



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CD43, una molécula regulada
por la vía de los TLRs.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A:

Natasha Mylena Quevedo Castañón



DIRECTOR DE TESIS:

Doctora Yvonne Jane Rosenstein Azoulay
2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN	3
<hr/>	
INTRODUCCIÓN	4
<hr/>	
SISTEMA INMUNOLÓGICO: CÉLULAS Y RECEPTORES	4
RECEPTORES DE LA INMUNIDAD INNATA	8
<i>RECEPTORES EXTRACELULARES QUE RECONOCEN CARBOHIDRATOS DE ORIGEN MICROBIANO.</i>	8
<i>RECEPTORES INTRACELULARES IMPLICADOS EN EL RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS BACTERIANOS</i>	10
<i>RECEPTORES INTRACELULARES DE RECONOCIMIENTO DE RNA VIRAL</i>	11
RECEPTORES TIPO TOLL (TLR)	12
<i>GENERALIDADES</i>	12
<i>TLR2</i>	15
<i>TLR3</i>	16
<i>TLR4</i>	16
<i>TLR9</i>	17
LOS TLRs EN LINFOCITOS T	17
CD43 UNA MOLÉCULA CO-RECEPTORA DE LINFOCITOS T	19
HIPÓTESIS	25
<hr/>	
OBJETIVO GENERAL	25
<hr/>	
OBJETIVOS PARTICULARES	25
METODOLOGÍA	26
<hr/>	
CÉLULAS	26
<i>PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA</i>	26
<i>CULTIVO DE CÉLULAS TUMORALES</i>	27
RT-PCR	28
<i>EXTRACCIÓN DE RNA</i>	28
<i>SÍNTESIS DE CDNA</i>	29
<i>PCR</i>	29
ACTIVACIÓN CELULAR	31
INMUNOTINCIÓN	32
RESULTADOS	34
<hr/>	
EXPRESIÓN BASAL DE CD43 EN LINFOCITOS T NORMALES Y EN CÉLULAS TUMORALES LINFOIDES (T, B Y MONOCITOS/MACRÓFAGOS)	34
EXPRESIÓN DE LOS DISTINTOS TLRs EN LAS CÉLULAS EMPLEADAS EN ESTE ESTUDIO	36
EL ZYMO SAN INDUCE LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD43 EN LINFOCITOS T	37
EL ZYMO SAN REGULA LA EXPRESIÓN DE CD43 EN DIVERSOS TIPOS DE CÉLULAS LINFOIDE	39
EL DÍMERO TLR2/TLR6 MODULA LA EXPRESIÓN DE CD43	41
LAS SEÑALES DE DISTINTOS TLRs DISMINUYEN LA EXPRESIÓN DE CD43	43
LAS SEÑALES DE LOS TLRs MODULAN SELECTIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE CD43	44
DISCUSIÓN	46
<hr/>	

<u>PERSPECTIVAS</u>	50
----------------------------	-----------

<u>REFERENCIAS</u>	52
---------------------------	-----------

RESUMEN

CD43 es una glicoproteína transmembranal tipo I, presente en todas las células del sistema inmunológico, y cuya función no está totalmente entendida. En linfocitos T, funciona como molécula correceptora del TCR, permitiéndole a la célula sensar su medio ambiente y así complementar el montaje de una eficiente respuesta inmunológica. No obstante, se desconoce la función de CD43 en relación con otros tipos de receptores, como por ejemplo, los receptores tipo toll (TLRs), los cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). La expresión de CD43 es regulada por Zymosan [un componente microbiano reconocido por diferentes receptores de patrones moleculares como los TLRs] en neutrófilos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de CD43 en la membrana celular de monocitos y linfocitos T y B humanos normales y tumorales expuestos a distintos PAMPs que son ligandos de diferentes TLRs. Encontramos que, al igual de lo que sucede con neutrófilos, la expresión de CD43 disminuye rápidamente (30 minutos) cuando las células son expuestas a Zymosan (TLR2/6), RNA de doble cadena (TLR3), LPS (TLR4) y DNA CpG (TLR9). Este fenómeno no ocurre por pérdida del epítipo de CD43 reconocido por el anticuerpo anti-CD43 L10, ya que se observa lo mismo con otros anticuerpos que reconocen otros epítipos de CD43. Asimismo, se evaluó si el nivel de expresión de otras moléculas correceptoras de la superficie celular como son CD2, CD3, CD28 y PD1 también variaba en respuesta a las señales de los TLRs. Los resultados obtenidos indican que, a los tiempos a los que se realizaron los experimentos (hasta 2 horas de estímulo), no se encontró disminución en los niveles de expresión de estas moléculas. En conjunto estos resultados indican que, además de las células de la respuesta inmune innata, CD43 es también un blanco particular de las señales de los TLRs en las células responsables de la respuesta inmune adaptativa.

INTRODUCCIÓN

Sistema inmunológico: células y receptores

El sistema inmune es el encargado de proteger al organismo de moléculas y sustancias potencialmente nocivas, gracias al reconocimiento de antígenos virales, bacterianos, o bien derivados de protozoarios, hongos e incluso células propias. El sistema inmune está conformado por órganos, tejidos y diversos tipos celulares. Los órganos pueden ser clasificados funcionalmente en dos grupos: órganos linfoides primarios, donde ocurre el desarrollo de los linfocitos y órganos linfoides secundarios, donde los linfocitos maduran y reconocen eficientemente a sus antígenos a través de interacciones con las células presentadoras de antígenos (APC, del inglés Antigen Presenting Cells). Las células que constituyen el sistema inmune son denominadas leucocitos y se dividen en monocitos (en el torrente sanguíneo) o macrófagos (en tejidos), neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células cebadas, células dendríticas, células asesinas naturales NK (NK del inglés, Natural Killer) y linfocitos. Estos últimos, constituyen del 20% al 40% de los leucocitos y se subdividen en dos poblaciones: linfocitos B y linfocitos T ¹⁻³.

La defensa frente a organismos patógenos está mediada por interacciones ordenadas y reguladas de los diferentes tipos celulares. El primer nivel de defensa lo constituyen las barreras, que pueden ser mecánicas (piel, cutícula, vellosidades) o químicas (saliva, lágrimas, mucosas). Inmediatamente después entra en acción la inmunidad innata, la cual se desencadena tan pronto como el organismo censa la presencia de un agente microbiano. Este nivel de defensa es disparado por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs/PAMPs, del inglés Microorganism-Associated Molecular Patterns y Pathogen-Associated Molecular Patterns), los cuales son específicos y rápidamente diferenciables de las moléculas de los hospederos. Los términos MAMPs y PAMPs, aunque no tienen exactamente la misma connotación, tienden a usarse indistintamente. Ejemplo de los MAMPs/PAMPs son: RNA viral de doble cadena, dinucleótidos CpG no metilados comunes en el DNA bacteriano, lipopolisacárido (LPS), ácido lipotenoico (LTA), muramil dipéptido (MDP), flagelina y quitina. Los MAMPs/PAMPs son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR, del inglés Pattern Recognition Receptors), propiciando la activación de

las células que los expresan. Entre los PRRs mejor estudiados se encuentran los receptores tipo Toll (TLR) y de los cuales hablaremos más adelante, el receptor de manosa (MR) y los receptores tipo NOD (NLRs) ⁴.

Después de censar al patógeno a través de las señales generadas por los PRRs, las células del sistema inmune innato (neutrófilos, células cebadas, células NK, y macrófagos), fagocitan al agente patógeno a través de una estructura especializada denominada el fagosoma, el cual al unirse con el lisosoma, da lugar al fagolisosoma, en donde el agente invasor es expuesto a enzimas proteolíticas y a especies reactivas de oxígeno que promueven la muerte del patógeno. A la vez que se encargan de “neutralizar” al patógeno, estas células liberan al medio extracelular diversas proteínas entre las cuales destacan las quimiocinas/citocinas y péptidos antimicrobianos. Estas son moléculas con actividad quimioattractante y generan una señal de alarma cuya consecuencia inmediata es el reclutamiento de más células con capacidad fagocítica al sitio de infección, favoreciendo así una reacción inflamatoria ¹.

Además de los PRRs que reconocen MAMPs/PAMPs en la superficie del agente microbiano, el sistema del complemento participa en el reconocimiento y eliminación del agente patógeno. Algunos de los componentes de este sistema son serin-proteasas que provocan cortes proteolíticos entre los componentes mismos del sistema, generando péptidos que “opsonizan” o marcan al patógeno, y lo vuelven más visible para las células fagocíticas, mientras que otros componentes son proteínas formadoras de poro, las cuales, al insertarse en la superficie del patógeno causan su muerte. Además de atacar directamente al patógeno y a través de algunos péptidos generados por la actividad de serin-proteasas de las moléculas del complemento, la función efectora del sistema del complemento es estimular un mayor proceso inflamatorio, generando señales para reclutar y activar leucocitos que darán lugar a la respuesta inmune adaptativa. De esta manera, se genera un puente de comunicación e interacción entre la inmunidad innata y la adaptativa ⁵.

La inmunidad adaptativa se desarrolla tardíamente como respuesta a la infección y tiene mecanismos de defensa sofisticados que le confieren niveles exquisitos de especificidad y memoria. El número total de especificidades antigénicas, denominado repertorio de linfocitos, es extremadamente amplio y está determinado por el alto grado de polimorfismo

del receptor para el antígeno de células T (TCR) y de las células B (BcR)^{1,3}. La inmunidad adaptativa está orquestada por células APC, linfocitos T y linfocitos B. Los linfocitos B y los anticuerpos que producen constituyen el brazo efector de la inmunidad humoral, siendo ésta el principal mecanismo de defensa frente a microorganismos extracelulares¹. Los linfocitos T son responsables de las respuestas mediadas por células, tales como la citotoxicidad y la cooperación con otras células, como los linfocitos B, la cual es necesaria para el desarrollo de la respuesta humoral.

Los linfocitos T se generan en la médula ósea y su maduración ocurre en el timo. Expresan en su membrana el receptor para el antígeno de células T (TCR), a través del cual reconocen al antígeno presentado por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés Major Histocompatibility Complex) de las APC. Los linfocitos T, se subdividen en poblaciones funcionalmente distintas: los linfocitos T colaboradores (Th o CD4+) y los linfocitos T citotóxicos (Tc o CD8+). Los linfocitos Th reconocen péptidos antigénicos presentados por el MHC clase II de la APC. Al activarse se expanden clonalmente y secretan citocinas que son capaces de activar a otras células del sistema inmune. De acuerdo a los efectos de las citocinas secretadas, se han definido cuatro subpoblaciones funcionales de linfocitos T CD4+. Los linfocitos Th1 participan en la respuesta a patógenos intracelulares secretando IL-2 e IFN- γ . Los linfocitos Th2, involucrados en la protección ante nemátodos y en alergias, producen IL-4, IL-5 e IL-13. Los linfocitos Th17 participan en la respuesta inflamatoria contra patógenos extracelulares y en enfermedades autoinmunes secretando IL-17, IL-22, IL-6 y TNF- α . Los linfocitos T reguladores (Treg) controlan la activación de los linfocitos T por medio de las citocinas IL-10 y TGF- β ⁶⁻⁸. Finalmente, los linfocitos T citotóxicos (Tc o CD8+) reconocen péptidos antigénicos presentados por el MHC clase I de la APC, y son importantes en la defensa contra células infectadas. Los linfocitos CD8+ se subdividen en dos subpoblaciones: los linfocitos Tc1, que corresponden a la mayoría de linfocitos T CD8 y secretan IFN- γ y TNF- α y los linfocitos Tc2 que producen IL-4 y ayudan a la secreción de inmunoglobulinas⁹.

La activación de los linfocitos T comienza con el reconocimiento específico del antígeno a través del complejo macromolecular TCR-CD3. En esta interacción, el TCR reconoce al antígeno y el complejo CD3 transmite las señales que se generan en respuesta al reconocimiento del antígeno. Estas señales dependen de la actividad regulada de diferentes

enzimas (quinasas y fosfatasa), así como de la disponibilidad de múltiples proteínas adaptadoras que, en conjunto, le permiten a la célula generar una respuesta específica contra el antígeno¹. Para que las señales del TCR lleven a estímulos de proliferación y diferenciación, se requiere además de señales generadas por la interacción de moléculas correceptoras o accesorias como CD2, CD4, CD8, CD28 y CD43, entre otras, las cuales interactúan con sus ligandos en las APC y modulan las señales percibidas por el TCR, generando una activación sostenida, o bien apagando las señales. Por lo tanto, las moléculas accesorias proporcionan una retroalimentación positiva o negativa de las señales del TCR² (Fig. 1). Sin embargo, además de reconocer específicamente al antígeno a través del TCR, los linfocitos T han conservado la capacidad de expresar receptores para MAMPS/PAMPS, cuyas funciones empiezan solo a entenderse.

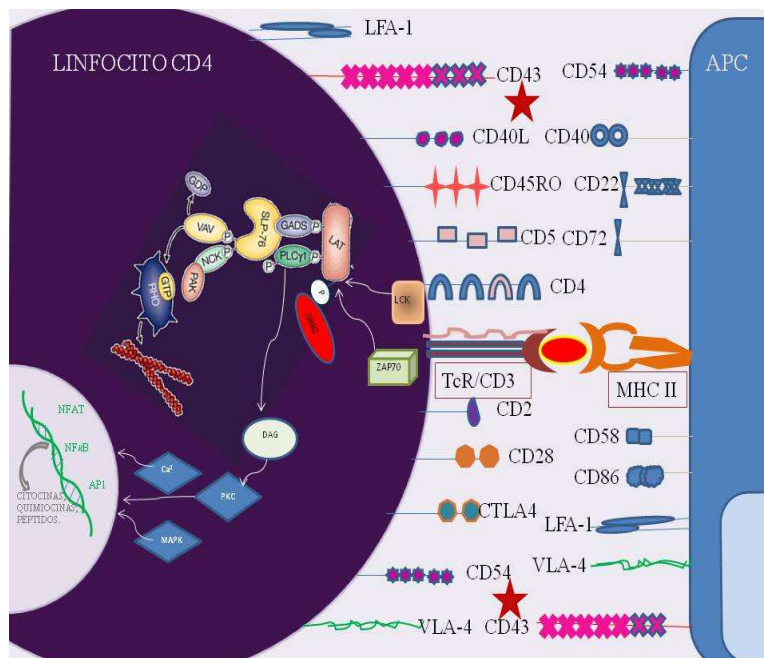


Figura 1. Reconocimiento antigénico.

