, previa o simultánea a la del TCR. Específicamente, el estímulo CD43-TCR reclutaría mayoritariamente, factores de transcripción asociados con la activación de la respuesta inmune (SMAD3, GATA 5, 6) (Li et al., 2006); la pronta respuesta en células inmunes (Egr1) (Cheadle et al., 2005); otras funciones tejido específicas como la neurogenesis y diferenciación (ARIX, COE1, 2, 3) (Dubois and Vincent, 2001; Hsieh et al., 2005); hematopoyesis (CBF, CP2, PEBP2 α); organogénesis, HOXD8, -9, -10, -SRF, MCM1) (Remenyi et al., 2004; Rossetti et al., 2007); inducción por hipoxia (HIF-1); supresión de apoptosis (ZFX, FOR1, 2) (Cellot and Sauvageau, 2007); así como con eventos de remodelación de la cromatina (ASH1) (Tanaka et al., 2007), regulando del inicio de la transcripción al favorecer el acercamiento de factores *cis* y *trans* reguladores al sitio de inicio de la transcripción "formación del enhanceosoma" (SRY, MBF) (Lefebvre et al., 2007). De una manera más particular, la producción de IL-12 a través del estímulo de CD43, previo o simultáneo al del TCR estaría asociada al factor MEF2, y en el caso de IL-13, únicamente producida por las señales previas de CD43 a las del TCR, lo estaría a través de p53. Por el contrario, el estímulo sólo del TCR o del TCR previo a CD43, con los cuales se producen IL-6 y TNF- β , no se predice el reclutamiento de los factores de transcripción anteriormente mencionados.

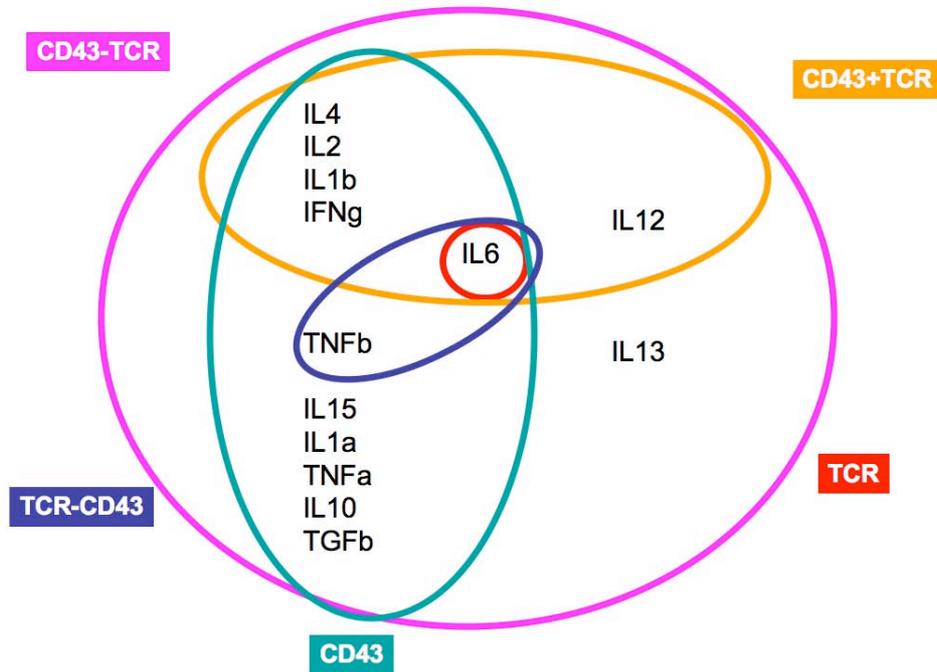
En el caso de las quimiocinas, como en el de las citocinas, la participación previa, simultánea y sola de CD43, que lleva a la producción de I-309, ENA-78, SDF1a, SCF y TARC, ocurriría a través de factores de transcripción, específicamente IRF3, -7 y MafG, asociados con actividad antibacteriana y antiviral mediante la inducción de IFN- α y β (Hiscott, 2007; Honda and Taniguchi, 2006). Otros factores de transcripción (H1TF1, HiNF-B), con

asociación a histonas, (van Wijnen et al., 1996); y factores como NFGMa, TCF-3, están relacionados con crecimiento y división. Señalando que ninguno de los anteriores se predice con el estímulo solo de TCR o del TCR previo a CD43. El promotor de $GRO\alpha$, producido por CD43 solo o previo al TCR y, MIG detectado solo a través de este último estímulo, podría reclutar de manera específica los factores SRF y MCM1 los cuales están asociados con organogénesis (Huber and Bulyk, 2006). En contraparte, las señales del TCR solo inducirían el factor WT1 con implicación en modificaciones a la cromatina (Roberts, 2005). Resulta importante también mencionar que la quimiocina IL-8 se produce en respuesta a todos los estímulos estudiados.

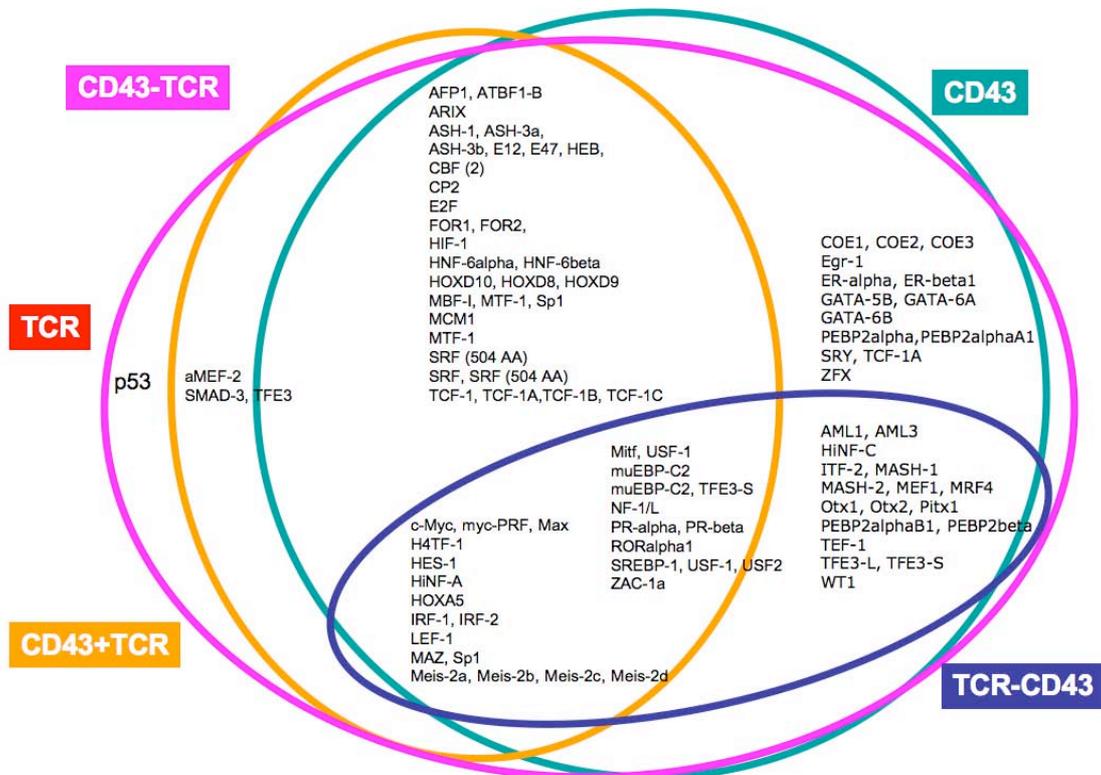
En el caso de los factores de crecimiento, al igual que en los casos anteriores, las señales activadas por la participación previa, simultánea o sola de CD43 respecto a las del TCR, son inductores de la mayor respuesta. Las señales de CD43 inducen la síntesis de EGF, IGF1, THPO, VEGF, OSM a través de factores de transcripción comunes, que, como en el caso de las citocinas, están asociados con la activación de la respuesta inmunológica, neurogénesis y diferenciación, hematopoyesis, organogénesis, supresión de apoptosis, así como con eventos de remodelación de la cromatina. A este conjunto de factores de transcripción habría que agregar el elemento de respuesta de CD28 e IL-6; los factores MafG y K que podrían dimerizar con fos (Moran et al., 2002); los factores FOXO3a, F1 y J1 (Coffer and Burgering, 2004); así como los receptores nucleares CAR, HNF-6alpha, Otx1 y PXR (Eloranta et al., 2005). En el caso particular de $PDGF\beta$, producido solo a través del estímulo previo y simultáneo de CD43 es específica la predicción del factor HIF-1. De manera importante, angiogenina y leptina son producidas solamente por las señales previas de CD43, y el receptor nuclear XF1 y 2 reportado con actividad en el metabolismo de xenobióticos (Saatcioglu et al., 1990).

I. Citocinas

a)

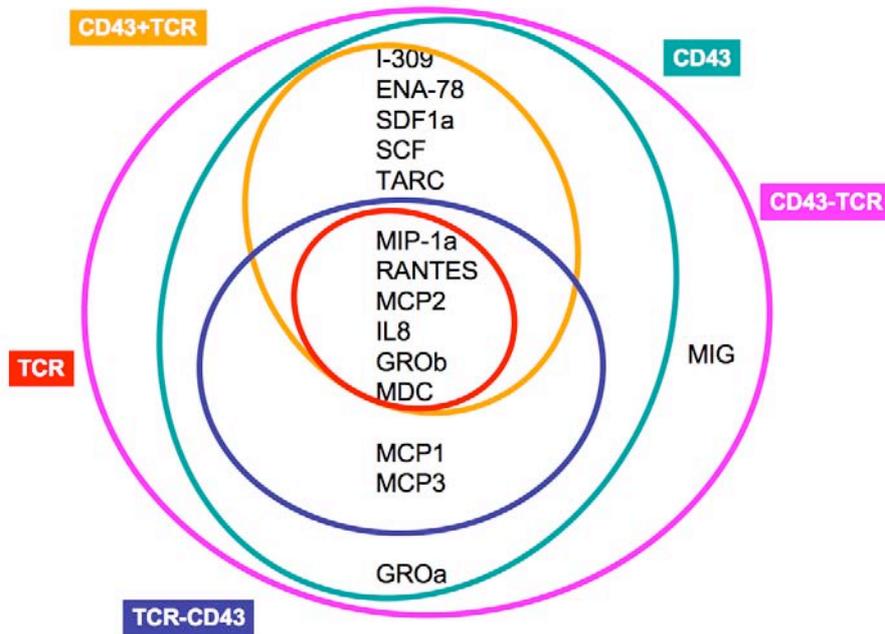


b)

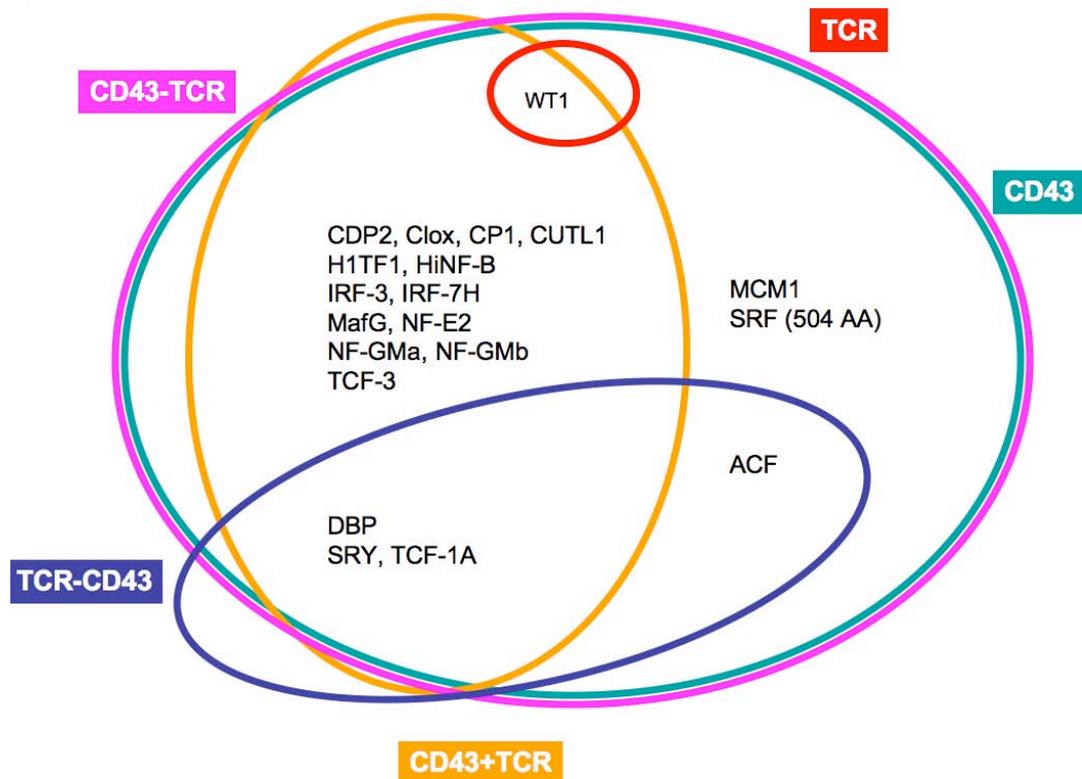


II. Quimiocinas

a)

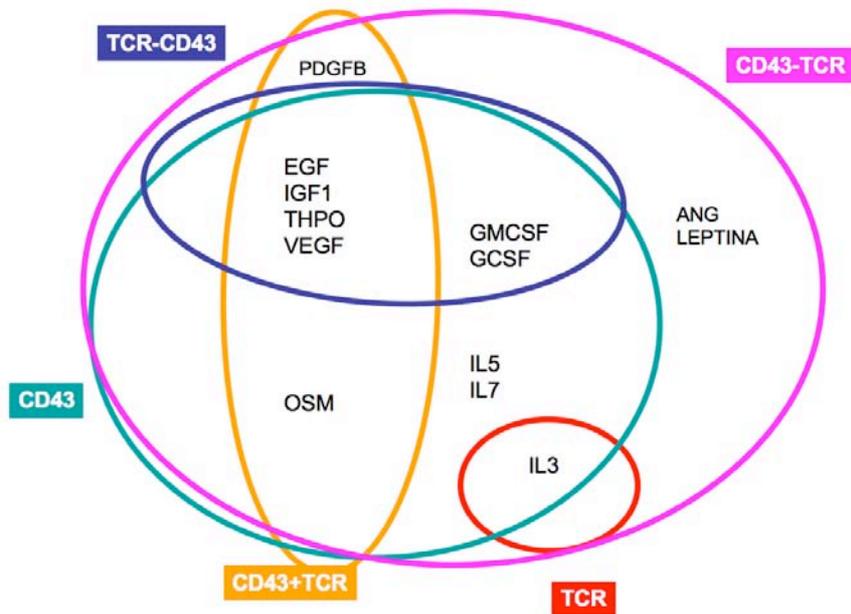


b)



III. Factores de crecimiento

a)



b)

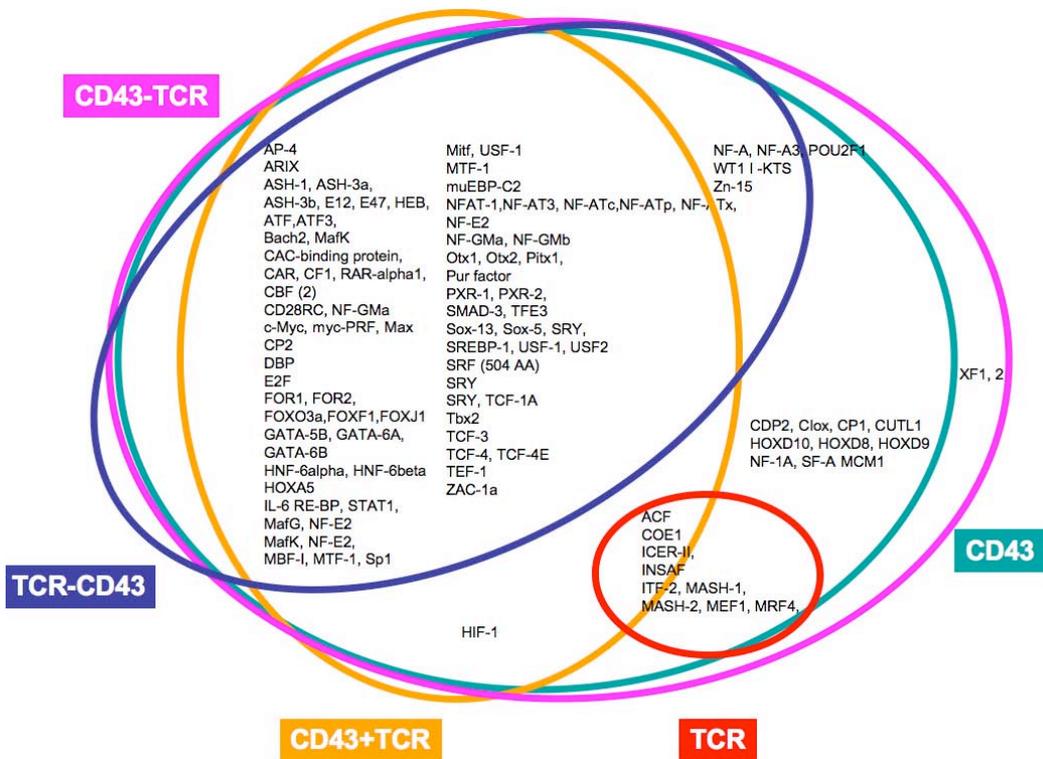


FIGURA 5.5 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN PREDICHOS ESPECÍFICOS PARA CADA ESTÍMULO EN LAS SUBCLASIFICACIONES DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO. Los diagramas de Venn muestran para I) Citocinas, II) Quimiocinas, III) Factores de crecimiento, los factores de transcripción predichos específicos de cada estímulo. En a) los factores solubles producidos y en b) los factores de transcripción predichos por los estímulos CD43-TCR, CD43+TCR, CD43, TCR, TCR-CD43.

Por último, el reconocimiento de los factores de transcripción específicos de cada estímulo, obtenido a través de una tercera estrategia partiendo del conjunto de genes de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento inducidos en cada caso (Figura 5.6.). Los resultados obtenidos a través de este análisis reproducen los hallazgos obtenidos con las estrategias anteriores.

De este análisis global también sobresale que la participación de CD43, previa a la del TCR induce la síntesis del universo total de factores solubles estudiados, englobando el efecto que de manera individual o colectiva ocurre con cada uno de los otros estímulos. De manera importante, los factores de transcripción p53 y XF1 y -2 destacan como factores que no serían reclutados por ninguno de los otros tratamientos a los que fueron sometidas las células y podrían entonces ser responsables de la diferencia del efecto específico observado.