Los primeros acontecimientos bioquímicos durante el reconocimiento del antígeno por el complejo TCR-CD3 son la activación de proteínas tirosin cinasas (PTK) que fosforilan a los ITAMS del complejo TCR-CD3. Lck fosforila los ITAMS de las cadenas ζ , los cuales funcionan como sitios de acoplamiento para la tirosin cinasa ZAP-70, cuyos sustratos son las proteínas adaptadoras LAT y SLP-76. LAT, es fosforilada por ZAP-70, y ésta incorpora a la membrana el factor de intercambio GTP/GDP de Ras denominado Sos. Éste cataliza el intercambio de GDP por GTP en Ras, activando la cascada de las MAPKs. LAT también es capaz de incorporar al complejo a PLC γ 1, la cual es fosforilada por ZAP-70. PLC γ 1 activada cataliza la hidrólisis de PIP2, generando IP3 y DAG. IP3, produce un rápido aumento del Ca²⁺ citosólico, el cual actúa como una molécula de señalización uniéndose a la calmodulina, que activa a NFAT, el cual se transloca a núcleo y junto con otros factores de transcripción regula la entrada al ciclo celular, así como la producción de citocinas y quimiocinas.

Receptores de la inmunidad innata

En contraste a lo que se había pensado anteriormente y como mencionamos en un principio, el sistema inmune innato tiene un alto grado de especificidad que le permite discriminar entre lo propio y lo ajeno. Esta discriminación se basa, en gran medida, en la participación de receptores conservados evolutivamente que reconocen a los MAMPs/PAMPs. Éstos se clasifican de acuerdo a los componentes microbianos que son capaces de reconocer y se han identificado diferentes familias, entre las que destacan las de los receptores tipo C-lectinas, los NOD, RLR y los TLR ¹⁰.

Receptores extracelulares que reconocen carbohidratos de origen microbiano

Los receptores tipo C-lectina (CLR, del inglés C-type Lectin Receptors) comprenden una gran familia de receptores que se unen a carbohidratos en una forma dependiente de calcio. Contienen un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD, del inglés Carbohydrate-Recognition Domains) altamente conservado entre los miembros de la familia, los cuales constan de uno o más dominios CRD ^{11,12}. Estos receptores participan en el reconocimiento de carbohidratos presentes en diversos agentes microbianos y en la modulación de la respuesta inmune innata. Los CLR son expresados por la mayoría de las células de origen hematopoyético. Entre ellos mencionaremos a Dectina-1, Dectina-2, el receptor de manosa y DC-SIGN (Fig. 2).

Dectina-1 es una proteína transmembranal de tipo II y se encuentra N-glicosilada. Tiene un dominio extracelular del tipo C-lectina a través del cual reconoce β -glucanos, una región transmembranal y una región citoplasmática que contiene una secuencia (YXXXI/LX7YXXL), que se asemeja a la motivos ITAMs de otros receptores como DAP12, FC γ R y CD3 ζ ¹³. Dectin-1 se expresa en monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos B y linfocitos T CD4+ ¹¹. A través de su dominio citoplasmático puede inducir señalización intracelular, resultando en una variedad de respuestas celulares que se han caracterizado principalmente utilizando Zymosan, un derivado de pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* ¹⁴. Estas respuestas incluyen la producción de especies reactivas de oxígeno, fagocitosis, endocitosis y la activación del factor de transcripción NF- κ B, induciendo la secreción de citocinas y quimiocinas, incluyendo IL-23, IL-2, IL-6, TNF- α , IL-10 ¹⁵.

Dectin-2 es una proteína transmembranal de tipo II, cuyo dominio de reconocimiento a carbohidratos se asocia preferentemente a residuos de manosa y fucosa de hongos. Está presente principalmente en las células mieloides y durante la maduración de monocitos, reconoce preferentemente estructuras de manosa e interactúa con el Fc γ R para inducir la producción de TNF- α ¹⁶.

El receptor de manosa de macrófagos es el receptor de lectina mejor caracterizado. Es una proteína tipo I de 180 kDa con una N-cisteína terminal junto a un dominio tipo fibronectina II y ocho dominios de reconocimiento de carbohidratos. Este receptor contiene múltiples ligandos exógenos (virus, bacterias y hongos), así como ligandos endógenos (lutropina, mieloperoxidasa y tiroglobulina). Aunque el receptor de manosa es predominantemente expresado por los macrófagos, también se expresa en la superficie de otras células, tales como las del endotelio hepático y linfático ¹². La activación del receptor de manosa promueve la fagocitosis y endocitosis a través del sistema de complemento ¹⁷.

DC-SIGN es una proteína transmembranal de tipo II, tiene un dominio tipo C-lectina separado de la membrana por una región de tallo y se ha sugerido que forma tetrámeros. Reconoce manosa y es expresado principalmente en células dendríticas y monocitos inmaduros. Tiene como ligandos endógenos a ICAM-3 e ICAM-2 y como ligandos exógenos glicoproteínas de virus, bacterias y hongos. Promueve la activación de NF- κ B, favoreciendo la secreción de IL-10 ^{18,19}.

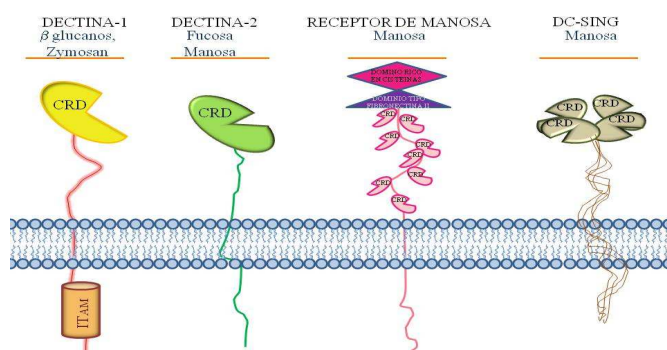


Figura 2. Miembros de la Familia de Receptores tipo C-lectinas.

La estructura característica de esta familia es que son receptores extracelulares que contienen uno o más dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) y colas citoplasmáticas de transducción de señales. Dectina-1 además posee motivos ITAM.

Receptores intracelulares implicados en el reconocimiento de patógenos bacterianos

La familia de los NLRs (del inglés, Nucleotide-binding domain Leucine-rich repeat containing Receptors) son receptores intracelulares que reconocen PAMPs y moléculas endógenas en el citosol. Esta familia de receptores está caracterizada por tener tres dominios: un dominio C-terminal rico en repeticiones de leucinas, responsable de la detección del ligando y autorregulación, un dominio central de unión a nucleótidos y un dominio N-terminal. La familia de los NLRs consta de 5 subfamilias que se distinguen entre sí por su dominio N-terminal; éstas son los NLRA (que contienen el dominio ácido de transactivación, AD), los NLRB (con un dominio de repeticiones del inhibidor de apoptosis de baculovirus, BIR), los NLRC (con un dominio de unión a caspasas, CARD), los NLRP (con un dominio de PYRINA) y los NLRX (que contienen un dominio desconocido) (Fig. 3). Se han identificado al menos 23 representantes de esta familia de receptores ¹⁰.

La activación de los NLRs sirve como una plataforma molecular para los complejos de proteínas, tales como el inflamasoma (por NALPs-NAIPs) o nodosoma (por NOD) mediante la activación de distintas moléculas adaptadoras. De igual manera, regulan la activación de rutas de señalización como NF- κ B, caspasa 1 y MAPK, que conducen a la expresión de proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria o la actividad antimicrobiana.

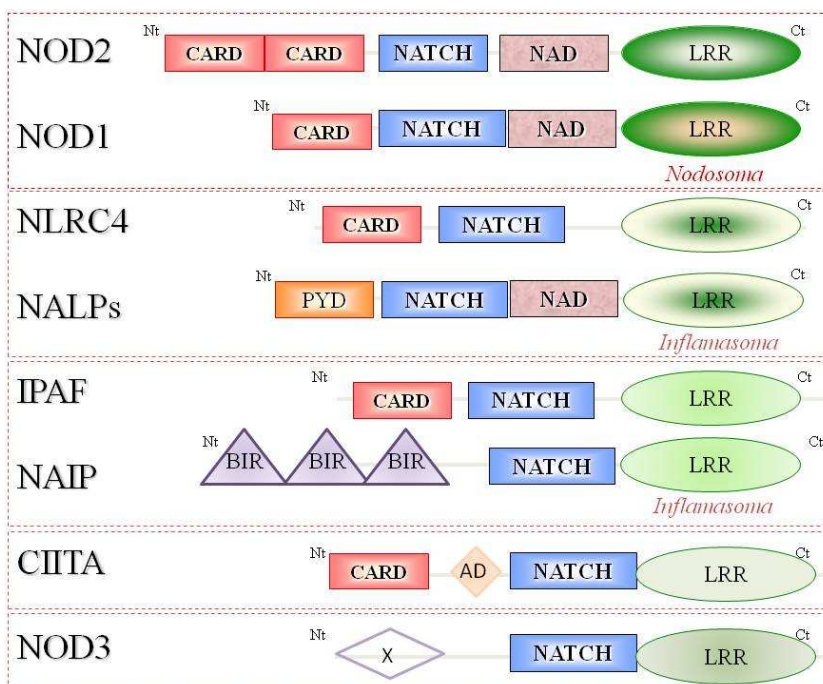


Figura 3. Miembros de la familia de los NLR.

Esta familia de receptores está caracterizada por la presencia de tres dominios: un dominio C-terminal rico en repeticiones de leucinas, un dominio central de unión a nucleótidos (NATCH o NOD) y un dominio N-terminal que inicia la señalización, el cual puede ser un dominio ácido de transactivación (AD), un dominio de repeticiones del inhibidor de apoptosis de baculovirus (BIR), un dominio de unión a caspasas (CARD), un dominio de PYRINA o un dominio desconocido (X).

Receptores intracelulares de reconocimiento de RNA viral

Otros receptores intracelulares endosómicos son los receptores de RNA (RLR, del inglés, RNA-Like Receptors), los cuales se conforman de un dominio CARD, un dominio DExD/H de reconocimiento a helicasa que tiene un motivo de unión a ATP, y un dominio represor RD (RD, del inglés, Repressor Domain) ubicado en el extremo C-terminal. Los receptores RLR reconocen secuencias de dinucleótidos GU y AU solo de origen viral. Al igual que los receptores intracelulares tipo NOD, los RLR inducen la vía de las MAP cinasas, la activación de NF- κ B y la subsecuente producción de citocinas²⁰⁻²². Esta familia consta de dos miembros, RIG-1 y Mda5 (Fig. 4).

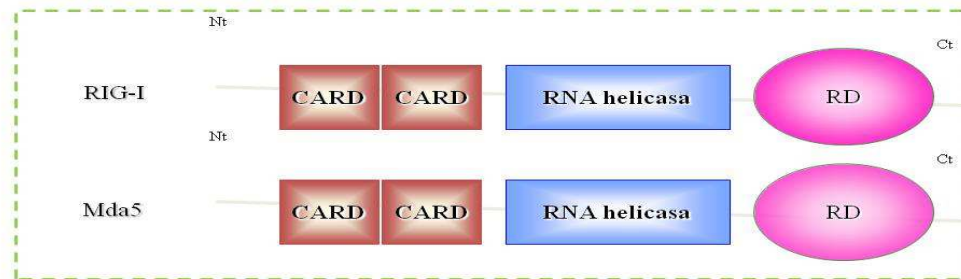


Figura 4. Miembros de la familia de los RLR.

Los miembros de esta familia se conforman de un dominio CARD, un dominio DExD/H de reconocimiento a helicasa y un dominio represor RD. Aquí se muestran los dos representantes de la familia, RIG-I y Mda5.

Receptores tipo Toll (TLR)

Generalidades

Los receptores tipo Toll (TLRs), son una familia de PPRs que cuenta con 13 miembros identificados en mamíferos, de los cuales TLR1-TLR9 se presentan conservadamente en humanos y ratones, TLR10 parece ser exclusivo de humanos y TLR 11, 12 y 13, exclusivos de ratón¹⁰. Los TLRs están expresados en todos los tipos celulares incluyendo las células de origen hematopoyético^{4,23,24}. La expresión de los TLRs no es estática sino que se modula con rapidez en respuesta a patógenos, citocinas, y estrés ambiental. La vía de señalización generada por el estímulo de los TLRs produce una cascada de retroalimentación positiva que favorece su propia expresión (Kumar et al 2009).

Los TLRs son glicoproteínas de tipo I y pertenecen a la superfamilia del receptor para interleucina-1 (IL-1R). La región intracelular de los TLRs contiene motivos ricos en leucina (LRR), mientras que la región extracelular tiene tres dominios globulares del tipo de las inmunoglobulinas. Dentro de la región intracelular hay un dominio homólogo al receptor de IL-1 llamado TIR (del inglés Toll/IL-1R), fundamental para la transducción de señales de estas moléculas²⁵⁻²⁷. Este dominio varía en su secuencia y longitud entre los miembros de la familia de los TLRs. En el dominio TIR se encuentran tres cajas constitutivas: la caja 1(GYKLC-RD-PG) que está presente en toda la familia, y las cajas 2 y 3 que contienen aminoácidos esenciales para la señalización vía TLRs (Fig.5)²⁸⁻³¹.

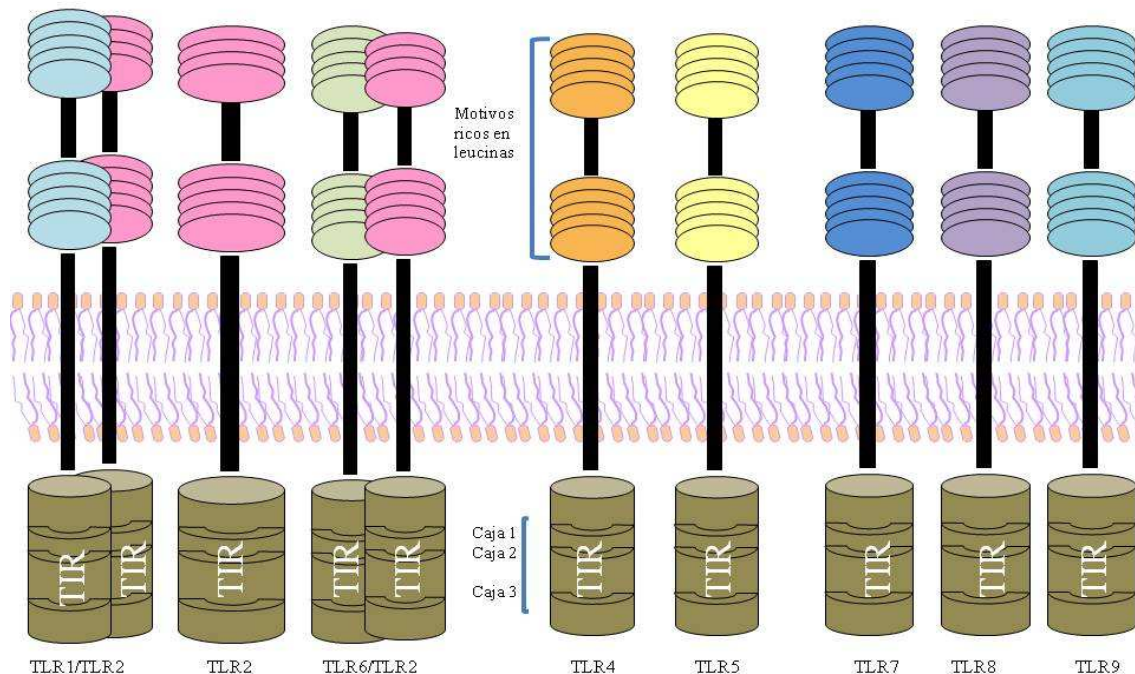


Figura 5. Estructura de los TLRs.