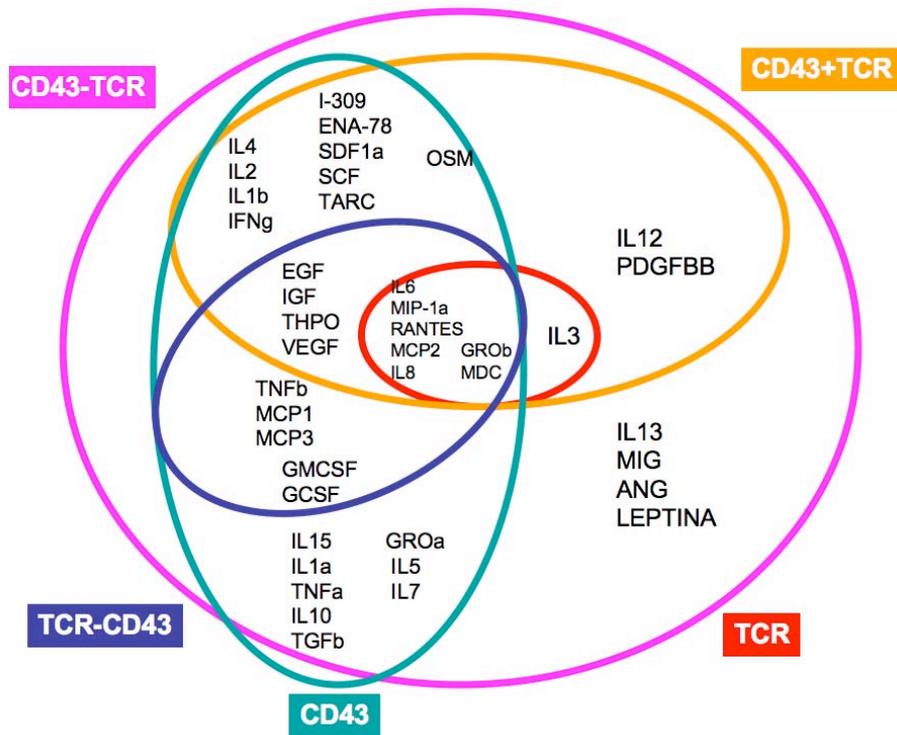
También se distingue que por efecto del estímulo de CD43 simultáneo al del TCR no se reclutarían los factores HiNFC y TFE3, necesarios para la transcripción de TNF- β /LT- α , recordando que TNF- β /LT- α es justamente la citocina cuya expresión se vio inhibida en respuesta a este estímulo.

Se muestra también que los factores de transcripción RBP-Jkappa, SMAD3, TFE3, IRF-3 y 7, MafK, asociados con la respuesta inflamatoria (Amsen et al., 2007); Bach2, con neurogénesis; MCM1, GATA5 y 6, con organogénesis (Huber and Bulyk, 2006; Viger et al., 2008); HNF6, metabolismo hepático (Widelitz, 2004), podrían ser reclutados por los estímulos en los que CD43 participa de manera previa, simultánea o solo, y no así por la sola participación del TCR solo o en coestímulo previo a CD43.

Este análisis hace evidente que la especificidad de las señales así como la temporalidad en la que estas son recibidas por las células, tiene efecto en las

vías activadas, y la amplitud de éstas culmina con la activación específica de factores de transcripción que controlarán la transcripción/expresión de factores solubles, también específicos.

a)



b)

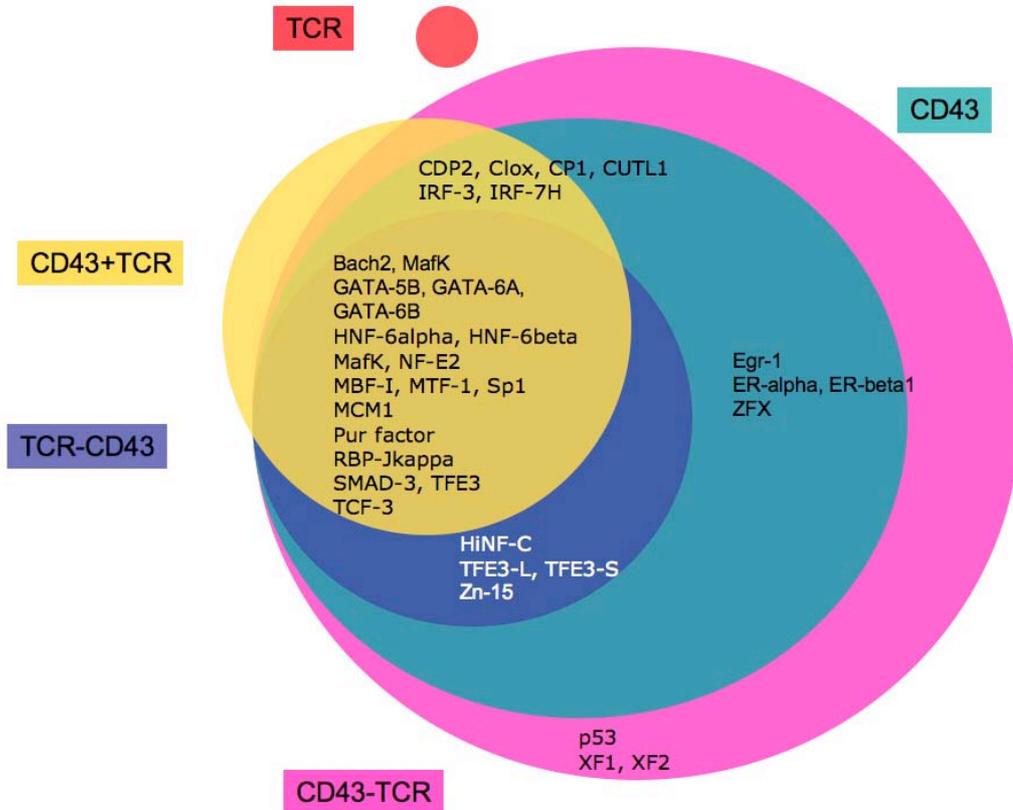


FIGURA 5.6 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ESPECÍFICOS: IDENTIFICACIÓN A PARTIR DEL TOTAL DE GENES DE CITOCINAS, QUIMIOKINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO INDUCIDOS A TRAVÉS DE CADA ESTÍMULO. Los diagramas de Venn muestran a) los factores solubles producidos y b) los factores de transcripción predichos específicos de los estímulos CD43-TCR, CD43+TCR, CD43, TCR, TCR-CD43.

6. DISCUSIÓN

La eficiencia de la respuesta inmune depende de los mecanismos activados y regulados por las interacciones específicas entre moléculas de la superficie de las células participantes. En conjunto, las señales percibidas por estas moléculas le permitirán a la célula obtener información acerca de procesos tan diversos como el estado nutricional, energético y el reconocimiento de lo propio y lo no propio.

A través de las interacciones moleculares que establecen con las diferentes células con las que interactúan y microambientes por los que circulan, las moléculas coestimuladoras/accesorias preparan a los linfocitos para una respuesta eficiente. Ejemplo de ello son las señales generadas por la molécula CD28 que, al reconocer a sus receptores en la misma CPA que el TCR reconoce a su antígeno, favorece la activación de las células, llevándola a la producción de citocinas tales como IL-2, IL-4, e IFN- γ . La transcripción de los genes de estos factores solubles depende del remodelamiento que experimenta la cromatina en los loci correspondientes (Diehn et al., 2002; Kaneko et al., 2007; Murayama et al., 2006; Northrop et al., 2006; Santangelo et al., 2002; Spilianakis et al., 2005).

Nosotros estamos interesados en las funciones de la molécula accesoria CD43. Esta molécula, a través de su dominio intracelular genera señales intracelulares de manera autónoma, a la vez que modula las del TCR (Park et al., 1991; Pedraza-Alva et al., 1996, 1998; Pedraza-Alva et al., 2001; Santana et al., 2000). Recientemente, el trabajo de nuestro laboratorio mostró que la temporalidad con la que participa CD43 con respecto al TCR, genera diferencias evidentes en la calidad y tipo de respuesta y que esto depende del establecimiento de un circuito de retroalimentación en el que participan la MAPK ERK y la fosfatasa de tirosinas SHP-1 (Fierro et al., 2006).

En este trabajo se analizaron de manera sistemática los datos experimentales reportados por Fierro et al. 2006, para elaborar una primera hipótesis de las posibles redes de regulación activadas y sujetas a las señales de CD43. Las redes de regulación contienen información a diferentes niveles. En un primer nivel, el del señalosoma activado, se englobarían todas

las moléculas activadas, desde la superficie celular, continuando con las citosólicas hasta sus blancos nucleares (factores de transcripción). El siguiente nivel de regulación consistiría en una red tejida por los factores de transcripción con todos sus genes blanco bajo control. Finalmente, la información de ambas redes permitiría visualizar de manera global y particular las condiciones y los participantes que generarían cada respuesta celular. Desde esta perspectiva constituirían el marco teórico inicial a través del cual estudiar y/o inferir sobre el efecto experimental que tendría la eliminación/adición/modificación de elementos reguladores.

Si bien, el objetivo final es la creación de estas redes de regulación para entender mejor las funciones de la molécula CD43, la aportación del presente estudio consistió en definir, mediante un análisis *in silico*, el conjunto de factores de transcripción que podrían ser reclutados de manera específica en respuesta a las señales generadas por los tratamientos experimentales evaluados. El análisis, partió de los datos experimentales y se complementó con el conjunto de factores de transcripción predichos, para el conjunto de proteínas del macroarreglo, muy probablemente no representa el total de los posibles factores de transcripción que podrían ser reclutados en respuesta a los distintos estímulos a los que se sometieron las células. Así mismo la base de datos que se construyó para el análisis se basa únicamente en que el promotor de la proteína X tuviera la secuencia consenso para un factor de transcripción Y, sin considerar si el factor de transcripción regula positiva o negativamente la transcripción de la proteína X.

El análisis de los datos experimentales corroboró que los estímulos [CD43-TCR] y [CD43+TCR], en los cuales el estímulo de CD43 es previo o simultáneo al del TCR, inducen una respuesta muy semejante cualitativa y cuantitativamente; que el estímulo sólo a través de CD43 induce cualitativamente aunque no cuantitativamente un patrón muy semejante a estos dos estímulos y que la respuesta aislada a las señales del TCR, es pobre. El análisis de los datos experimentales mostró que, la amplia respuesta no se vio polarizada hacia los linajes Th1 ó Th2 transcurridas 48 horas después del estímulo. Las señales generadas por la participación previa de CD43 a la del TCR indujeron la producción de citocinas tanto del

linaje Th1: IFN- γ , IL12, TNF- α y TNF- β /LT- α ; como del linaje Th2: IL-4, IL-13, IL-5, IL-10, IL-6. Cuando la participación de CD43 fue simultánea a la del TCR, tampoco se polarizó la respuesta, aunque fue menor el número de citocinas producidas. El tiempo de estímulo de 48 horas no es suficiente para inducir la polarización de la respuesta, debido a que los eventos como lo la acetilación y desmetilación, que favorecen/establecen la transcripción de genes de linajes específicos, ocurren en una ventana de tiempo mayor.

Esta respuesta de tipo Th0 era de esperarse pues los experimentos se realizaron en linfocitos T aislados de sangre periférica de individuos sanos. En efecto, en linfocitos T virgen (naïve), el locus del IFN- γ (cromosoma 12) interactúa con el locus Th2 (cromosoma 5) y esta interacción intercromosómica habilita al linfocito T virgen para expresar simultáneamente citocinas de ambos linajes en bajos niveles de forma inmediata tras la activación celular. Esto ocurre mediante la región controladora a distancia (LCR) ubicado en el locus Th2 y sitios hipersensibles del gen de IFN- γ . El desvanecimiento de las asociaciones intercromosómicas entre los loci Th2 e IFN- γ , seguidos del aumento de las asociaciones intracromosómicas para cada locus, beneficia la diferenciación tras la activación (Spilianakis et al., 2005). Así, la polarización celular, auto-regulable por las citocinas polarizantes respectivas, se establece a través de interacciones intracromosómicas entre LCRs y promotores, generando modificaciones epigenéticas que permiten el reclutamiento de complejos multiprotéicos y de factores de transcripción, para activar simultáneamente los genes del locus Th1 y reprimir los del Th2 en la diferenciación Th1 y viceversa para Th2.

De manera muy particular, cuando las señales de CD43 son simultáneas a las del TCR, la producción de TNF- β /LT- α disminuye de manera significativa. De hecho este es el único factor para el que se observa este comportamiento. Se discutirá más adelante algunas de las posibilidades para explicar este evento.

El análisis de agrupamientos permitió a su vez, identificar dos grupos de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento. Esta segregación parece depender directamente de las señales percibidas por las células en respuesta a los estímulos [CD43-TCR] y [CD43+TCR]. El primero, [CD43-TCR], en el

cual las señales de CD43 anteceden a las del TCR, produjo grandes cantidades de todos estos factores solubles, y el segundo, [CD43+TCR], en el cual ambas moléculas señalizan simultáneamente, produjo mayoritariamente aquellos comprendidos en el grupo II de la figura 5.2. Esta agrupación refleja diferencias a nivel de las señales biológicas generadas en función del momento en que las señales de CD43 son percibidas con respecto a las del TCR y sugiere que existe co-expresión de las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento incluidos dentro de cada grupo.

Para sustentar la co-expresión de los factores solubles identificados en respuesta a estos dos estímulos, se generó un segundo conjunto de datos, prediciendo los factores de transcripción que se podrían asociar al promotor de cada uno de los factores solubles del macroarreglo. La regulación de la transcripción es un evento muy dinámico y se regula a varios niveles. Los elementos *cis* pueden generar una regulación a pequeña escala cuando su localización y participación está asociada sólo a promotores proximales, o una escala más amplia (Poyatos and Hurst, 2006), cuando se localizan en elementos enhancers o en regiones controladoras distantes, a través de su participación sola o en clusters, observándose su efecto a nivel de remodelación de la cromatina y promoviendo el acercamiento de genes junto con la formación de "looping out" (Dean, 2006; Fraser and Bickmore, 2007). Si bien, nuestro análisis predictivo se realizó sólo sobre la región promotora de cada gen, identificando un conjunto de factores de transcripción que estarían actuando sobre elementos *cis* proximales, y que estarían regulando la transcripción, previa remodelación de la cromatina, debe considerarse también que la co-regulación de genes que se co-expresan ocurre a través de elementos *cis* distales. El análisis de regiones distales y en ellas, el de los elementos *cis* reguladores implicados se ha reportado solo para pocos loci.

El análisis de los factores de transcripción predichos en función de los distintos factores solubles identificados, generó un patrón de agrupamiento similar al de los factores solubles y las condiciones experimentales (Figura 5.2, APÉNDICE 4.3.2.2, y Figura 5.4. El hecho que los factores de transcripción y estímulos generen una agrupación similar a la observada a partir de las proteínas expresadas, sugiere que un conjunto de datos influye

en el otro. El que los factores de transcripción influyan en la transcripción de esos genes y que esto sea estímulo- dependiente, permite pensar que hay una coexpresión de las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, y que esta refleje una co-regulación de los genes involucrados. Así, ambos fenómenos, co-expresión y co-regulación estarían asociados.

Las señales resultantes de la estimulación a través de CD43 previa o simultánea respecto al reconocimiento específico del antígeno por parte del TCR, podrían reclutar un conjunto de factores de transcripción comunes, asociados con funciones activadoras o inhibitorias de la respuesta inmune, así como de otras respuestas biológicas tales como la percepción de estrés o de hipoxia.

La lista de los factores de transcripción y su asociación con diferentes factores solubles y/o estímulos se encuentra en la figura 5.3 y el APÉNDICE 4.3.2.2. Si bien todos estos factores de transcripción predichos por el mejor emparejamiento de la secuencia de reconocimiento consenso sobre el ADN, sólo son una aproximación del fenómeno de regulación que pudiera estar ocurriendo *in vivo*, dirigen la búsqueda experimental posterior hacia blancos definidos. Dada la amplitud de ésta lista, concentramos nuestro análisis en solo algunos de los factores de transcripción identificados, considerando su importancia en la toma de decisión de las células y el hecho que abren perspectivas muy novedosas acerca de las funciones de la molécula CD43 en células linfoides y no-linfoides.

Entre los factores importantes para la respuesta inmune se encuentra el factor CREB, miembro de la familia de factores de transcripción ATF/CREB. Estos factores pueden formar homo- y hetero-dímeros que se unen a la secuencia palindrómica TGACGTCA en el ADN conocida como CRE. CREB puede hetero-dimerizar con AP1 e interactuar también con el coactivador p300, activando la transcripción de la interleucina 2 (Butscher et al., 2001; De Cesare et al., 1999; Hai and Hartman, 2001; Haus-Seuffert and Meisterernst, 2000).

En relación al factor RBP-Jkappa, del cual se piensa se encuentra pre-unido al ADN de genes blanco, pasaría de ser un represor transcripcional a un transactivador a través de la vía canónica de señalización de Notch, al

interactuar con el dominio intracelular escindido de Noth. Se ha reportado su participación en la polarización hacia una respuesta Th2, al ser GATA3 uno de sus genes blanco a la vez que un factor central en la polarización de la respuesta Th2 (Amsen et al., 2007).

En lo que respecta a GATA3 y su participación en el establecimiento de una respuesta Th2, se ha descrito que favorece el remodelamiento de la estructura del gen de la interleucina 4 (IL-4). Por el contrario, su asociación directa sobre el LCR del locus Th2 no ha sido detectada, y sin embargo se especula una acción importante en el mantenimiento de la desmetilación de dicha región, más aún que su inicio (Kim et al., 2007).

Por otro lado, el factor HIF-1, activado en condiciones de hipoxia, promueve la transcripción de genes involucrados en diferentes funciones celulares como supervivencia, proliferación, apoptosis, metabolismo de glucosa y angiogénesis (Dery et al., 2005), regulando genes como VEGF, leptina (Cascio et al., 2008) y otros como IL-8 (Kim et al., 2006).

Entre los factores de transcripción predichos de manera específica para cada estímulo, y en el caso particular de las señales con la participación previa de CD43 a la del TCR, mencionaremos a los factores HiNF-C, XF1 y 2 y p53.

El factor HiNF-C se ha relacionado con la transcripción de la histona 4 al presentar afinidad por sitios consenso del factor Sp1, y se le ha atribuido una función auxiliar con los otros factores HiNF-A y HiNF-D, el último de éstos con un papel crucial en la transcripción de dicho gen (van Wijnen et al., 1989). Su predicción fue específica para TNF- β /LT- α y a través del estímulo solo o previo de CD43 al del TCR.

Los factores XF1 y 2 han sido relacionados con el metabolismo hepático de xenobióticos. Su especificidad por los elementos de respuesta XFE presentes en el promotor del gen del citocromo P450, CYP1A1, los clasifica como competidores del factor de transcripción Ah, activador de la transcripción de dicho gen (Saatcioglu et al., 1990). La predicción de este factor fue específica para leptina.