Los receptores tipo Toll son glicoproteínas de tipo I. Constan de una región extracelular, un dominio transmembranral y un dominio citoplasmático necesario para la transducción de señales.

La señalización mediada por los TLRs se inicia a través del dominio TIR, el cual interactúa con proteínas citoplasmáticas adaptadoras como: MyD88, TIRAP/LMA y TRIF. Las vías de señalización activadas por los TLRs incluyen la vía de las MAPK y la activación del factor de transcripción NF- κ B, que en conjunto llevan a la producción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, péptidos antimicrobianos y otras moléculas de defensa ¹⁰ (Fig. 6). La vía de PI-3K regula negativamente la vía de los TLR, ya que al promover un aumento en la fosforilación de AKT favorece la fosforilación de IKK ^{32,33}. Modificaciones en el dominio TIR causan deficiencias en la transducción del mensaje iniciado por el reconocimiento del ligando. Por ejemplo, mutaciones en el dominio TIR de TLR4 murino, impiden a los macrófagos reaccionar ante la presencia de LPS; asimismo, las mismas modificaciones en la secuencia de aminoácidos en TLR2 murino, inhiben la respuesta a levaduras y bacterias Gram-positivas ³⁴.

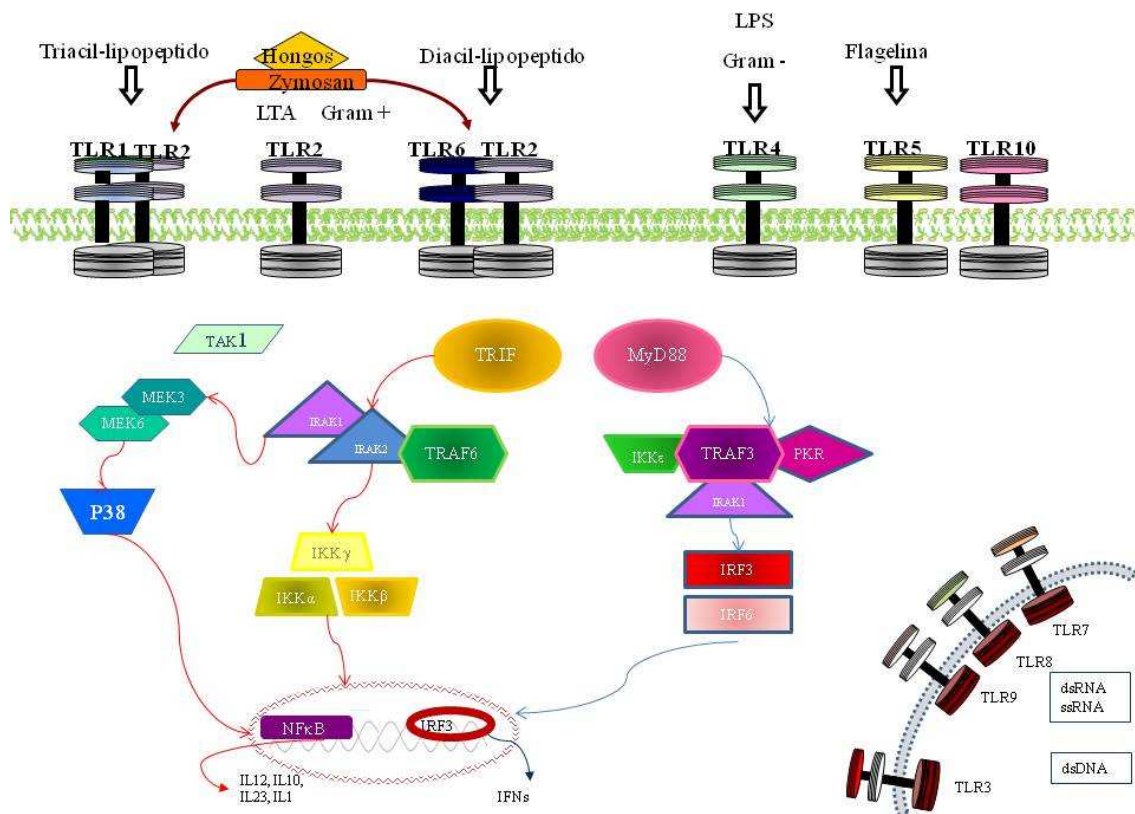


Figura 6. Vía de señalización de los TLRs.

En respuesta a la activación a través de los TLRs se pueden inducir dos vías de señalización: una vía dependiente de Myd88 (myeloid differentiation marker 88), y una vía independiente de Myd88, en la que participa la molécula adaptadora TRIF. TLR4, TLR2/TLR6, TLR2/TLR1 y TLR5 pueden inducir estas dos vías. TLR7, TLR8 y TLR9 parecen requerir de Myd88 para señalizar y TLR3 señaliza solamente a través de la vía TRIF-TRAM. La activación de las diferentes vías converge sobre las proteínas IRAK (IL-1R associated kinase), activándose primero IRAK4, luego IRAK1 y finalmente IRAK2. IRAK1 puede dirigir la respuesta celular hacia la activación de NF- κ B directamente, o a través de la vía de las MAPKs y la subsiguiente regulación de la expresión de citocinas. La vía independiente de Myd88 conduce a la activación de IRF3 y a la producción de IFN- β .

La localización de los TLR en las células es diversa, se pueden encontrar a nivel de membrana (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10) o en fagosomas (TLR 3, 7, 8, 9), donde reconocen diferentes ligandos como se muestra en la Tabla1. En base a su secuencia primaria, los TLRs se dividen en subfamilias que reconocen MAMPs/PAMPs relacionados: la subfamilia constituida por TLR1, TLR2 y TLR6, que reconoce lípidos, la subfamilia de TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 que reconoce RNA de doble cadena y de cadena simple, así como DNA y CpG de virus. Por su parte, TLR4 reconoce una colección diversa de ligandos como lipopolisacárido (LPS), paclitaxel o taxol (inhibidor de la mitosis, ampliamente utilizado en quimioterapia), la proteína de fusión del virus sincicial respiratorio,

fibronectina y proteínas de choque térmico, todas con diferentes estructuras. Por el contrario, TLR5 reconoce únicamente flagelina. Para los fines de este trabajo nos enfocamos en las respuestas generadas por el dímero TLR 2/6, TLR4, TLR3 y TLR9.

Tabla 1. Expresión de los TLRs

TLR	Expresión en células	Localización celular	Ligando	Referencias
TLR1	Macrófagos, células dendríticas (CD), monocitos	Extracelular	Triacilipopéptidos	35
TLR2	Linfocitos T, Macrófagos, Monocitos, CD, Linfocitos B	Extracelular	Lipoproteínas, Peptidoglicanos, Ácido Lipotéico, Glicolípidos, Fosfolípidos de Glicoinositol, Zymosan, Porinas, HSP70	36,37,35,38-45
TLR3	Linfocitos T, Macrófagos, Monocitos, CD,	Endosomal	RNA de doble cadena	46
TLR4	Linfocitos T, Macrófagos, Monocitos, CD,	Extracelular	Lipopolisacáridos, Taxol, Proteínas del virus sincicial, HSP60-70, <i>Chlamydia pneumoniae</i> , Fibronectina y Fibrinógeno	47-55
TLR5	Linfocitos T, B, Macrófagos, Monocitos, CD,	Extracelular	Flagelina	32
TLR6	Linfocitos T, B, Macrófagos, Monocitos, CD	Extracelular	Diacil lipopéptido Zymosan	38,56,57,35,58
TLR7	Linfocitos T, Macrófagos, Monocitos, CD	Endosomal	RNA de cadena sencilla	59,60
TLR8	Macrófagos, monocitos CD, Linfocitos B	Endosomal	RNA de cadena sencilla	61
TLR9	Linfocitos T, Macrófagos, monocitos	Endosomal	CpG DNA	62,62
TLR10	Linfocitos T	Endosomal	No determinado	

TLR2

TLR2 posee la mayor gama de reconocimiento de PAMPs debido a que puede interactuar con otros TLRs. TLR2 juega un papel importante en la detección de bacterias Gram-positivas y participa en el reconocimiento de una variedad de componentes microbianos, como ácido lipotéico (LTA), lipoproteínas, peptidoglicanos (PG), así como el

reconocimiento de patógenos como: *Borrelia burgdorferi*, *Listeria monocytogenes*, y *Mycoplasma fermentans*^{37,44,63}.

TLR2 interacciona física y funcionalmente con TLR1 y TLR6 los cuales están implicados en la discriminación de sutiles cambios en la porción de lípidos en lipoproteínas. El dímero TLR1/TLR2 reconoce lipoproteínas triaciladas y el dímero TLR6/TLR2 reconoce lipoproteínas diaciladas, así como Zymosan, un compuesto formado por componentes de pared de *S. cerevisiae*^{64,65,58}.

TLR3

TLR3 se expresa mayoritariamente en las células dendríticas (CD), y en una variedad de epitelios, incluidas la córnea, las vías respiratorias, la vesícula biliar, las células intestinales, la vagina y el cuello uterino, los cuales funcionan como eficaces barreras contra la infección. Los dsRNA, junto con su análogo sintético ácido poliinosinedeoxycytidylico (poli I: C), son un potente inductor de respuestas de IFNs y son reconocidos por TLR3⁴⁶. Los dsRNA pueden ser generados durante la infección viral como un paso intermedio en la replicación de los virus de ssRNA por la transcripción simétrica de DNA en los virus. La expresión del TLR3 es rápida y dramáticamente regulada por el tratamiento con poli I: C o IFN- α/β ^{66,67}.

TLR4

TLR4 fue el primer y más estudiado en la familia de estos receptores debido a que reconoce lipopolisacárido (LPS), un componente de la pared celular externa de las bacterias Gram-negativas. También conocido por ser una endotoxina, LPS es generalmente el más potente entre los inmunoestimulantes derivados de pared celular. Una porción de lípidos de LPS, denominado lípido A, es el responsable de la mayoría de los fenómenos asociados a patógenos Gram-negativos. Además, cuenta con un dominio central de oligosacáridos y el antígeno O. El LPS también es reconocido por CD14 en macrófagos, cuya función es concentrarlo en la superficie celular para que sea reconocido por el complejo formado por TLR4 y MD2. Al igual que TLR2, TLR4 presenta ligandos patógenos fungales como *S.cerevisiae* y *Candida albicans*^{68,48,69,56}.

TLR9

TLR9 reconoce dinucleótidos CpG presentes en el DNA genómico de bacterias ^{70,71}. TLR9 promueve la producción de citocinas inflamatorias tales como: IFN- α e IL-10 ⁷²⁻⁷⁵. TLR9 reconoce también DNA de parásitos protozoarios como *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* y *Plasmodium falciparum* ⁷⁶. Varios reportes han sugerido que TLR9 también puede reconocer el DNA de hongos como *Candida albicans*, *fumigatus* y *C. neoformans* ^{77,78}.

Los TLRs en linfocitos T

A pesar de que se ha dividido arbitrariamente la respuesta inmunológica en innata y adaptativa, es difícil concebir que estas dos funciones se realicen de modo autónomo e independiente. Tan es así, que recientemente se ha encontrado que las células de la respuesta inmune adaptativa expresan receptores considerados como específicos de la respuesta inmune innata, disipando la frontera entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

En los linfocitos T se ha observado la expresión de TLR1-10. Los análisis de qPCR, a partir de mRNA muestran la presencia de TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 9 en las células T de sangre periférica, aunque en distintos niveles de acuerdo a la subpoblación de linfocitos (Tabla 2). En linfocitos CD4 murinos sin estimular, están presentes TLR 4, 5 y 9 y en linfocitos T CD8 se encuentran TLR 1, 2, 6, 7 y 9 ⁷⁹⁻⁸¹. En linfocitos humanos, TLR2 está constitutivamente expresado en CD4 con mayor presencia que en los linfocitos CD8 de memoria ⁸². En células T CD25+CD4+ (Treg), se encontró la expresión de TLR5 ⁸⁰ y altos niveles de TLR8 ⁸³. En linfocitos de origen murino también se observó esta expresión diferencial entre subpoblaciones: en Treg vírgenes se encontraron TLR 1, 2, 3, 6, 7, mientras que en Treg estimuladas los más expresados fueron TLR 4, 5 y 9 ⁸⁴. Las diferencias en la expresión de los TLRs también se observa entre las células T $\gamma\delta$, las cuales expresan en mayor cantidad TLR 3 ⁸⁵. Estas diferencias en la expresión de los TLRs pueden corresponder a posibles diferencias funcionales en las distintas subpoblaciones.

Tabla 2. Expresión de TLRs en linfocitos T

Células		Especie	TLR
LINFOCITOS T $\alpha\beta$	CD4	Ratón	TLR1, TLR2, TLR6*, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 y TLR9
		Humano	TLR1, TLR2, TLR3, TLR5 y TLR9*, TLR4, TLR6, TLR7 y TLR8
	CD8	Ratón	TLR2, TLR4*
		Humano	TLR1, TLR2, TLR3, TLR5 y TLR9*, TLR6 y TLR10
	T reg	Ratón	TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 y TLR9
		Humano	TLR2, TLR4, TLR5 y TLR8
LINFOCITOS T $\gamma\delta$		Humano	TLR2, TLR3, TLR5*

* Expresión elevada

Los ligandos específicos de los TLRs promueven la activación de los linfocitos T en combinación con las señales del TCR. Por ejemplo, Pam3C el cual es reconocido por el heterodímero de TLR1/TLR2 favorece la producción de citocinas y la proliferación de células T CD4+ y CD8+ ^{86,87,79,88}.

Los mismos efectos ocurren en respuesta a los lípidos de la superficie de *Borrelia burgdorferi*, el agente causal de la enfermedad de Lyme, a través de las señales de TLR2 ⁸⁹. Asimismo, otros ligandos de TLR como flagelina (TLR5) y resiquimod (TLR7 y TLR8) aumentan la proliferación y producción de IFN- γ , mientras que el LPS estimula la producción de perforina en células T CD4+ ⁹⁰. Además, los CpGs promueven, vía TLRs, la proliferación de células T y la producción de citocinas en ausencia de células presentadoras de antígeno ⁹¹. Por último, el ligando de TLR3 y TLR9, poli (I: C), favorece la supervivencia de las células CD4+.

Por otro lado, en pacientes con enfermedades infecciosas se han reportado importantes alteraciones en la expresión de los TLRs en células T. Ejemplo de esto es que pacientes que tienen infección crónica por el virus de la hepatitis C expresan niveles más elevados de mRNA de varios TLR como TLR2, TLR4 y TLR9 en comparación con el control de personas sanas ⁹². Igualmente, aumenta la expresión proteica de TLR2, 3 y 5 en células T CD8+ en amígdalas infectadas por *Streptococcus* ^{93,94}. La señalización vía TLR2, 5 y 8 contrarresta la capacidad supresora de las células Treg: TLR5 promueve la activación de las células Treg, aumentando la expresión de FOXP3, pero la actividad supresora de Treg podría

ser revertida directamente por TLR5, TLR3 y TLR8^{95,80,96}. Además los ratones deficientes de TLR2, tienen significativamente menos células Treg, y la administración de ligandos TLR2 promueve un mayor número de Treg⁹⁰. Así, los ligandos para TLR tienen la capacidad de actuar directamente sobre las células Treg para modular la respuesta inmune⁹⁷.