En respuesta a las señales de CD43 previas a las del TCR, encontramos el factor de transcripción p53 para el promotor de la interleucina 13 (IL-13).

Esta molécula ejerce sus funciones interactuando con otras proteínas y como factor de transcripción, presentando especificidad por múltiples blancos una vez que es fosforilado, acetilado o metilado. Este factor, que puede ser activado por diferentes señales de estrés como la vía de ERK (Yoon and Seger, 2006), actúa como activador o represor de una amplia variedad de blancos, los cuales participan principalmente en apoptosis, senescencia y arresto del ciclo celular (Riley et al., 2008; Vrba et al., 2008). Los elementos de respuesta a p53 se localizan esencialmente en la región río arriba del sitio de inicio de la transcripción, así como en regiones no codificantes. La presencia de un solo elemento de respuesta para p53 en la región promotora puede tener efecto en la transcripción, aunque su participación en clusters ocurre y en una configuración cabeza-cabeza, separada por una región espaciadora. Además, mediante interacciones proteína-proteína, puede unirse a regiones TATA y reclutar factores de la maquinaria basal, así como reclutar/activar a coactivadores como las histona acetil transferasas p300, CBP, incrementando la tasa de transcripción de los genes blanco.

Además de estos factores de transcripción, se identificaron factores de transcripción asociados con la generación de marcas epigenéticas de activación, las cuales favorecen la transcripción en respuesta a las señales de CD43 solas o cuando estas son simultáneas o anteceden las del TCR. Por mencionar un caso específico, la histona metil transferasa ASH1, miembro del grupo de proteínas tritorax, la cual mono- o di-metila específicamente a la lisina K36 de la histona 3 (H3) en mamíferos, favorece la remodelación de la cromatina (Tanaka et al., 2007).

En el locus TNF/LT, que codifica para TNF- α , TNF- β /LT- α y LT- β , la regulación intracromosómica de la transcripción ocurre a través de dos elementos enhancers distales conocidos como sitios hipersensibles (HS), de secuencia conservada no codificante entre humano y ratón, y que son susceptibles a remodelación de la cromatina tras el estímulo activador del TCR y de CD28. Las asas formadas entre estos sitios, permiten el control de la transcripción específica del gen TNF sin afectar la transcripción de los genes vecinos, induciendo además de marcas de activación sobre la

cromatina, y el reclutamiento específico del factor de transcripción NFATp (Tsytyskova et al., 2007). Nuestros resultados muestran que TNF α y TNF- β (LT- α) fueron inducidos por las señales dependientes de CD43 cuando estas se perciben de manera aislada o cuando las señales de CD43 anteceden a las del TCR. Pensar en una regulación por elementos distales a través de las señales de CD43 considerando la búsqueda sobre los sitios hipersensibles descritos queda como perspectiva.

Como se mencionó anteriormente, algunas de las citocinas se asocian en loci específicos y de acuerdo con el tipo de respuesta se han descrito algunos elementos reguladores. En lo que respecta a las quimiocinas, aunque existe el conocimiento de que éstas también se distribuyen en clusters, los dos principales localizados en los cromosomas 4 y 17, para las quimiocinas CXC y CC en el humano, aún no se han descrito elementos reguladores a distancia que controlen el establecimiento de interacciones intracromosomales beneficiando la expresión de uno u otro cluster. De manera similar esto ocurre para los factores de crecimiento en cuanto a que no existe la descripción de elementos reguladores a distancia, junto con el escaso conocimiento tanto de los factores *cis* y *trans* proximales en la regulación. Además de ello, no se ha descrito que estos se encuentren asociados en clusters. Aunque el conocimiento sobre elementos reguladores para quimiocinas y factores de crecimiento es escaso, especular en la existencia de elementos *cis* reguladores constituyendo o incluidos en regiones controladoras a distancia, dispuestos o favorecidos por una organización nuclear específica podría acercarnos al entendimiento de la pronta expresión de estas proteínas por efecto de las señales del estímulo de una molécula coestimuladora como CD43 a través de sus solas señales o del señalosoma activado por su co-participación con el TCR para el cual la temporalidad genera un claro efecto.

7. CONCLUSIONES

CD28 es considerada como la molécula accesoria cuyas señales son esenciales para complementar las señales generadas por las del TCR y favorecer la activación completa, diferenciación y proliferación de los linfocitos T, en respuesta a un antígeno dado.

Considerando el abanico de factores secretados y el vasto universo de factores transcripcionales y remodeladores de la cromatina predichos que las señales de CD43 generan de manera independiente o cuando anteceden o se combinan con las del TCR, nuestros resultados sugieren que el papel de CD43, como el de CD28, es el de regular la transcripción mediante el remodelamiento de la cromatina. Definir si cada una de estas moléculas recluta factores de transcripción específicos constituye el siguiente paso, tanto a través de un análisis predictivo basado en la respuesta de CD28, y mejor aún, comprobando el reclutamiento de dichos factores de transcripción *in vivo*. Esto adquiere aun mas relevancia si se considera que en el ratón deficiente de CD28, no se observa un fenotipo y que la explicación para ello reside en el hecho que, en esos animales, CD43 suple las funciones de CD28 (Sperling et al., 1995).

El análisis predictivo con el que se identificaron factores de transcripción asociados con el remodelamiento de la cromatina nos hace considerar que si las señales de CD43 permiten regular la transcripción mediante el remodelamiento de la cromatina, se explicaría por lo menos parcialmente el amplio efecto de expresión observado en linfocitos T. El panorama de los factores de transcripción predichos muestra el conjunto de elementos *trans* que podrían reclutarse por el efecto final de las señales inducidas por CD43 en cada estímulo; sin embargo, la experimentación será la que nos permitirá resolver cuáles de éstos son críticos y cuáles permisivos, su efecto como activadores o represores así como la cinética de reclutamiento, lo mismo que la de sus genes blanco expresados. Asi mismo, se podría incluso pensar, que además de su probable efecto sobre los promotores proximales de los genes inducidos, CD43 tenga efecto sobre elementos reguladores distales presentes en regiones LCR, o más aún, sobre elementos reguladores aún no descritos.

APÉNDICE 4.2 PROTOCOLO DE RAYBIOTECH PARA EL RECONOCIMIENTO DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO.

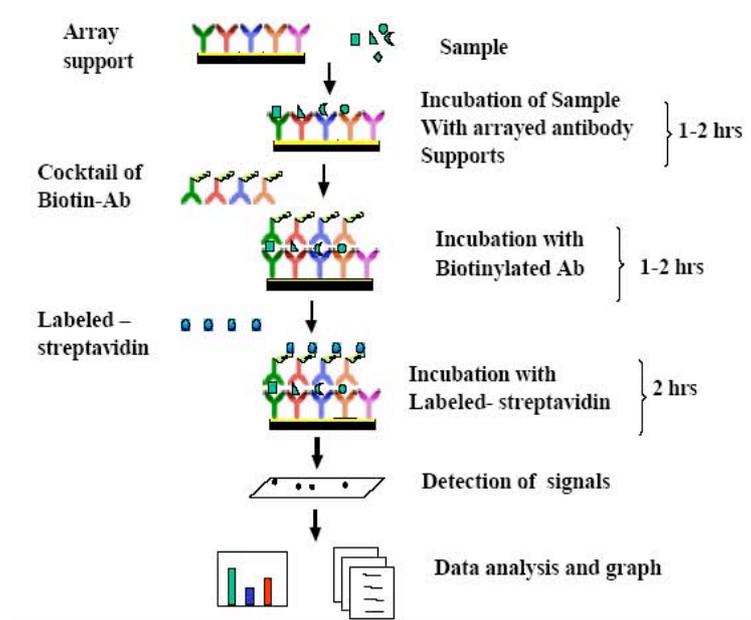


TABLA A4.2 DISTRIBUCIÓN DEL ARREGLO DE DETECCIÓN DE CITOCINAS/ QUIMIOCINAS/ FACTORES DE CRECIMIENTO HUMANOS.

RayBio® Human Cytokine Antibody Array III
RayBio® Human Cytokine Antibody Array 3.1
 Detect 42 Cytokines, Chemokines and Growth Factors in One Experiment

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l
1	Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO-α	I-309	IL-1α	IL-1 β
2	Pos	Pos	Neg	Neg	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO-α	I-309	IL-1α	IL-1 β
3	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12 p40p70	IL-13	IL-15	IFN-γ
4	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12 p40p70	IL-13	IL-15	IFN-γ
5	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1 α	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β1
6	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MDC	MIG	MIP-1 α	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF- β1
7	TNF-α	TNF-β	EGF	IGF-I	Angiogenin	Oncostatin M	Thrombopoietin	VEGF	PDGF BB	Leptin	Neg	Pos
8	TNF-α	TNF-β	EGF	IGF-I	Angiogenin	Oncostatin M	Thrombopoietin	VEGF	PDGF BB	Leptin	Neg	Pos

* Use array I, III, IV, V, VI, VII, VIII, 1000, 2000 for serum, plasma, condition medium, urine and all other body fluid samples

** Use array 1.1, 3.1, 4.1, 5.1, 6.1, 7.1, 8.1, 1000.1, 2000.1 for cell lysates and certain tissue lysates

8. BIBLIOGRAFIA

- Abbas A.K., Litchman A.H., Pober J.S. (2002). *Inmunología Celular y Molecular*. 4a. Edición. McGraw-Hill. España.
- Aguilar-Delfin I., Fierro N.A., Rosenstein Y. UCSD-Nature Molecule Pages. doi:10.1038/mp.a000565.01
<http://www.signaling-gateway.org/molecule/query?afcsid=A000565>
- Abramson, J.S., and Hudnori, H.R. (1995). Role of the sialophorin (CD43) receptor in mediating influenza A virus-induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction. *Blood* 85, 1615-1619.
- Allenspach, E.J., Cullinan, P., Tong, J., Tang, Q., Tesciuba, A.G., Cannon, J.L., Takahashi, S.M., Morgan, R., Burkhardt, J.K., and Sperling, A.I. (2001). ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* 15, 739-750.
- Amano, J., Morimoto, C., and Irimura, T. (2001). Intestinal epithelial cells express and secrete the CD43 glycoform that contains core 2 O-glycans. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 3, 723-728.
- Amsen, D., Antov, A., Jankovic, D., Sher, A., Radtke, F., Souabni, A., Busslinger, M., McCright, B., Gridley, T., and Flavell, R.A. (2007). Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* 27, 89-99.
- Andersson, C.X., Fernandez-Rodriguez, J., Laos, S., Sikut, R., Sikut, A., Baeckstrom, D., and Hansson, G.C. (2004). CD43 has a functional NLS, interacts with beta-catenin, and affects gene expression. *Biochemical and biophysical research communications* 316, 12-17.
- Ardman, B., Sikorski, M.A., Settles, M., and Staunton, D.E. (1990). Human immunodeficiency virus type 1-infected individuals make autoantibodies that bind to CD43 on normal thymic lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 172, 1151-1158.
- Baeckstrom, D., Zhang, K., Asker, N., Ruetschi, U., Ek, M., and Hansson, G.C. (1995). Expression of the leukocyte-associated sialoglycoprotein CD43 by a colon carcinoma cell line. *The Journal of biological chemistry* 270, 13688-13692.
- Bar-Joseph, Z., Gerber, G.K., Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Yoo, J.Y., Robert, F., Gordon, D.B., Fraenkel, E., Jaakkola, T.S., Young, R.A., *et al.* (2003). Computational discovery of gene modules and regulatory networks. *Nature biotechnology* 21, 1337-1342.
- Barat, C., and Tremblay, M.J. (2002). Engagement of CD43 enhances human immunodeficiency virus type 1 transcriptional activity and virus production that is induced upon TCR/CD3 stimulation. *The Journal of biological chemistry* 277, 28714-28724.
- Baum, L.G., Pang, M., Perillo, N.L., Wu, T., Delegeane, A., Uittenbogaart, C.H., Fukuda, M., and Seilhamer, J.J. (1995). Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *The Journal of experimental medicine* 181, 877-887.
- Bierer, B.E., Sleckman, B.P., Ratnofsky, S.E., and Burakoff, S.J. (1989). The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Annual review of immunology* 7, 579-599.
- Blue, M.L., Craig, K.A., Anderson, P., Branton, K.R., Jr., and Schlossman, S.F. (1988). Evidence for specific association between class I major histocompatibility antigens and the CD8 molecules of human suppressor/cytotoxic cells. *Cell* 54, 413-421.
- Brown, T.J., Shuford, W.W., Wang, W.C., Nadler, S.G., Bailey, T.S., Marquardt, H., and Mittler, R.S. (1996). Characterization of a CD43/leukosialin-mediated pathway for inducing apoptosis in human T-lymphoblastoid cells. *The Journal of biological chemistry* 271, 27686-27695.

Butscher, W.G., Haggerty, C.M., Chaudhry, S., and Gardner, K. (2001). Targeting of p300 to the interleukin-2 promoter via CREB-Rel cross-talk during mitogen and oncogenic molecular signaling in activated T-cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 27647-27656.

Carlsson, S.R., Sasaki, H., and Fukuda, M. (1986). Structural variations of O-linked oligosaccharides present in leukosialin isolated from erythroid, myeloid, and T-lymphoid cell lines. *The Journal of biological chemistry* 261, 12787-12795.

Cascio, S., Bartella, V., Auriemma, A., Johannes, G.J., Russo, A., Giordano, A., and Surmacz, E. (2008). Mechanism of leptin expression in breast cancer cells: role of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Oncogene* 27, 540-547.

Cellot, S., and Sauvageau, G. (2007). Zfx: at the crossroads of survival and self-renewal. *Cell* 129, 239-241.

Cheadle, C., Fan, J., Cho-Chung, Y.S., Werner, T., Ray, J., Do, L., Gorospe, M., and Becker, K.G. (2005). Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. *BMC genomics* 6, 75.

Chorvath, B., Hunakova, L., Turzova, M., Sulikova, M., Duraj, J., Speiser, P., and Sedlak, J. (1992). Monoclonal antibodies to two adhesive cell surface antigens (CD43 and CD59) with different distribution on hematopoietic and non-hematopoietic tumor cell lines. *Neoplasma* 39, 325-329.

Coffer, P.J., and Burgering, B.M. (2004). Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nature reviews* 4, 889-899.

Colobran, R., Pujol-Borrell, R., Armengol, M.P., and Juan, M. (2007). The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity. *Clinical and experimental immunology* 148, 208-217.

Cruz-Munoz, M.E., Salas-Vidal, E., Salaiza-Suazo, N., Becker, I., Pedraza-Alva, G., and Rosenstein, Y. (2003). The CD43 coreceptor molecule recruits the zeta-chain as part of its signaling pathway. *J Immunol* 171, 1901-1908.

Cyster, J.G., Shotton, D.M., and Williams, A.F. (1991). The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *The EMBO journal* 10, 893-902.

De Cesare, D., Fimia, G.M., and Sassone-Corsi, P. (1999). Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. *Trends in biochemical sciences* 24, 281-285.

Dean, A. (2006). On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends Genet* 22, 38-45.

del Rio, R., Rincon, M., Layseca-Espinosa, E., Fierro, N.A., Rosenstein, Y., and Pedraza-Alva, G. (2004). PKCtheta is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement. *Biochemical and biophysical research communications* 325, 133-143.

Delon, J., Kaibuchi, K., and Germain, R.N. (2001). Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* 15, 691-701.

Dery, M.A., Michaud, M.D., and Richard, D.E. (2005). Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 535-540.

Diehn, M., Alizadeh, A.A., Rando, O.J., Liu, C.L., Stankunas, K., Botstein, D., Crabtree, G.R., and Brown, P.O. (2002). Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11796-11801.

Dozmorov, M.G., Kyker, K.D., Hauser, P.J., Saban, R., Buethe, D.D., Dozmorov, I., Centola, M.B., Culkun, D.J., and Hurst, R.E. (2008). From microarray to biology: an integrated experimental, statistical and in silico analysis of how the extracellular matrix modulates the phenotype of cancer cells. *BMC bioinformatics* 9 Suppl 9, S4.

Dubois, L., and Vincent, A. (2001). The COE--Collier/Olf1/EBF--transcription factors: structural conservation and diversity of developmental functions. *Mechanisms of development* 108, 3-12.

Dure, M., and Macian, F. (2008). IL-2 signaling prevents T cell anergy by inhibiting the expression of anergy-inducing genes. *Molecular immunology*.

Dustin, M.L., and Springer, T.A. (1988). Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *The Journal of cell biology* 107, 321-331.

Eloranta, J.J., Meier, P.J., and Kullak-Ublick, G.A. (2005). Coordinate transcriptional regulation of transport and metabolism. *Methods in enzymology* 400, 511-530.

Fernandez-Rodriguez, J., Andersson, C.X., Laos, S., Baeckstrom, D., Sikut, A., Sikut, R., and Hansson, G.C. (2002). The leukocyte antigen CD43 is expressed in different cell lines of nonhematopoietic origin. *Tumour Biol* 23, 193-201.

Fields, P.E., Lee, G.R., Kim, S.T., Bartsevich, V.V., and Flavell, R.A. (2004). Th2-specific chromatin remodeling and enhancer activity in the Th2 cytokine locus control region. *Immunity* 21, 865-876.

Fierro, N.A., Pedraza-Alva, G., and Rosenstein, Y. (2006). TCR-dependent cell response is modulated by the timing of CD43 engagement. *J Immunol* 176, 7346-7353.

Fraser, P., and Bickmore, W. (2007). Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 447, 413-417.

Fratazzi, C., Manjunath, N., Arbeit, R.D., Carini, C., Gerken, T.A., Ardman, B., Remold-O'Donnell, E., and Remold, H.G. (2000). A macrophage invasion mechanism for mycobacteria implicating the extracellular domain of CD43. *The Journal of experimental medicine* 192, 183-192.

Fuhlbrigge, R.C., King, S.L., Sackstein, R., and Kupper, T.S. (2006). CD43 is a ligand for E-selectin on CLA+ human T cells. *Blood* 107, 1421-1426.

Fukuda, M., Carlsson, S.R., Klock, J.C., and Dell, A. (1986). Structures of O-linked oligosaccharides isolated from normal granulocytes, chronic myelogenous leukemia cells, and acute myelogenous leukemia cells. *The Journal of biological chemistry* 261, 12796-12806.

Giordanengo, V., Limouse, M., Desroys du Roure, L., Cottalorda, J., Doglio, A., Passeron, A., Fuzibet, J.G., and Lefebvre, J.C. (1995). Autoantibodies directed against CD43 molecules with an altered glycosylation status on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected CEM cells are found in all HIV-1+ individuals. *Blood* 86, 2302-2311.

Hahn, W.C., Rosenstein, Y., Calvo, V., Burakoff, S.J., and Bierer, B.E. (1992). A distinct cytoplasmic domain of CD2 regulates ligand avidity and T-cell responsiveness to antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 7179-7183.