Asimismo, la combinación de las señales del TCR y los TLRs modifican la respuesta de los linfocitos. Al estimular vía TCR junto con poli (I: C), se promueve la translocación de TLR3 del endosoma a la superficie celular⁹⁰. Sin embargo, las bases moleculares para la regulación de los TLR dependiente del TCR no se han investigado hasta la fecha.

CD43 una molécula co-receptora de linfocitos T

Además de los receptores específicos de MAMPS/PAMPS, los linfocitos T expresan en su superficie una colección variada y compleja de moléculas que regulan la interacción con el medio ambiente. En conjunto con las moléculas del complejo TCR-CD3, responsable de la especificidad antigénica, las llamadas moléculas accesorias modulan las señales del TCR, aunque también señalizan independientemente; ejemplos de estas moléculas son CD2, CD28 o CD43, las cuales le proporcionan a las células información adicional del entorno. Las moléculas accesorias y el TCR generan señales intracelulares que, en conjunto, le permiten a la célula tomar decisiones y responder a la señal percibida.

La molécula CD43 (sialoforina, leucosialina o gp115) es una molécula accesoria que se expresa sobre la superficie de todas las células hematopoyéticas, con excepción de eritrocitos y de linfocitos B no activados^{98,99}. Es una molécula rígida y alargada que se proyecta 45nm más allá de la superficie celular¹⁰⁰ que, por su tamaño y abundancia, cubre el 28% de la superficie celular de los linfocitos T. CD43 tiene dos glicofomas, dependiendo del tipo de oligosacáridos: una de 113-123 kDa y otra de 130-135 kDa. La isoforma de 130 kDa contiene principalmente hexasacáridos NeuAc(α 2-3)-Gal(β 1-3)[NeuAc (α 2-3)]Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6) GalNac, mientras que la isoforma de 115 kDa contiene casi exclusivamente a los tetrasacáridos NeuAc (α 2-3)-Gal(β 1-3)[NeuAc (β 2-6)]GalNac¹⁰¹. Estos cambios en la glicosilación están mediados por la 2 β -1,6-N-acetilglucosamiltransferasa (C2GnT)¹⁰². En monocitos y linfocitos T CD4⁺ no activados se ha reportado la expresión de la isoforma de 115 kDa, mientras que en linfocitos T CD4⁺

activados y CD8⁺, células B activadas, plaquetas y neutrófilos, la isoforma mayoritaria es la de 130 kDa ¹⁰³. El dominio extracelular de CD43 consta de 235 aminoácidos, de los cuales uno de cada cuatro son residuos de prolinas, serinas o treoninas. Las prolinas proporcionan rigidez a la molécula, mientras que las serinas y treoninas son sitios potenciales de uniones O-glicosídicas con el carbohidrato N-acetil-galactosamina (GalNac), al cual se unen residuos de ácido siálico que le confieren una carga negativa a la molécula. El dominio transmembranal consta de 23 aminoácidos ^{104,105}.

El dominio intracelular de CD43 está formado de 123 aminoácidos, entre los cuales destaca una región rica en prolinas a la cual se asocian las cinasas LcK y Fyn a través de sus dominios SH3 ^{106,107}, así como once residuos de serina y seis residuos de treonina potencialmente fosforilables por proteínas de la familia de PKC. Este dominio también presenta una secuencia de señalización nuclear (NLS), enmascarada por un sitio de unión a proteínas adaptadoras del citoesqueleto ERMs (Ezrina-Radixina-Moesina) ¹⁰⁸. Adicionalmente, hay otro dominio de unión a ERMs, cuya función no se ha descrito.

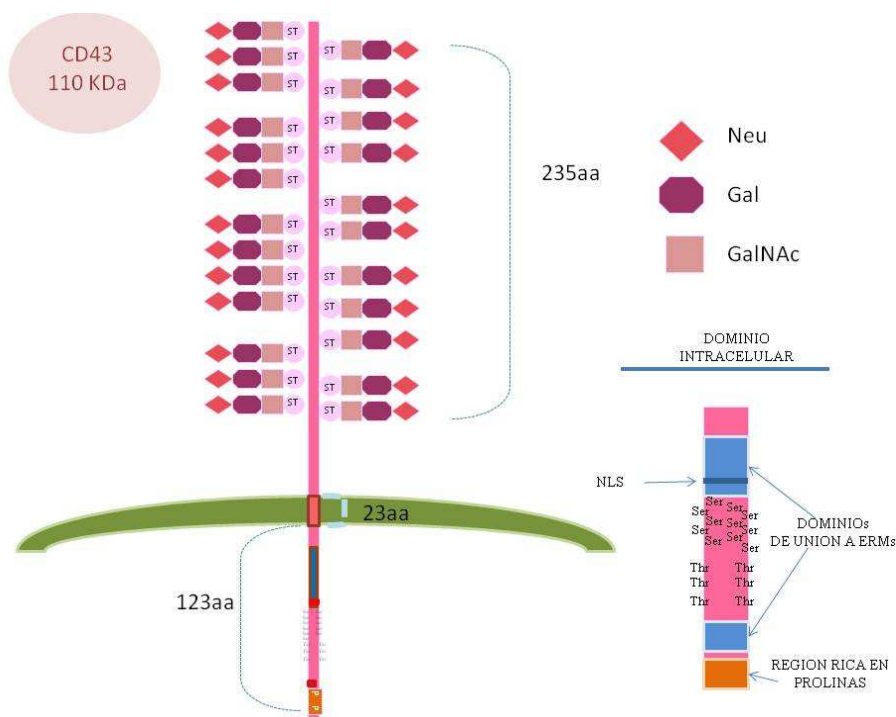


Figura 7. Estructura de CD43.

CD43 funciona como una molécula accesoria que, a través de las señales intracelulares que genera cuando interacciona con alguno de sus ligandos (ver más adelante), regula varios aspectos de la biología de los leucocitos como: adhesión/anti-adhesión, activación celular, proliferación, locomoción y apoptosis. Interesantemente, el ratón deficiente de CD28, una molécula accesoria esencial que proporciona señales positivas de activación que complementan las del receptor para el antígeno, no tiene el fenotipo inmunodeficiente que se podría predecir a partir de las funciones de dicha molécula. Esto se debe a que en las células de estos animales, la molécula accesoria CD43 toma el lugar de CD28 ¹⁰⁹.

Debido a la fuerte carga negativa que le proporciona el ácido siálico, se ha propuesto que CD43 podría actuar como una barrera física, impidiendo las interacciones entre células linfoides ¹¹⁰. Sin embargo, el papel de CD43 en la regulación de las interacciones celulares entre células linfoides y las células epiteliales de las vénulas altas parece ser bastante más compleja. De hecho, se ha reportado que los leucocitos de ratones deficientes de CD43 migran deficientemente hacia los ganglios linfáticos, pero que paradójicamente, muestran mayor adhesión a las células epiteliales de las vénulas altas ¹¹¹. Consistente con esto, un anticuerpo que reconoce CD43 inhibe la migración de los linfocitos T hacia los ganglios linfáticos ¹¹² o hacia células pancreáticas de ratones NOB “diabéticos no obesos” ¹¹³.

Además de participar en la regulación del tráfico celular y de las interacciones célula-célula, CD43 genera señales intracelulares que, como las de CD28, proporcionan información a la célula acerca del medio circundante, complementando en particular las del TCR. Las señales de CD43, en conjunto con las del TCR, inducen la proliferación de linfocitos intraepiteliales de intestino murino ¹¹⁴. Asimismo, linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica que expresan altos niveles de CD43 y que se consideran como linfocitos T de memoria, muestran evasión de la apoptosis inducida por activación del TCR ¹¹⁵. Sin embargo, se ha reportado que en células Jurkat se induce apoptosis al entrecruzar la isoforma de 130 kDa de CD43 ¹¹⁶.

En linfocitos T, CD43 actúa como molécula co-estimuladora y se ha implicado en distintas vías de señalización ¹¹⁷. El entrecruzamiento de CD43 en la superficie celular con el anticuerpo monoclonal anti-CD43 (L10) induce la interacción de CD43 con la cinasa de tirosinas Fyn y su fosforilación en residuos de tirosina. Esta interacción es mediada por el

dominio SH3 de Fyn y por la secuencia rica en residuos de prolina (DAPAPDEPEGGDGAAP) de CD43¹⁰⁷. La activación de linfocitos T a través de CD43 induce también la fosforilación en tirosinas del adaptador de proteínas Shc y del factor intercambiador de guaninas Vav, favoreciendo la formación de un complejo macromolecular que comprende Shc, GRB2 y Vav. Las señales de CD43 inducen también la formación del complejo Vav-SLP-76, el cual transduce señales al núcleo a través de la vía de MAP cinasas como ERK, culminando con la activación de factores de transcripción como AP-1, NF- κ B y NF-AT, promoviendo así la proliferación celular^{118,119} y la producción de citocinas¹²⁰ (Fig. 8).

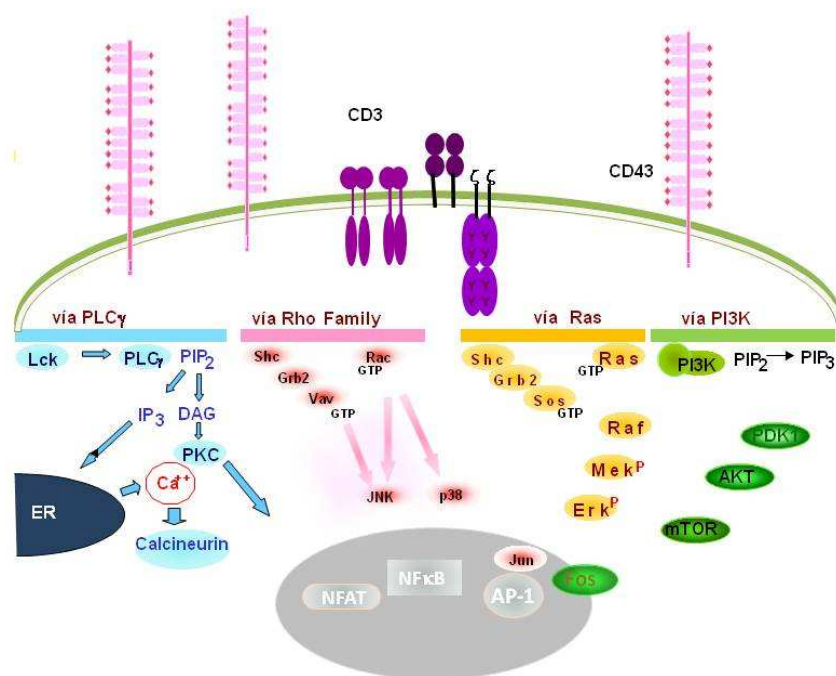


Figura 8 Vía de señalización de CD43 en linfocitos T.

La vía de señalización de CD43 en linfocitos T está bien caracterizada y depende del dominio intracelular de la molécula. Comienza por el reclutamiento de las cinasas Src, Lck y Fyn. Éstas fosforilan las tirosinas de la cadena ζ , lo que recluta y activa a las tirosin- cinasas Syk y Zap-70, que fosforilan al factor Vav y a las moléculas adaptadoras LAT, SLP-76, Shc y Grb-2. Como consecuencia, ocurre un aumento en los niveles de calcio intracelular, la activación de varios miembros de la familia de PKC, la activación de la vía de las MAP cinasas, el reclutamiento y activación de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B, NF-AT.

Se han descrito varios ligandos de CD43: ICAM-1¹²¹, MHC I¹²², galectina-1¹²³, albúmina sérica humana¹²⁴, E-selectina¹²⁵, SIGLEC 1¹²⁶ y nucleolina¹²⁷. Sin embargo a pesar de que, como se mencionó en la sección anterior, se han atribuido varias funciones a CD43, no se ha podido establecer una conexión específica entre ligando-función y ligando-vía de señalización.

La interacción de CD43 en linfocitos T con ICAM-1 podría regular la adhesión entre estas dos células, permitiendo el contacto célula-célula y favoreciendo así la activación celular y regulando la migración transendotelial de linfocitos T. Asimismo, la isoforma de 130 KDa de CD43 que reconoce a la E-selectina en células endoteliales, facilitaría la infiltración de neutrófilos, linfocitos T y linfocitos B a los tejidos¹²⁵. La unión con el MHC I podría estar involucrada en la co-estimulación, adhesión y la regulación de contactos entre el linfocito T y las células presentadoras de antígeno. Por otra parte, se ha reportado que la isoforma de 130 kDa expresada en neutrófilos une selectivamente albúmina sérica humana (HSA), y que esta unión podría regular la extensión de las células sobre el sustrato y proteger a CD43 de ser degradada por elastasas¹²⁴; se desconoce el efecto que podría tener la interacción HSA-CD43 en linfocitos T. Dado que al igual que CD43, SIGLEC 1, una sialoadhesina exclusiva de macrófagos que se une a residuos de carbohidratos que contienen ácido siálico, tiene una estructura alargada, se ha propuesto que ambas moléculas podrían propiciar las primeras interacciones entre linfocitos T y macrófagos¹²⁶. En linfocitos T activados, la galectina-1 induce apoptosis dependiente de la fosfatasa CD45¹²³ y datos recientes del laboratorio sugieren que esto depende además de la isoforma de CD43¹²⁸. Por último, la nucleolina, una proteína que se puede encontrar en núcleo o citoplasma y como receptor de algunas células como los macrófagos cuando éstos entran en apoptosis, se une a CD43, lo cual sugiere que esta interacción podría representar una señal de daño¹²⁷.

A la molécula CD43 se le ha asociado con diversas patologías, pero aún no se sabe claramente qué papel desempeña en cada una. En pacientes con Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), una enfermedad que se caracteriza por presentar infecciones recurrentes, eczema, y disminución del número de plaquetas en sangre, se ha descrito una O-glicosilación anormal de CD43, aunque la alteración genética que lleva a esta enfermedad consiste en una mutación en el gen que codifica para la proteína adaptadora WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) que se localiza en el citoplasma y participa en los

rearreglos de citoesqueleto ¹²⁹. En pacientes con VIH-1 se detectan anticuerpos anti-CD43 durante la fase asintomática de la infección, durante la cual hay una sobreexpresión de CD43 glicosilada de manera aberrante ^{130,131}. Por otra parte, el entrecruzamiento de CD43 estimula la replicación del VIH-1, esto mediado por los factores de transcripción NF- κ B y NF-AT ¹³². El virus de la influenza A reconoce y se une a CD43 en sus dos isoformas en células polimorfonucleares; esta unión, dependiente de ácido siálico, podría propiciar la entrada del virus a los neutrófilos ^{133,134}. De igual manera, la transialidasa de *T. cruzi* se une y co-estimula a linfocitos CD4+ y rescata a estos de la apoptosis inducida por su entrecruzamiento ¹³⁵. Asimismo, en un modelo murino se ha reportado que el dominio extracelular de CD43 es necesario para la interacción de *M. avium*, *bovis* y *tuberculosis* con la superficie celular de macrófagos, lo que sugiere que CD43 podría ser una molécula que propicia la unión e internalización de las micobacterias a los macrófagos. Además, CD43 propicia la respuesta inflamatoria a *M. tuberculosis*, a través de la inducción de mediadores pro-inflamatorios ¹³⁶. En ausencia de CD43, los ratones infectados con *M. tuberculosis* presentan una mayor carga bacteriana durante la fase aguda y crónica de la infección y un desarrollo más acelerado de granulomas ¹³⁷.

Como se mencionó anteriormente, en pacientes con WAS y HIV se ha reportado una glicosilación anómala de CD43 asociada a estas patologías, sin embargo, también se ha reportado que la interacción de algunos patógenos con la superficie de los linfocitos resulta en una disminución de los niveles de expresión CD43. El reconocimiento de un componente de pared fúngica (Zymosan) genera una gran producción de citocinas proinflamatorias y regula la expresión de CD43 en la superficie de los neutrófilos, ya que promueve el corte proteolítico de CD43 ¹³⁸. El interés principal de este trabajo consistió en estudiar a la luz de los nuevos conocimientos acerca de las moléculas que reconocen MAMPs, la modulación de la expresión de CD43 en linfocitos T por los TLRs.

HIPÓTESIS

Los receptores que participan en el reconocimiento de patógenos modulan la expresión de moléculas accesorias importantes para las funciones de los linfocitos T, en particular la expresión de CD43.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si los niveles de expresión de CD43 se modulan a través de las señales de los TLRs.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar si compuestos derivados de patógenos disminuyen la expresión de CD43 en la membrana celular.
- Caracterizar si las señales específicas de los TLRs modulan la expresión de CD43.
- Determinar si las señales de los TLRs modulan las señales de otras moléculas accesorias.

METODOLOGÍA

Células

Purificación de linfocitos T de sangre periférica

Los linfocitos T fueron obtenidos de concentrados leucocitarios de sangre periférica de donadores sanos, proporcionados por el Banco de Sangre del Hospital Regional del IMSS en Cuernavaca, Morelos.

Previo al proceso de purificación, los concentrados leucocitarios fueron diluidos con solución salina amortiguada por fosfatos (PBS del inglés, Phosphate Buffered Saline) con pH de 7.4 en una relación 1:1. La purificación se llevó a cabo a través de un gradiente de densidades con Ficoll-Hypaque. En un tubo tipo Falcon de 50 ml se agregó 12.5 ml de Ficoll-Hypaque y 37.5 ml de la suspensión celular, dejándolo resbalar por las paredes del tubo para no romper el gradiente de densidad de 1.078. Las células se centrifugaron por media hora a 1300rpm (400g) a temperatura ambiente y se colectó la fase intermedia, que es donde se encuentran las células mononucleares. Las células se lavaron con PBS dos veces centrifugando a 1200 rpm 15 minutos y una tercera vez a 1000 rpm durante 7 minutos; las células se resuspendieron a 10×10^6 /ml en RPMI suplementado con 5% de suero fetal bovino, penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 ug/ml) y glutamina (2 mM). Las células mononucleares se plaquearon en cajas Petri y se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO₂ una noche para eliminar las células adherentes. Posteriormente las células no adherentes fueron incubadas con un cocktail de anticuerpos monoclonales (Miltenyi Biotec) que reconocen moléculas membranales de monocitos, macrófagos, granulocitos, células dendríticas, eritrocitos y linfocitos B (CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 y glicoforina A). La ventaja de purificar linfocitos T por selección negativa es que ningún receptor en la célula T es entrecruzado por los anticuerpos, lo que permite la obtención de células no estimuladas y por lo tanto es posible realizar estudios de señalización, activación e inducción. Para esta técnica las células se centrifugaron durante 10 minutos a 1200 rpm. El pellet se resuspendió en una solución de PBS/0.5% BSA/2mM EDTA a pH 7.5, y se incubó con el cocktail de anticuerpos biotinilados (Pan T cell-Biotin) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se agregaron microesferas magnéticas recubiertas con streptavidina durante el mismo período de incubación. Finalmente, las

células se colocaron en una columna magnética LS y se procedió a la separación magnética. Las células T se eluyeron de la columna y se resuspendieron en cajas Petri en medio RPMI suplementado con 2% de suero fetal bovino, 2mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomomicina. Posteriormente se realizaron tinciones por citometría de flujo para determinar el porcentaje de pureza de los linfocitos (TCR y CD43 positivos). El grado de pureza para linfocitos T fue $\geq 90\%$ (Figura 9).

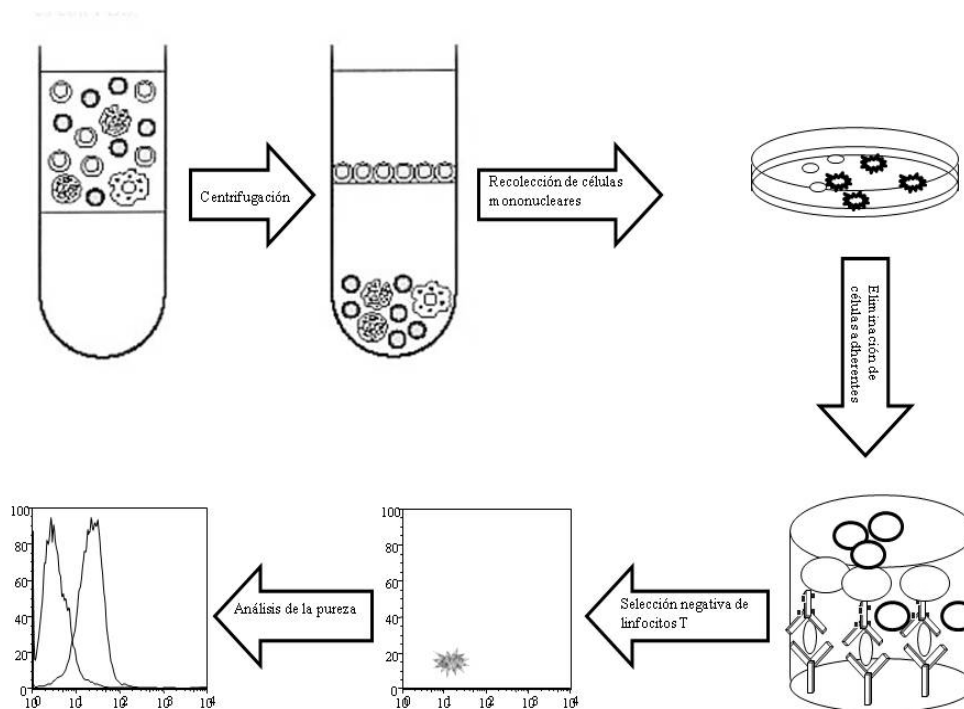


Figura 9. Purificación de linfocitos T.

Cultivo de células tumorales

Se utilizaron células tumorales de origen linfoide: células Jurkat, una línea celular humana derivada de una leucemia T linfoide aguda; células JY, linfocitos B humanos transformados con virus Epstein-Barr (EBV), células CEM provenientes de leucemia linfoblástica aguda de células T humanas, células THP1 indiferenciadas que son células derivadas de leucemia monocítica aguda de humano y células THP1 previamente estimuladas con PMA para diferenciarlas a macrófagos. Todas las líneas celulares se cultivaron con medio RPMI suplementado y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Previo a

la activación, las células se lavaron con PBS, centrifugando 7 min a 1200 rpm y se incubaron en RPMI no suplementado durante tres horas para bajar su metabolismo a niveles basales.

RT-PCR

Las técnicas de RT-PCR permiten la formación de cDNA (complementario de DNA) del RNA, que salva la secuencia de RNA en la forma más estable de ácido nucleico, DNA.

Extracción de RNA

Las células cultivadas fueron centrifugadas 7 minutos a 1200 rpm y del pellet recuperado se realizó la extracción de RNA total con el kit Total RNA® Isolation System de Promega. Al pellet celular ($5 \cdot 10^6$ células) se le agregaron 60 μ l de Acetato de sodio 2M (pH 4.0) el cual es un desnaturalizante de proteínas que permite homogenizar el pellet, se mezcló vigorosamente y se agregaron 600 μ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (99:24:1, pH 4.7), se mezcló nuevamente durante 10 segundos y se dejó enfriar en hielo por 15 minutos. Posteriormente se centrifugó la mezcla durante 20 minutos a 10,000 g a 4°C. De esta mezcla se obtienen tres fases al interior del tubo, de las cuales la fase inferior u orgánica contiene proteínas y lípidos. La fase superior o inorgánica contiene el RNA, mientras que la fase intermedia está constituida por DNA. Se recuperó la fase inorgánica y se dejó 15 minutos a temperatura ambiente para favorecer la desintegración de complejos nucleoprotéicos y se le agregó isopropanol (1:1), incubando los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente (el isopropanol precipita el RNA porque compite con este por el agua, deshidratándolo y llevándolo al fondo del tubo). Se centrifugó 10 minutos a 4°C a 10,000 g. Al pellet se le agregó etanol frío al 75% como agente deshidratante y desinfectante durante 10 minutos, después de lo cual los tubos se centrifugaron nuevamente 5 minutos a 10,000 g. El pellet que contiene el RNA total de las células se dejó secar antes de rehidratar en agua tratada con DEPC.

Posteriormente se cuantificó la cantidad de RNA obtenido. Para determinar la concentración de RNA se mide la absorbancia a 260nm, en un espectrofotómetro (1 OD₂₆₀ equivale a 40 μ g de RNA). Para evaluar la integridad del RNA obtenido, se corrió una

alícuota de 1 µg de RNA en un gel de agarosa al 1%, en buffer TBE (89 mM Tris-HCl pH 7.8, 89 mM borato, 2 mM EDTA), evaluando las bandas de 28S y 18S del RNA ribosomal.

Síntesis de cDNA

Con el RNA total de cada línea celular se procedió a crear una hebra complementaria de DNA (cDNA). Las muestras se incubaron con la enzima de transcripción inversa que, en presencia de oligos y desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP), cataliza la reacción de síntesis de las cadenas de DNA complementarias a las de RNA. El proceso se realizó utilizando el Kit comercial: Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, el cual según las especificaciones del protocolo se realiza en dos pasos.

Para el primer procedimiento se utilizaron 1 µg de cada RNAt; 60 µM de oligos aleatorios (600pmol/l); oligo anclado (dT)18 (50pmol/l), la mezcla se calentó durante 10 minutos a 65°C en termociclador y después se colocó en hielo para finalizar la reacción. Este procedimiento permite que el RNAt se desnaturalice y permita su posterior amplificación.

Para el siguiente procedimiento se agregó en el mismo tubo de la mezcla: buffer de reacción 5x (100 mM Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C; 500 mM KCl; 0.1% Tritón X-100), proteína inhibidora de RNAsa (rRNAsin) (40 U/l), enzima transcriptasa reversa (AMV) (10 U), mezcla de dNTPs (10 mM (10 µl de dATP [100mM], de dCTP [100mM] ;de dGTP [100mM] y de dTTP [100mM] respectivamente)) y agua. La RT-PCR se realizó en el termociclador a 25°C por 10 min para desnaturalizar y alinear la mezcla, después 60 minutos a 50°C para permitir la elongación y para finalizar la reacción se llevó a 85°C durante 5 minutos en el termociclador para inactivar la transcriptasa reversa.

PCR

Terminado el proceso de síntesis de cDNA se realizó una PCR para amplificar las secuencias de los TLRs. Dichas secuencias fueron amplificadas con los oligonucleótidos diseñados y proporcionados en el laboratorio de la Dra. Laura Bonifaz, en la Unidad Médica de Investigación en Enfermedades Autoinmunes del Centro Médico Nacional Siglo XXI, en el Hospital de Especialidades. Para la reacción de PCR, en cada tubo se agregaron los siguientes reactivos (ver Tabla 3):

Tabla 3. Reactivos para PCR

Reactivo	Volumen	Concentración final
Buffer de reacción 10x	2µl	1x(100 mM Tris-HCl, pH 8,8; 500 mM KCl; 0.1% Tritón X-100)
MgCl ₂ 20x	1 µl	1.5mM
dNTP	1 µl	2mM c/u (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DNA polimerasa 5U/ul	0.5 µl	2.5 U
Oligonucleótidos 10uM c/u	2 µl c/u	1 µM
cDNA	1 µl	1 µg
Agua	10.5ul	
Volumen final	20 µl	

La PCR se realizó en el termociclador AB (Applied Biosystems) con el siguiente programa: 94°C por 2 minutos, posteriormente 34 ciclos de 30 segundos a 94°C, 55°C durante 1 minuto seguido de 1 minuto a 72°C y finalmente un ciclo de 7 minutos a 72°C. Como control de PCR utilizamos los oligos específicos para el gen de Hypoxantina Fosforibosatransferasa (gene HPRT).

Los productos de la reacción de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa 2% con buffer TAE (Tris/acetato/EDTA) teñido con bromuro de etidio (1mg/ml). Las imágenes fueron capturadas con un analizador de imágenes AlphaInnotech.

Tabla 4. Oligonucleótidos de los TLRs

TLR	SECUENCIA	T _m	TAMAÑO (pb)	
TLR2	FWD	GGCCAGCAAATTACCTGTGTG	54°C	614
	REV	CCAGGTAGGTCTTGGTGTTCA		
TLR3	FWD	ATTGGGTCTGGGAACATTTCTCTTC	56°C	320
	REV	GTGAGATTTAAACATTCCTCTTCGC		
TLR4	FWD	TGAGCAGTCGTGCTGGTATC	54°C	167
	REV	CAGGGCTTTTCTGAGTCGTC		
TLR6	FWD	TAGGTCTCATGACGAAGGAT	50°C	1108
	REV	GGCCACTGCAAATAAGTCCG		
TLR9	FWD	TTATGGACTTCCTGCTGGAGGTGC	59°C	332
	REV	CTGCGTTTTGTGCGAAGACCA		
HPRT	FWD	AGTGATGATGAACCAGGTTA	46°C	569
	REV	ATTATAGTCAAGGGCATATC		

Activación celular

Las líneas celulares o linfocitos T de sangre periférica (1×10^6 células/condición), se incubaron por los tiempos indicados en 1 ml de RPMI sin suero fetal bovino a 37°C, 5% de CO₂, con los estímulos indicados en la Tabla 5. Como control negativo se consideraron células sin estimular que fueron sometidas a las mismas manipulaciones. Una vez terminado el proceso de incubación, las células se lavaron con 5 ml de solución de FACS (PBS, 2% SBF, 0.02% NaN₃), y se evaluaron los niveles de CD43 y otros marcadores de superficie en la membrana de la célula por citometría de flujo y por microscopía de fluorescencia.