Hai, T., and Hartman, M.G. (2001). The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273, 1-11.

Hartshorn, K.L., Liou, L.S., White, M.R., Kazhdan, M.M., Tauber, J.L., and Tauber, A.I. (1995). Neutrophil deactivation by influenza A virus. Role of hemagglutinin binding to specific sialic acid-bearing cellular proteins. *J Immunol* 154, 3952-3960.

Haus-Seuffert, P., and Meisterernst, M. (2000). Mechanisms of transcriptional activation of cAMP-responsive element-binding protein CREB. *Molecular and cellular biochemistry* 212, 5-9.

Hirano, K., Miki, Y., Hirai, Y., Sato, R., Itoh, T., Hayashi, A., Yamanaka, M., Eda, S., and Beppu, M. (2005). A multifunctional shuttling protein nucleolin is a macrophage receptor for apoptotic cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 39284-39293.

- Hiscott, J. (2007). Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation. *The Journal of biological chemistry* 282, 15325-15329.
- Honda, K., and Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature reviews* 6, 644-658.
- Hsieh, M.M., Lupas, G., Rychlik, J., Dziennis, S., Habecker, B.A., and Lewis, E.J. (2005). ERK1/2 is a negative regulator of homeodomain protein Arx/Phox2a. *Journal of neurochemistry* 94, 1719-1727.
- Huber, B.R., and Bulyk, M.L. (2006). Meta-analysis discovery of tissue-specific DNA sequence motifs from mammalian gene expression data. *BMC bioinformatics* 7, 229.
- Janeway C.A. Travers P., Walport M., Shlomli M. 2001. *Immunobiology*. 5a. Edición. Garland Science. USA.
- Johnson, G.G., Mikulowska, A., Butcher, E.C., McEvoy, L.M., and Michie, S.A. (1999). Anti-CD43 monoclonal antibody L11 blocks migration of T cells to inflamed pancreatic islets and prevents development of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 163, 5678-5685.
- Kaiko, G.E., Horvat, J.C., Beagley, K.W., and Hansbro, P.M. (2008). Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123, 326-338.
- Kaneko, T., Hosokawa, H., Yamashita, M., Wang, C.R., Hasegawa, A., Kimura, M.Y., Kitajima, M., Kimura, F., Miyazaki, M., and Nakayama, T. (2007). Chromatin remodeling at the Th2 cytokine gene loci in human type 2 helper T cells. *Molecular immunology* 44, 2249-2256.
- Kim, K.S., Rajagopal, V., Gonsalves, C., Johnson, C., and Kalra, V.K. (2006). A novel role of hypoxia-inducible factor in cobalt chloride- and hypoxia-mediated expression of IL-8 chemokine in human endothelial cells. *J Immunol* 177, 7211-7224.
- Kim, S.T., Fields, P.E., and Flavell, R.A. (2007). Demethylation of a specific hypersensitive site in the Th2 locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 17052-17057.
- Kim, T.H., and Ren, B. (2006). Genome-wide analysis of protein-DNA interactions. *Annual review of genomics and human genetics* 7, 81-102.
- Layseca-Espinosa, E., Pedraza-Alva, G., Montiel, J.L., del Rio, R., Fierro, N.A., Gonzalez-Amaro, R., and Rosenstein, Y. (2003). T cell aggregation induced through CD43: intracellular signals and inhibition by the immunomodulatory drug leflunomide. *Journal of leukocyte biology* 74, 1083-1093.
- Lee, G.R., Kim, S.T., Spilianakis, C.G., Fields, P.E., and Flavell, R.A. (2006). T helper cell differentiation: regulation by cis elements and epigenetics. *Immunity* 24, 369-379.
- Lefebvre, V., Dumitriu, B., Penzo-Mendez, A., Han, Y., and Pallavi, B. (2007). Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39, 2195-2214.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., Sanjabi, S., Robertson, A.K., and Flavell, R.A. (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology* 24, 99-146.
- Losy, J., Maehlen, J., Olsson, T., and Kristensson, K. (1989). Distribution of leukosialin (W3/13)-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Journal of neurocytology* 18, 71-76.
- Macian, F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature reviews* 5, 472-484.
- Manjunath, N., Correa, M., Ardman, M., and Ardman, B. (1995). Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature* 377, 535-538.

Manjunath, N., Johnson, R.S., Staunton, D.E., Pasqualini, R., and Ardman, B. (1993). Targeted disruption of CD43 gene enhances T lymphocyte adhesion. *J Immunol* *151*, 1528-1534.

Mantovani, A., Bonecchi, R., and Locati, M. (2006). Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nature reviews* *6*, 907-918.

Matsumoto, H., Daikoku, T., Wang, H., Sato, E., and Dey, S.K. (2004). Differential expression of ezrin/radixin/moesin (ERM) and ERM-associated adhesion molecules in the blastocyst and uterus suggests their functions during implantation. *Biology of reproduction* *70*, 729-736.

Matsumoto, M., Atarashi, K., Umemoto, E., Furukawa, Y., Shigeta, A., Miyasaka, M., and Hirata, T. (2005). CD43 functions as a ligand for E-Selectin on activated T cells. *J Immunol* *175*, 8042-8050.

Matsumoto, M., Shigeta, A., Furukawa, Y., Tanaka, T., Miyasaka, M., and Hirata, T. (2007). CD43 collaborates with P-selectin glycoprotein ligand-1 to mediate E-selectin-dependent T cell migration into inflamed skin. *J Immunol* *178*, 2499-2506.

Matsumoto, M., Shigeta, A., Miyasaka, M., and Hirata, T. (2008). CD43 plays both antiadhesive and proadhesive roles in neutrophil rolling in a context-dependent manner. *J Immunol* *181*, 3628-3635.

Mentzer, S.J., Remold-O'Donnell, E., Crimmins, M.A., Bierer, B.E., Rosen, F.S., and Burakoff, S.J. (1987). Sialophorin, a surface sialoglycoprotein defective in the Wiskott-Aldrich syndrome, is involved in human T lymphocyte proliferation. *The Journal of experimental medicine* *165*, 1383-1392.

Misawa, Y., Nagaoka, H., Kimoto, H., Ishii, Y., Kitamura, K., Tsunetsugu-Yokota, Y., Shibuya, M., and Takemori, T. (1996). CD43 expression in a B cell lymphoma, WEHI 231, reduces susceptibility to G1 arrest and extends survival in culture upon serum depletion. *European journal of immunology* *26*, 2573-2581.

Moran, J.A., Dahl, E.L., and Mulcahy, R.T. (2002). Differential induction of mafF, mafG and mafK expression by electrophile-response-element activators. *The Biochemical journal* *361*, 371-377.

Murayama, A., Sakura, K., Nakama, M., Yasuzawa-Tanaka, K., Fujita, E., Tateishi, Y., Wang, Y., Ushijima, T., Baba, T., Shibuya, K., *et al.* (2006). A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory. *The EMBO journal* *25*, 1081-1092.

Nathan, C., Xie, Q.W., Halbwachs-Mecarelli, L., and Jin, W.W. (1993). Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43 (sialophorin, leukosialin). *The Journal of cell biology* *122*, 243-256.

Nomiyama, H., Mera, A., Ohneda, O., Miura, R., Suda, T., and Yoshie, O. (2001). Organization of the chemokine genes in the human and mouse major clusters of CC and CXC chemokines: diversification between the two species. *Genes and immunity* *2*, 110-113.

Northrop, J.K., Thomas, R.M., Wells, A.D., and Shen, H. (2006). Epigenetic remodeling of the IL-2 and IFN-gamma loci in memory CD8 T cells is influenced by CD4 T cells. *J Immunol* *177*, 1062-1069.

Onami, T.M., Harrington, L.E., Williams, M.A., Galvan, M., Larsen, C.P., Pearson, T.C., Manjunath, N., Baum, L.G., Pearce, B.D., and Ahmed, R. (2002). Dynamic regulation of T cell immunity by CD43. *J Immunol* *168*, 6022-6031.

Ostberg, J.R., Dragone, L.L., Driskell, T., Moynihan, J.A., Phipps, R., Barth, R.K., and Frelinger, J.G. (1996). Disregulated expression of CD43 (leukosialin, sialophorin) in the B cell lineage leads to immunodeficiency. *J Immunol* *157*, 4876-4884.

Pallant, A., Eskenazi, A., Mattei, M.G., Fournier, R.E., Carlsson, S.R., Fukuda, M., and Frelinger, J.G. (1989). Characterization of cDNAs encoding human leukosialin

and localization of the leukosialin gene to chromosome 16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 1328-1332.

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

Parnes, J.R. (1989). Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Advances in immunology* 44, 265-311.

Pedraza-Alva, G., Merida, L.B., Burakoff, S.J., and Rosenstein, Y. (1996). CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase. *The Journal of biological chemistry* 271, 27564-27568.

Pedraza-Alva, G., Merida, L.B., Burakoff, S.J., and Rosenstein, Y. (1998). T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation. *The Journal of biological chemistry* 273, 14218-14224.

Pedraza-Alva, G., Sawasdikosol, S., Liu, Y.C., Merida, L.B., Cruz-Munoz, M.E., Ocegüera-Yanez, F., Burakoff, S.J., and Rosenstein, Y. (2001). Regulation of Cbl molecular interactions by the co-receptor molecule CD43 in human T cells. *The Journal of biological chemistry* 276, 729-737.

Pevsner J. 2003. *Bioinformatics and Functional Genomics*. ISBN: 9780471210047. DOI: 10.1002/047145916X. John Wiley & Sons, Inc.