Tabla 5 Ligandos de TLRs

Ligando	Concentración de uso	Fabricante
LPS (liposacárido de <i>E. coli</i> K12)	100ng/ml	Sigma
LTA (ácido lipotenoico)	10ng/ml	Sigma
Poli I:C	100 µg/ml	Sigma
Zymosan (extracto de <i>S. cerevisiae</i>)	150 µg/ml	Sigma
FsI1 (péptido sintético derivado de la lipoproteína LP44 de <i>Mycoplasma salivarium</i>)	100ng/ml	Invivogen

Inmunotinción

Al finalizar la activación, las células se incubaron con los anticuerpos primarios deseados y acoplados a un fluoróforo durante 30 minutos a 4°C en oscuridad y se lavó el exceso de anticuerpo con solución de FACS. En caso de que los anticuerpos no estuvieran acoplados a fluoróforos, las células se incubaron adicionalmente con un anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 488 (RaMIG-Alexa); una vez más, se eliminó el exceso de anticuerpo con lavados con solución de FACS. Al concluir la tinción, las células se lavaron y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se analizaron por citometría de flujo, en un citómetro FACSort (RB), utilizando el programa de adquisición CellQuest y posteriormente los datos se analizaron con el programa FlowJo.

Las muestras también se montaron sobre laminillas de vidrio en medio de montaje (PBS 50%: Glicerol 50%), para observar las células por microscopía confocal [MRC-600 equipado con un láser de kriptón/argón (Biorad) acoplado a un microscopio aioscopio (Zeiss) con objetivo Plan Apochromatico 63x W Karr con apertura de 1.2]. Las imágenes fueron analizadas en el programa Image 4.2.

Tabla 6. Anticuerpos empleados

Anticuerpo	Especificidad	Concentración de uso
α CD3 PE	Anticuerpo monoclonal de ratón para CD3 humano acoplado a ficoeritrina	2 μ g/ml
α CD2 PE	Anticuerpo monoclonal de ratón para CD2 humano acoplado a ficoeritrina	2 μ g/ml
α PD1 PE	Anticuerpo monoclonal de ratón para PD1 humano acoplado a ficoeritrina	2 μ g/ml
RaMIg	Anticuerpo de conejo para IgG de ratón, acoplado a Alexa 488	500ng/ml
OKT3	Anticuerpo monoclonal de ratón para CD3 humano	1 μ g/ml
MEM 59	Anticuerpo monoclonal de ratón para CD43 humano	1 μ g/ml
L10	Anticuerpo monoclonal de ratón para CD43 humano	1 μ g/ml
DFT 1	Anticuerpo monoclonal de ratón para CD43 humano	2 μ g/ml
CD28	Anticuerpo monoclonal de ratón para CD28 humano	1 μ g/ml

RESULTADOS

Expresión basal de CD43 en linfocitos T normales y en células tumorales linfoides (T, B y monocitos/macrófagos)

Siendo el objetivo de este trabajo evaluar el efecto de las señales de los receptores tipo Toll sobre los niveles de expresión de la molécula CD43, establecimos primero los niveles basales de expresión de CD43 en los diferentes tipos celulares que se emplearon a lo largo de este trabajo: linfocitos T humanos aislados de concentrados leucocitarios de donadores sanos, y varias líneas de células tumorales humanas: células Jurkat (leucemia T), CEM (leucemia T), JY (linfocitos B transformados por EBV) y células THP-1 (células pre-monocíticas) no diferenciadas y diferenciadas a macrófagos con PMA (50ng/ml, por 5 días). Las células fueron tenidas en presencia de azida de sodio, en solución de FACS con el anticuerpo monoclonal de ratón (mAb) anti-CD43 humano, L10. Este anticuerpo reconoce epítopes glicosilados pero no sialilados presentes en todas las isoformas de CD43. Los datos mostrados en la Figura 10 reflejan los niveles de expresión de CD43 en cada una de las células utilizadas. En cada una de las poblaciones analizadas se observa claramente la presencia de CD43, pero también se observa que los niveles de expresión de CD43 varían de manera significativa entre las diferentes poblaciones celulares analizadas.

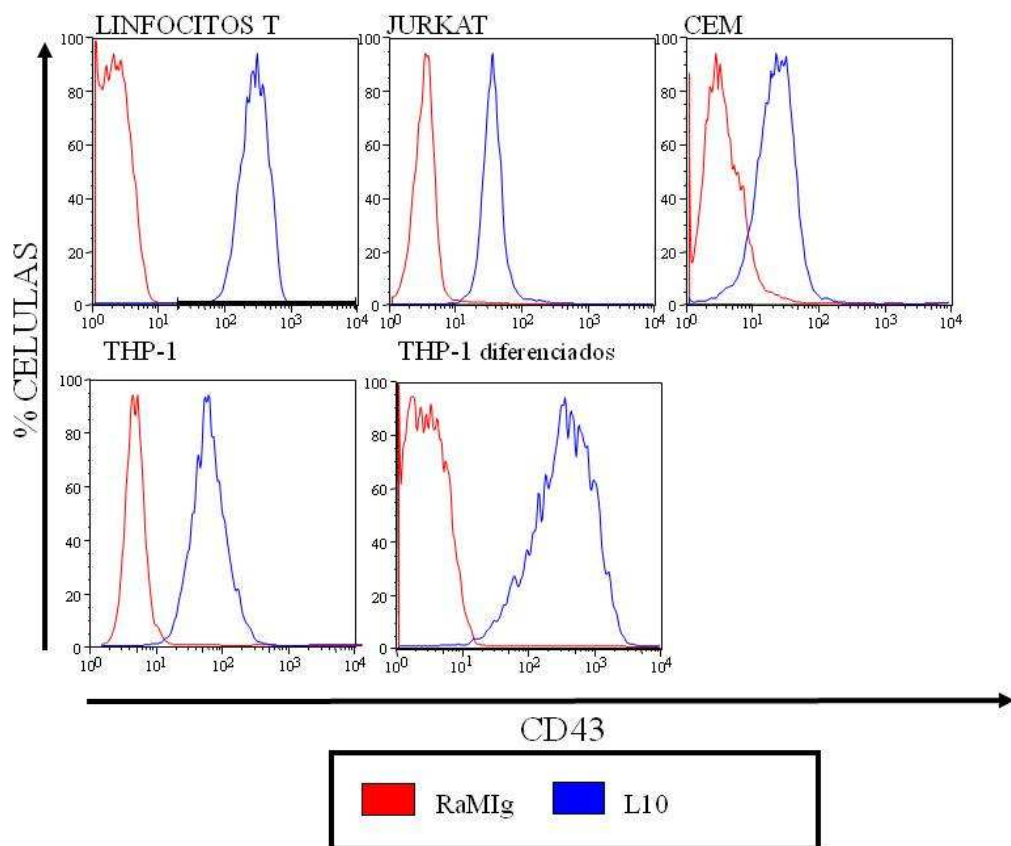


Figura 10. Expresión basal de CD43 en células linfoides y tumorales.

Linfocitos T purificados de concentrados leucocitarios y líneas celulares Jurkat, CEM, THP-1 no diferenciadas, THP-1 diferenciadas con PMA, fueron incubadas con el anticuerpo L10 y analizadas por medio de citometría de flujo para determinar los niveles basales de expresión de CD43. Este perfil es representativo de por lo menos 15 experimentos.

Expresión de los distintos TLRs en las células empleadas en este estudio

Para determinar que los efectos en CD43 fueron debido a la actividad de los TLRs, se determinó la expresión de éstos en los diferentes tipos celulares. Se realizaron estudios de biología molecular para determinar la presencia de los diferentes TLRs, ya que, como mencionamos anteriormente, la expresión de los TLRs en linfocitos T es relativamente baja. Por lo tanto se obtuvieron extractos de RNA total de las células estudio y con ellos se realizó una RT-PCR para obtener cDNA y con este producto realizamos una PCR con los oligos específicos de cada TLR ¹³⁹.

Los resultados muestran que las células utilizadas expresan los diferentes TLRs, aunque en diferentes proporciones debido a las características de cada tipo celular, mismo fenómeno que se observa con los niveles de expresión de CD43.

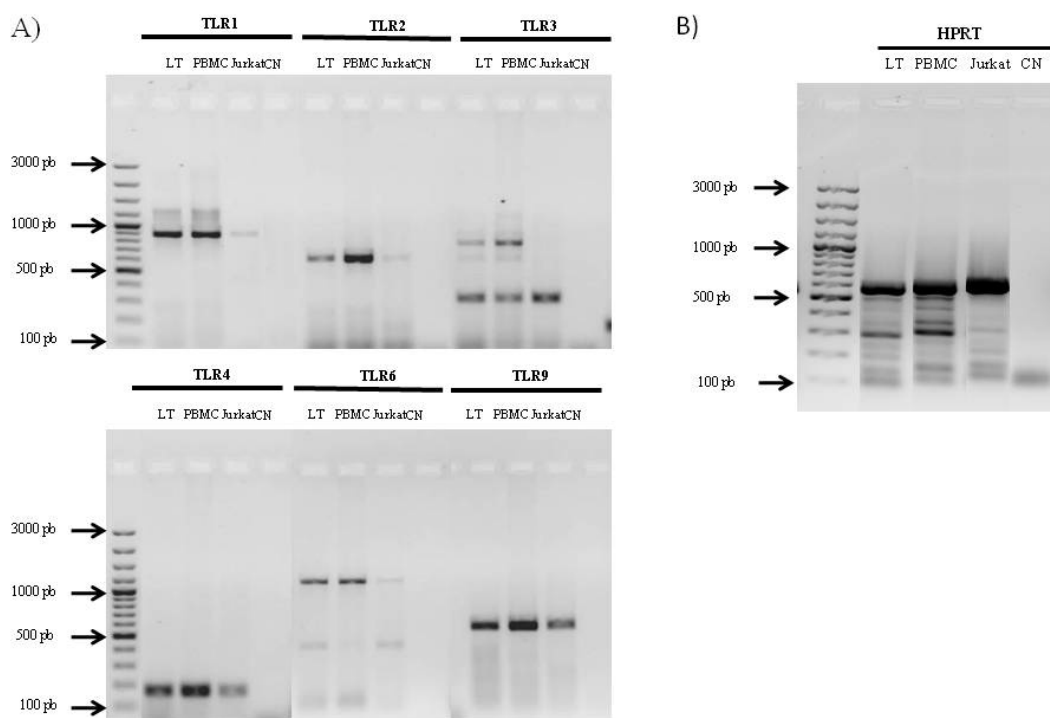


Figura11. Expresión de los TLRs en los diferentes tipos celulares.

A) Expresión de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6 y TLR9 en linfocitos T de sangre periférica, Jurkat y PBMC's. B) Expresión del gen control HPRT en linfocitos T de sangre periférica, Jurkat y PBMC's. CN=control negativo.

El Zymosan induce la disminución de la expresión de CD43 en linfocitos T

Anteriormente se había descrito que el Zymosan (un derivado de la pared celular de la levadura *S. cerevisiae*) provocaba una drástica reducción en los niveles de CD43 presentes en la superficie de neutrófilos humanos (Fig. 12A)¹³⁸. En su momento este reporte no tuvo demasiado seguimiento, pues en ese entonces, los receptores, los ligandos de los receptores y los mecanismos moleculares que regulan la inmunidad innata eran desconocidos. Sin embargo, tomando este trabajo como un antecedente directo, y a la luz de los conocimientos actuales de los mecanismos moleculares que regulan la inmunidad innata, nos preguntamos si el Zymosan modularía también la expresión de CD43 en las células de la inmunidad adaptativa, en particular en linfocitos T.

Observamos que en presencia de Zymosan (150ug/ml) por un período de una hora a 37° C y 5% CO₂, el nivel de expresión de CD43 en linfocitos T humanos aislados de sangre periférica disminuye considerablemente, comparado a los niveles detectados en las células control que fueron sometidas a las mismas manipulaciones, solo que con vehículo (RPMI). Es de notarse que en una pequeña fracción de los linfocitos, la expresión de CD43 no se modifica en respuesta a Zymosan (Fig. 12B). En células Jurkat, una línea de leucemia T humana, se observa también una disminución de los niveles de expresión de CD43 en la superficie celular. Siendo ésta una línea celular, la respuesta es más homogénea, y la disminución se detecta uniformemente en toda la población (Figura 12B). Estos resultados sugieren que los receptores que censan la presencia de Zymosan (TLRs o Dectin-1) generan señales que regulan la expresión de CD43.

Para descartar que la disminución de CD43 no fuera por una pérdida del epítipo reconocido por el anticuerpo L10, las células se activaron con Zymosan (150ug/ml) por un período de una hora a 37° C y 5% CO₂ y posteriormente se evaluó la expresión de CD43 con diferentes anticuerpos anti-CD43. Se utilizó el anticuerpo L10, que reconoce epítopes glicosilados pero no sialilados presentes en todas las isoformas de CD43¹⁴⁰; MEM 59, que reconoce epítopes glicosilados dependientes de ácido siálico¹⁴¹ y el anticuerpo DFT1, que también reconoce epítopes dependientes del ácido siálico de la molécula¹⁴², pero diferentes de los de MEM-59 (datos no publicados del laboratorio). Como se observa en la Figura 12C, ante el estímulo con Zymosan, la disminución en la expresión de CD43 en la

superficie celular se detectó con todos los anticuerpos anti CD43, lo que confirma la pérdida de la expresión de la molécula en la superficie celular.

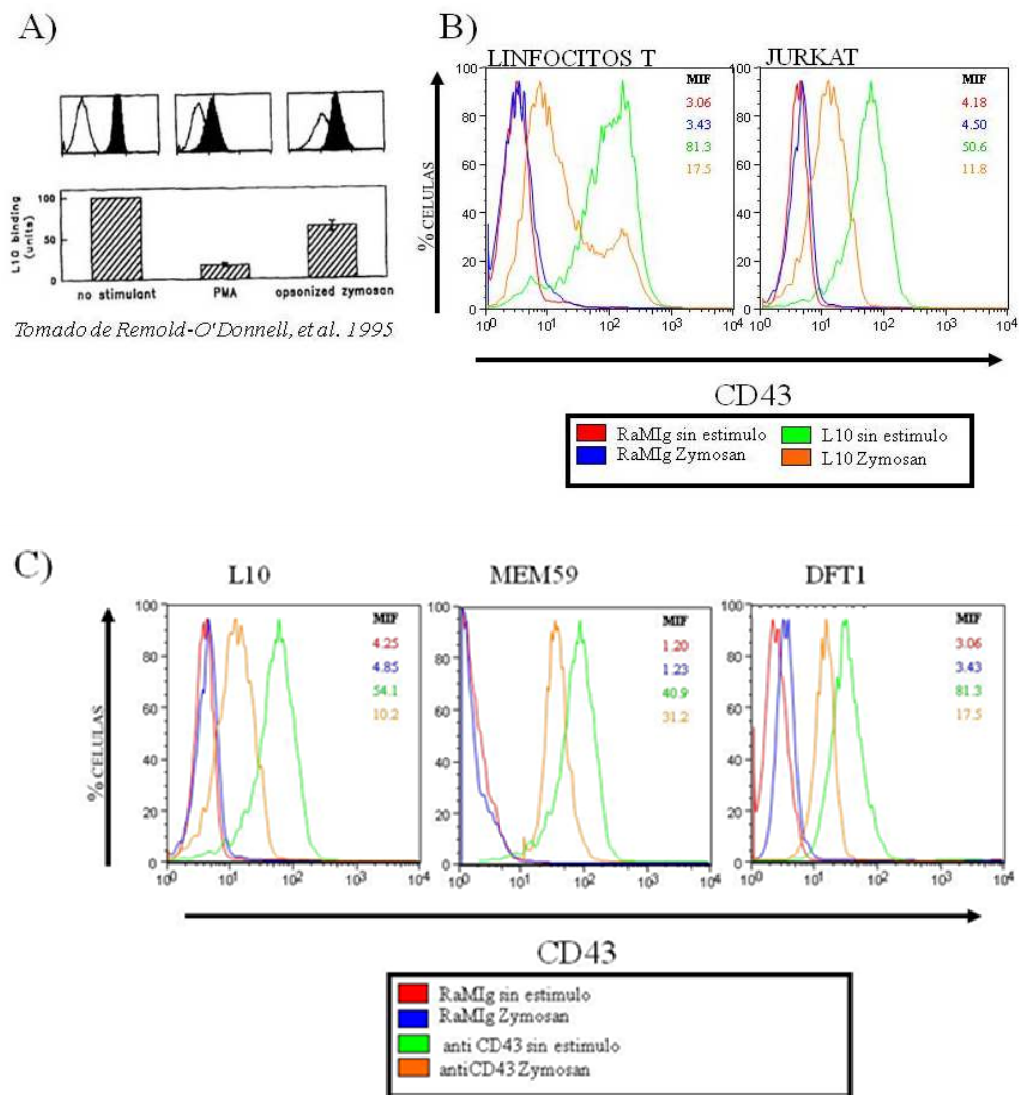


Figura 12 El Zymosan induce la disminución de CD43 en la membrana celular. A) Efecto del Zymosan en neutrófilos humanos. Datos de Remold-O'Donnell, et al. 1995. muestran que al activar a neutrófilos con Zymosan 1.5 mg/ml disminuye la expresión de CD43. B) Linfocitos T purificados de concentrados leucocitarios y células Jurkat fueron estimuladas con Zymosan a (150µg/ml) durante una hora, teñidos con el anticuerpo L10 y analizados por citometría de flujo para evaluar la expresión de CD43 ante el estímulo. C) Células Jurkat activadas con Zymosan (150µg/ml) durante una hora y teñidas posteriormente con anticuerpos anti-CD43 que reconocen diferentes epítopes del dominio extracelular de la molécula: L10 (1 µg/ml), MEM59 (1 µg/ml) y DFT1 (2 µg/ml). Este perfil es representativo de por lo menos 10 experimentos independientes.

El Zymosan regula la expresión de CD43 en diversos tipos de células linfoides

Los experimentos descritos en el párrafo anterior fueron obtenidos con una dosis de Zymosan de 150ug/mL, que es una dosis 10 veces menor a la reportada originalmente¹³⁸. Evaluamos si una dosis aún menor tendría el mismo efecto sobre la expresión de CD43, por lo que se incubaron células Jurkat con 150 ug/mL y 15 ug/mL durante 1 hora a 37°C, 5% CO₂, y se evaluó el nivel de expresión de CD43 por citometría de flujo. Como se observa en la figura 13A, aunque en proporción ligeramente menor, la dosis de Zymosan de 15 ug/mL tiene básicamente el mismo efecto que una dosis 10 veces mayor sobre la expresión de CD43. La dosis de 150 ug/mL fue la dosis que empleamos en los siguientes experimentos.

Al igual que en células Jurkat y linfocitos T, la expresión de CD43 se modifica de igual manera en respuesta a Zymosan en otras células linfoides. En células CEM, a pesar de que expresan mucho menos CD43 que las células Jurkat, también se observa una disminución en la expresión de CD43 en respuesta a Zymosan. En linfocitos B humanos transformados con EBV (células JY), así como en células THP-1 (pre-monocitos tumorales) y células THP-1 diferenciadas a macrófagos, se registra igualmente una menor expresión de CD43 tras una hora de incubación con Zymosan (Figura 13B).

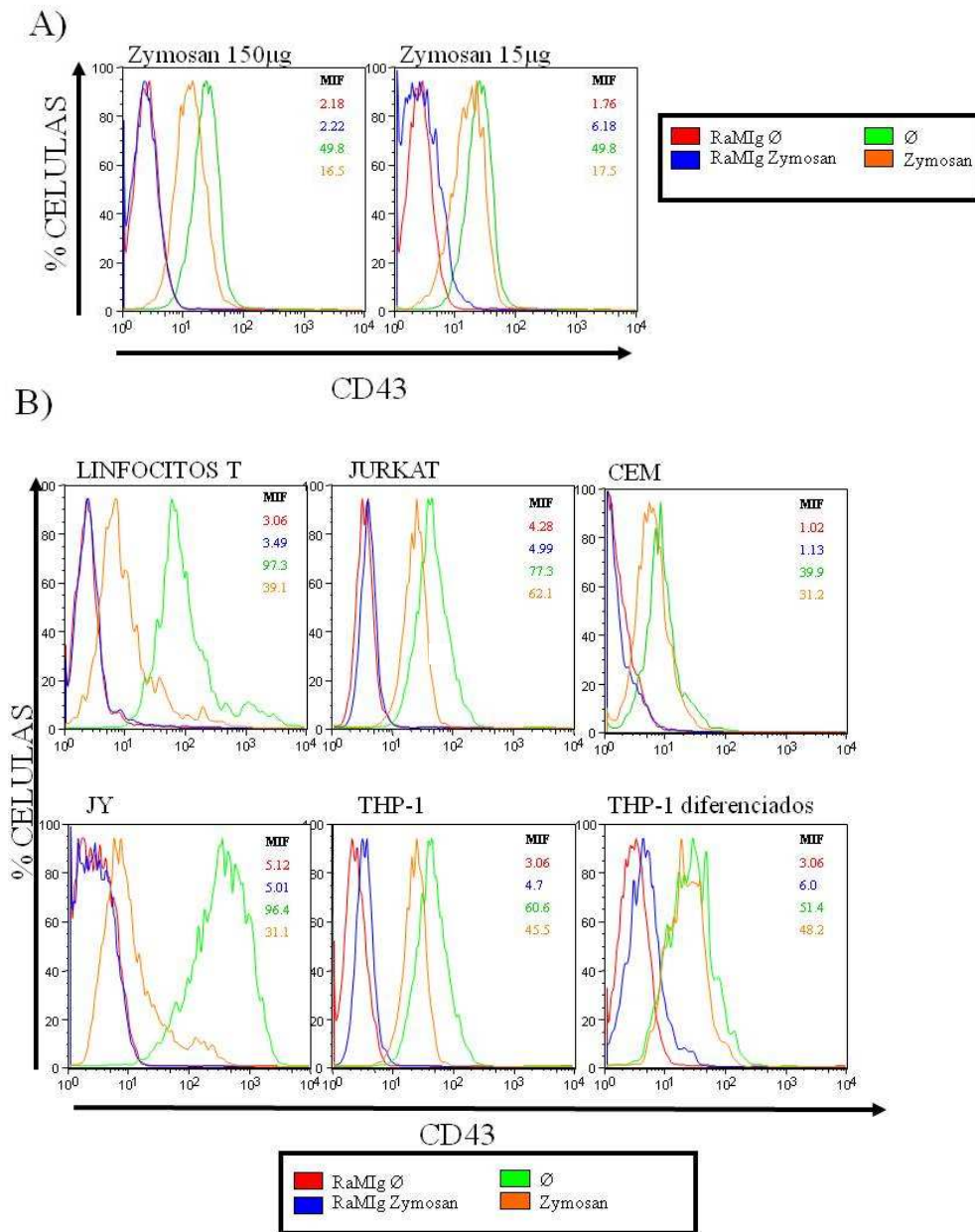


Figura 13. La expresión de CD43 es modulada en distintas estirpes de células linfoides en respuesta Zymosan. A). Evaluación del efecto de Zymosan 150µg/ml y 15µg/ml en células Jurkat B). Los niveles de CD43 bajan en respuesta a Zymosan en diferentes células: linfocitos T, Jurkat, CEM, JY, THP-1 no diferenciadas y diferenciadas. Datos representativos de 5 experimentos.

El dímero TLR2/TLR6 modula la expresión de CD43

EL Zymosan es reconocido por el heterodímero TLR2/TLR6¹⁴³, Dectina-1¹¹ y por el receptor de manosa¹⁴⁴. Para precisar si el dímero TLR2/6 participa en la regulación negativa de la expresión de CD43 descrita en nuestros resultados anteriores, utilizamos FSL1, considerado como un ligando específico del dímero TLR2/6¹⁴⁵.

Como se observa en la figura 14A, el FSL1 induce también una disminución en la expresión de CD43 en la superficie celular de linfocitos T y células Jurkat. Al igual que en el caso de los linfocitos T tratados con Zymosan (Fig. 12B), en los linfocitos tratados con FSL1 (Figura 14A) se detectan dos subpoblaciones con un número equiparable de células, una en la que la disminución es del orden del 60%, y otra en la que la disminución es de un 30% aproximadamente. En células Jurkat también se observó una disminución en la expresión de CD43 en respuesta a FSL1, pero tratándose de una línea celular clonada, todas las células respondieron de manera homogénea. Asimismo, el fenómeno parece haber llegado a un máximo después de 30 minutos, ya que no se observó una diferencia significativa con las células incubadas por 60 minutos (Fig 14B).

Después de haber analizado los linfocitos T por citometria de flujo, se montaron en laminillas de vidrio para observarlos en el microscopio confocal. En la figura 14C se observa la reducción de la expresión de CD43 en la superficie celular de linfocitos estimulados con Zymosan y FSL1. Como se observa también en la figura 14C, las células no estimuladas presentan una distribución homogénea de CD43 en la superficie celular, mientras que los diferentes estímulos parecen provocar una disminución drástica en los niveles de CD43 en una gran proporción de las células, mientras que en otras promueven la formación de agregados de CD43 en la zona de contacto con otras células y en las prolongaciones membranales.

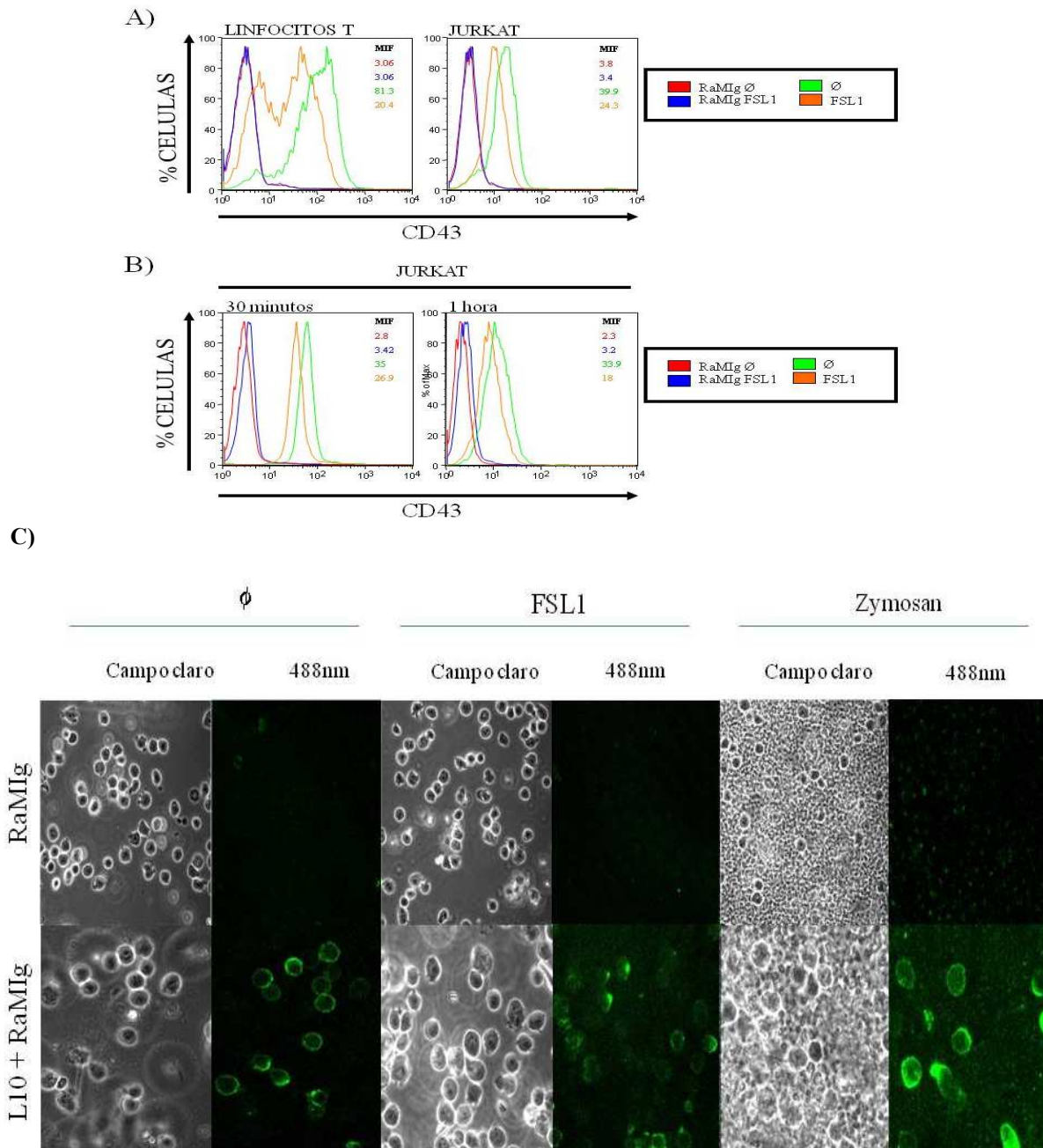


Figura 14 Las señales del dímero TLR2/TLR6 regulan la expresión de CD43 en la membrana. A) Linfocitos T y células Jurkat fueron estimulados con el ligando específico de TLR2/TLR6 (FSL1, 100ng/ml) durante una hora a 37°C y 5% CO₂ y teñidos para observar los niveles de CD43. B) Las células Jurkat fueron activadas con FSL1 (100ng/ml) y se evaluó la expresión de CD43 en la superficie a los 30 y 60 minutos. C) Linfocitos T activados con Zymosan (150ug/ml) y FSL1 (100ng/ml) se tiñeron con el anticuerpo L10 (1ug/ml) y el anticuerpo secundario RaMIg- Alexa 488. Las muestras se observaron por microscopia confocal. Datos representativos de 5 experimentos.