Perillo, N.L., Pace, K.E., Seilhamer, J.J., and Baum, L.G. (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378, 736-739.

Piller, F., Piller, V., Fox, R.I., and Fukuda, M. (1988). Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* 263, 15146-15150.

Poyatos, J.F., and Hurst, L.D. (2006). Is optimal gene order impossible? *Trends Genet* 22, 420-423.

Reiss, D.J., Baliga, N.S., and Bonneau, R. (2006). Integrated biclustering of heterogeneous genome-wide datasets for the inference of global regulatory networks. *BMC bioinformatics* 7, 280.

Remenyi, A., Scholer, H.R., and Wilmanns, M. (2004). Combinatorial control of gene expression. *Nature structural & molecular biology* 11, 812-815.

Remold-O'Donnell, E., Kenney, D.M., Parkman, R., Cairns, L., Savage, B., and Rosen, F.S. (1984). Characterization of a human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *The Journal of experimental medicine* 159, 1705-1723.

Remold-O'Donnell, E., Zimmerman, C., Kenney, D., and Rosen, F.S. (1987). Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 70, 104-109.

Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 402-412.

Roberts, S.G. (2005). Transcriptional regulation by WT1 in development. *Current opinion in genetics & development* 15, 542-547.

Rosenstein, Y., Park, J.K., Hahn, W.C., Rosen, F.S., Bierer, B.E., and Burakoff, S.J. (1991). CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* 354, 233-235.

Rosenstein, Y., Ratnofsky, S., Burakoff, S.J., and Herrmann, S.H. (1989). Direct evidence for binding of CD8 to HLA class I antigens. *The Journal of experimental medicine* 169, 149-160.

Rossetti, S., Hoogeveen, A.T., Liang, P., Stanciu, C., van der Spek, P., and Sacchi, N. (2007). A distinct epigenetic signature at targets of a leukemia protein. *BMC genomics* 8, 38.

Ruhl, S., Cisar, J.O., and Sandberg, A.L. (2000). Identification of polymorphonuclear leukocyte and HL-60 cell receptors for adhesins of *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces naeslundii*. *Infection and immunity* 68, 6346-6354.

Saatcioglu, F., Perry, D.J., Pasco, D.S., and Fagan, J.B. (1990). Multiple DNA-binding factors interact with overlapping specificities at the aryl hydrocarbon response element of the cytochrome P450IA1 gene. *Molecular and cellular biology* 10, 6408-6416.

Santamaria, M., Lopez-Beltran, A., Toro, M., Pena, J., and Molina, I.J. (1996). Specific monoclonal antibodies against leukocyte-restricted cell surface molecule CD43 react with nonhematopoietic tumor cells. *Cancer research* 56, 3526-3529.

Santana, M.A., Pedraza-Alva, G., Olivares-Zavaleta, N., Madrid-Marina, V., Horejsi, V., Burakoff, S.J., and Rosenstein, Y. (2000). CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NFkappa B transcription factors in human T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 275, 31460-31468.

Santangelo, S., Cousins, D.J., Winkelmann, N.E., and Staynov, D.Z. (2002). DNA methylation changes at human Th2 cytokine genes coincide with DNase I hypersensitive site formation during CD4(+) T cell differentiation. *J Immunol* 169, 1893-1903.

Savage, N.D., Kimzey, S.L., Bromley, S.K., Johnson, K.G., Dustin, M.L., and Green, J.M. (2002). Polar redistribution of the sialoglycoprotein CD43: implications for T cell function. *J Immunol* 168, 3740-3746.

Serrador, J.M., Nieto, M., Alonso-Lebrero, J.L., del Pozo, M.A., Calvo, J., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Lozano, F., Gonzalez-Amaro, R., Sanchez-Mateos, P., *et al.* (1998). CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* 91, 4632-4644.

Sikut, R., Andersson, C.X., Sikut, A., Fernandez-Rodriguez, J., Karlsson, N.G., and Hansson, G.C. (1999). Detection of CD43 (leukosialin) in colon adenoma and adenocarcinoma by novel monoclonal antibodies against its intracellular domain. *International journal of cancer* 82, 52-58.

Sleckman, B.P., Peterson, A., Foran, J.A., Gorga, J.C., Kara, C.J., Strominger, J.L., Burakoff, S.J., and Greenstein, J.L. (1988). Functional analysis of a cytoplasmic domain-deleted mutant of the CD4 molecule. *J Immunol* 141, 49-54.

Sperling, A.I., Green, J.M., Mosley, R.L., Smith, P.L., DiPaolo, R.J., Klein, J.R., Bluestone, J.A., and Thompson, C.B. (1995). CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28. *The Journal of experimental medicine* 182, 139-146.

Spilianakis, C.G., and Flavell, R.A. (2004). Long-range intrachromosomal interactions in the T helper type 2 cytokine locus. *Nature immunology* 5, 1017-1027.

Spilianakis, C.G., and Flavell, R.A. (2007). Epigenetic regulation of *Ifng* expression. *Nature immunology* 8, 681-683.

Spilianakis, C.G., Laloti, M.D., Town, T., Lee, G.R., and Flavell, R.A. (2005). Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* 435, 637-645.

Stockl, J., Majdic, O., Kohl, P., Pickl, W.F., Menzel, J.E., and Knapp, W. (1996). Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation. *The Journal of experimental medicine* 184, 1769-1779.

Stockton, B.M., Cheng, G., Manjunath, N., Ardman, B., and von Andrian, U.H. (1998). Negative regulation of T cell homing by CD43. *Immunity* 8, 373-381.

Stormo, G.D. (2000). DNA binding sites: representation and discovery. *Bioinformatics (Oxford, England)* 16, 16-23.

Takai, Y., Kitano, K., Terawaki, S., Maesaki, R., and Hakoshima, T. (2008). Structural basis of the cytoplasmic tail of adhesion molecule CD43 and its binding to ERM proteins. *Journal of molecular biology* 381, 634-644.

Tanaka, Y., Katagiri, Z., Kawahashi, K., Kioussis, D., and Kitajima, S. (2007). Trithorax-group protein ASH1 methylates histone H3 lysine 36. *Gene* 397, 161-168.

Tanay, A., Sharan, R., and Shamir, R. (2002). Discovering statistically significant biclusters in gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 18 Suppl 1, S136-144.

Thomas, R.M., Gao, L., and Wells, A.D. (2005). Signals from CD28 induce stable epigenetic modification of the IL-2 promoter. *J Immunol* 174, 4639-4646.

Todeschini, A.R., Nunes, M.P., Pires, R.S., Lopes, M.F., Previato, J.O., Mendonca-Previato, L., and DosReis, G.A. (2002). Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal trans-sialidase: involvement of CD43 signaling. *J Immunol* 168, 5192-5198.

Tsytsykova, A.V., Rajsbaum, R., Falvo, J.V., Ligeiro, F., Neely, S.R., and Goldfeld, A.E. (2007). Activation-dependent intrachromosomal interactions formed by the TNF gene promoter and two distal enhancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 16850-16855.

Urano-Tashiro, Y., Yajima, A., Takashima, E., Takahashi, Y., and Konishi, K. (2008). Binding of the *Streptococcus gordonii* DL1 surface protein Hsa to the host cell membrane glycoproteins CD11b, CD43, and CD50. *Infection and immunity* 76, 4686-4691.

van den Berg, T.K., Nath, D., Ziltener, H.J., Vestweber, D., Fukuda, M., van Die, I., and Crocker, P.R. (2001). Cutting edge: CD43 functions as a T cell counterreceptor for the macrophage adhesion receptor sialoadhesin (Siglec-1). *J Immunol* 166, 3637-3640.

van Wijnen, A.J., van Gurp, M.F., de Ridder, M.C., Tufarelli, C., Last, T.J., Birnbaum, M., Vaughan, P.S., Giordano, A., Krek, W., Neufeld, E.J., *et al.* (1996). CDP/cut is the DNA-binding subunit of histone gene transcription factor HiNF-D: a mechanism for gene regulation at the G1/S phase cell cycle transition point independent of transcription factor E2F. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11516-11521.

van Wijnen, A.J., Wright, K.L., Lian, J.B., Stein, J.L., and Stein, G.S. (1989). Human H4 histone gene transcription requires the proliferation-specific nuclear factor HiNF-D. Auxiliary roles for HiNF-C (Sp1-like) and HiNF-A (high mobility group-like). *The Journal of biological chemistry* 264, 15034-15042.

Viger, R.S., Guittot, S.M., Anttonen, M., Wilson, D.B., and Heikinheimo, M. (2008). Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 22, 781-798.

Vrba, L., Junk, D.J., Novak, P., and Futscher, B.W. (2008). p53 induces distinct epigenetic states at its direct target promoters. *BMC genomics* 9, 486.

Widelitz, R.B. (2004). Regulating the regulators: routing the Wnt-beta-catenin--Lef signals. *The Journal of investigative dermatology* 123, VIII-X.

Wong, R.C., Remold-O'Donnell, E., Vercelli, D., Sancho, J., Terhorst, C., Rosen, F., Geha, R., and Chatila, T. (1990). Signal transduction via leukocyte antigen CD43 (sialophorin). Feedback regulation by protein kinase C. *J Immunol* 144, 1455-1460.

Woodman, R.C., Johnston, B., Hickey, M.J., Teoh, D., Reinhardt, P., Poon, B.Y., and Kubes, P. (1998). The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 188, 2181-2186.

Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1998). Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *The Journal of cell biology* 140, 885-895.

Yoon, S., and Seger, R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 24, 21-44.