Las señales de distintos TLRs disminuyen la expresión de CD43

Se ha reportado que diferentes subpoblaciones de células linfoides expresan diferentes TLRs. En particular, los linfocitos T CD4⁺ expresan TLR 2 y 4⁸⁸, los linfocitos CD8⁺ expresan TLR 2, 4, 6 y 9, y las células Treg expresan TLR 4, 5 y 9. Las células B y los monocitos/macrófagos, siendo APCs, expresan todos los TLRs¹⁴⁶. Para valorar si estos TLRs eran capaces de modular la expresión de CD43, realizamos experimentos en los que incubamos células Jurkat, CEM y THP-1 con ligandos de TLR3 (Poli I: C, 100 ug/mL), TLR4 (LPS, 100 ng/mL), TLR2 (LTA, 100 ug/mL) y TLR2/TLR6 (Zymosan, 150 ug/mL).

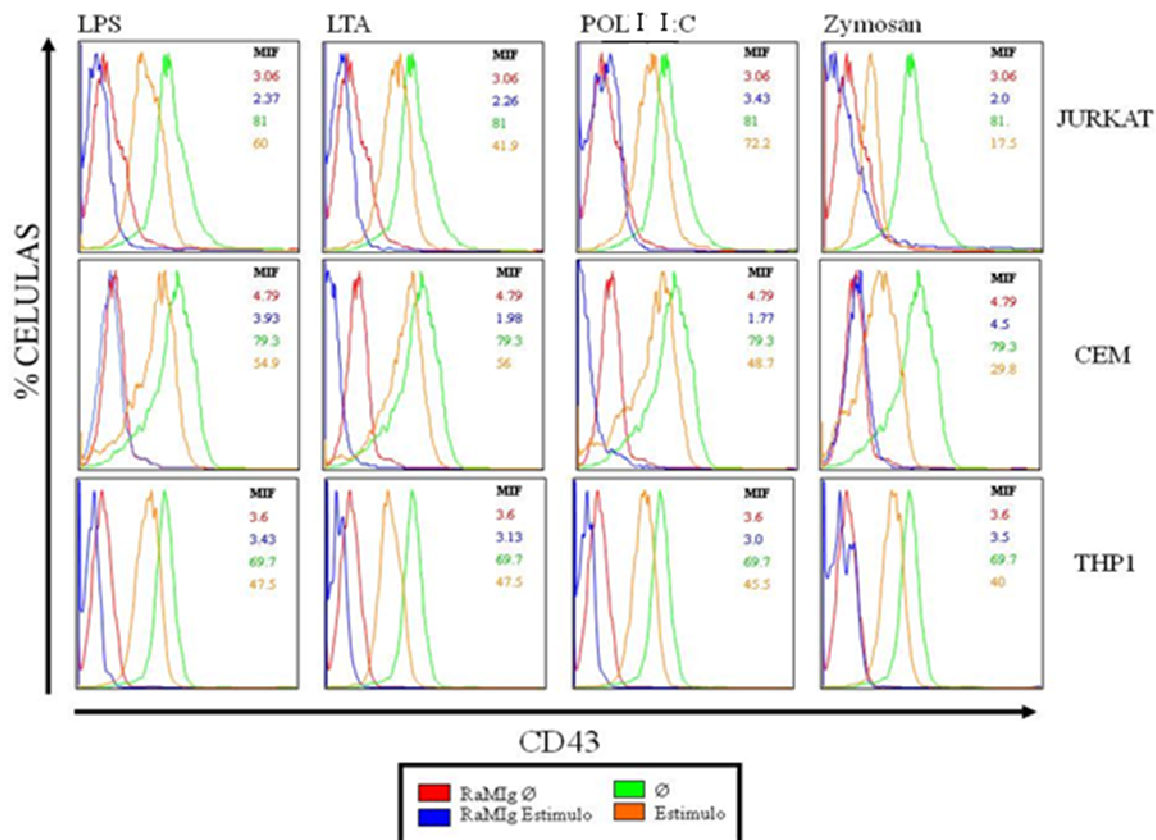


Figura 15. Diferentes TLRs bajan la expresión de CD43 en células linfoides.

Las diferentes líneas celulares fueron activadas con diferentes ligandos para TLRs: LPS (100ng/ml), LTA (10mg/ml), Poli I: C (100µg/ml) y Zymosan (150µg/ml) durante 1 hora, a 37°C y 5% CO₂, y se evaluó la expresión de CD43 por citometría de flujo.

En células Jurkat, así como en células THP-1 no diferenciadas, todos estos compuestos inducen una reducción en la expresión de CD43. En células CEM, solo se observa una

disminución en los niveles de CD43 cuando las células están en presencia de LPS y Zymosan (Figura 15).

Las señales de los TLRs modulan selectivamente la expresión de CD43

Con el fin de evaluar si el efecto de las señales de los TLRs sobre la expresión de CD43 también se observaba con otras moléculas accesorias, evaluamos la expresión de CD2, CD3, CD28, PD-1 en células Jurkat tratadas con Zymosan (150ug/MI durante una hora a 37°C y 5% CO₂) y posteriormente se tiñeron con diferentes anticuerpos específicos para las moléculas accesorias mencionadas. En los resultados mostrados en la figura 16, observamos que los niveles de expresión de las diferentes moléculas no se ven afectados con el estímulo, a diferencia de los resultados mostrados anteriormente con la molécula accesoria CD43, lo cual sugiere que bajo estas condiciones, las señales generadas por los TLRs regulan de manera específica la expresión de CD43 y no de otras moléculas accesorias en la superficie de las células.

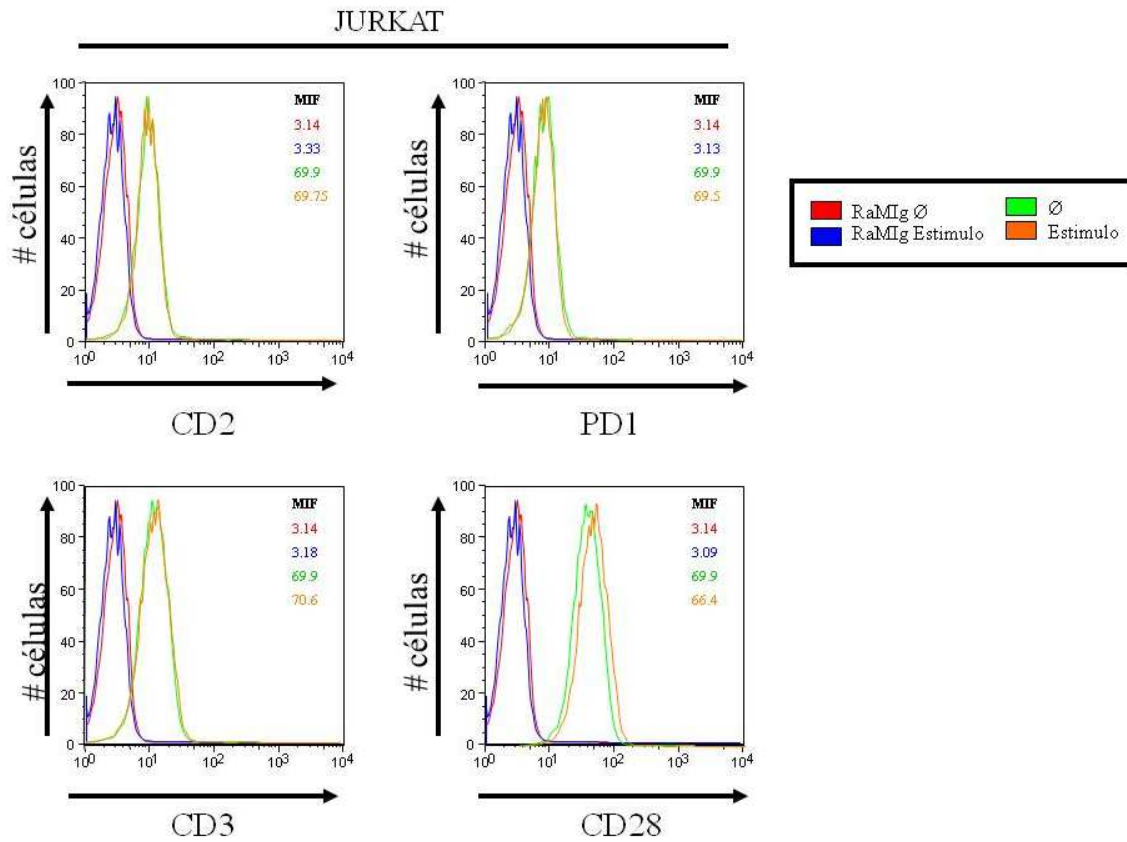


Figura 16. Las señales de los TLRs modulan diferencialmente la expresión de moléculas accesorias.

Las células Jurkat fueron estimuladas con Zymosan (150ug/ml) durante una hora a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente fueron teñidas con anti-CD2 PE (2ug/ml), anti-CD3 PE (2ug/ml), anti-CD28 PE (2ug/ml) y anti-PD1 PE (2ug/ml). Datos representativos de 3 experimentos.

DISCUSIÓN

La respuesta inmune es el resultado de la integración de las señales percibidas por una serie de moléculas receptoras de la superficie de múltiples células y que, en conjunto, generan un mensaje de peligro para el organismo. Algunos de estos receptores reconocen estructuras moleculares microbianas relativamente conservadas, otros son extraordinariamente polimórficos y tienen la capacidad de reconocer específicamente péptidos derivados de antígenos microbianos o propios. Finalmente, otros receptores, al interactuar con sus contra-receptores en la superficie de las distintas células que conforman la compleja red de células que contribuyen al montaje de la respuesta inmunológica, proporcionan información acerca de la “disponibilidad de recursos” para montar la respuesta, de la calidad del antígeno y del tipo de respuesta que se generará. La molécula CD43 es una molécula que pertenece a esta última categoría. Es una molécula multifuncional cuyas interacciones con sus distintos contra-receptores generan señales que regulan positiva y negativamente diferentes fenómenos biológicos. Por su tamaño y estructura alargada y rígida, CD43 es probablemente una de las primeras moléculas de la superficie celular en proporcionarle a la célula información acerca del medio circundante.

Hace 15 años se reportó que el Zymosan, un producto derivado de *S. cerevisiae*, induce la disminución de la expresión de CD43 en neutrófilos¹³⁸. Como ya se mencionó en la introducción, en ese momento no se conocían los receptores para MAMPS/PAMPS y los mecanismos de la inmunidad innata estaban poco estudiados, por lo que el reporte tuvo poco impacto. A la luz de que recientemente se describió que los linfocitos expresan receptores para PAMPs, en particular TLRs, nuestro primer objetivo fue evaluar si en linfocitos T humanos de sangre periférica, el Zymosan era capaz de disminuir la expresión de CD43, así como había sido reportado en neutrófilos (Remold-O'Donnell et al 1995). En base a la literatura, el Zymosan es reconocido por dos clases de PRRs en células linfoides: Dectina-1¹¹ y el dímero TLR 2/6. En este trabajo nos enfocamos únicamente en los TLRs. Al igual que en neutrófilos, encontramos que en presencia de Zymosan, la expresión de CD43 disminuye en la superficie de los linfocitos T; de igual manera ocurre en células Jurkat y CEM, las cuales son un linfoma y una leucemia derivadas de linfocitos T humanos, respectivamente (Fig.12). Demostramos este resultado utilizando tres anticuerpos que reconocen epítopes distintos de la porción extracelular de CD43 (L10, MEM-59 y DFT-1).

El anticuerpo L10 reconoce epítopes glicosilados de CD43 no dependientes de ácido siálico, mientras que MEM59 y DFT1 reconocen epítopes glicosilados de CD43 dependientes de ácido siálico. Se considera que los tres anticuerpos reconocen epítopes distintos de la molécula, todos ellos en su dominio extracelular. Estos datos indican que la disminución de los niveles de expresión de CD43 que observamos no se debe a una pérdida del epítipo del anticuerpo, sino a una disminución en la expresión de la molécula en la superficie celular.

Con diferentes concentraciones de Zymosan [150 ug/ml y 15 ug/ml (Fig 13A)], se observa la disminución en la expresión de la molécula CD43 en proporciones muy semejantes; la mayoría de los experimentos mostrados en este trabajo fueron realizados con una concentración de Zymosan de 150ug/ml. Para caracterizar la cinética de la disminución de los niveles de CD43, realizamos experimentos incubando las células por distintos tiempos (0, 30 y 60 minutos) en presencia de Zymosan (Fig13B). Los resultados obtenidos indican que desde los 30 y hasta los 60 minutos se observa el máximo efecto. Estos resultados son consistentes con reportes que muestran que la expresión de CD43 es rápidamente modulada en células tumorales ¹⁴⁷.

Nos preguntamos si, además de los linfocitos T, en otras células de origen hematopoyético se presentaba el mismo fenómeno. Para ello, empleamos células THP-1 (células tumorales humanas pre-monocíticas) no diferenciadas (equivalentes a monocitos) y diferenciadas (equivalentes a macrófagos), y células JY (linfoma B humano transformado por EBV). Se observó una disminución en los niveles de expresión de CD43 en todos los casos (Fig. 13), por lo que podemos concluir que este es un fenómeno que se lleva a cabo en células que regulan la inmunidad innata monocitos/macrófagos y neutrófilos, así como en células que controlan la inmunidad adaptativa.

Considerando que Zymosan es reconocido por el heterodímero TLR2/TLR6, así como por Dectina-1, nuestro siguiente objetivo fue demostrar que este dímero estaba modulando la expresión de CD43 en la superficie celular. Para ello utilizamos el compuesto FSL1 (péptido sintético derivado de la lipoproteína LP44 de *Mycoplasma salivarium*), el cual es un ligando específico de TLR2/TLR6 ¹⁴⁵, y observamos que aunque en proporción

ligeramente menor, la respuesta ante el estímulo también desencadenaba una disminución en los niveles de CD43 en la superficie celular (Fig.14).

Nuestra siguiente pregunta fue evaluar si la disminución en la expresión de CD43 solo se observaba en respuesta a las señales del dímero TLR2/TLR6, o bien si otros TLRs eran capaces de hacer lo mismo al ser expuestos a sus ligandos respectivos. Para esto incubamos dos líneas de linfocitos T tumorales (Jurkat y CEM) y una línea de células pre-monocíticas (THP-1) con poli I:C, ligando de TLR3 y TLR9; LPS, para TLR4; y LTA, para TLR2. Encontramos que diferentes TLRs promueven la disminución de CD43 en la superficie celular (Fig. 15), lo cual concuerda con la expresión diferencial de los TLRs en las diferentes líneas celulares (Fig.11). Nuestros datos en linfocitos de sangre periférica aislados de donadores de banco de sangre, muestran que la disminución en la expresión de CD43 no es homogénea y que ésta se presenta de manera diferencial cuando se analiza la población total de linfocitos T (Fig. 12). Esto sugiere que distintas subpoblaciones podrían responder diferencialmente a la presencia de ligandos de los TLRs, en lo que respecta a la expresión de CD43, y podría reflejar diferencias en la expresión de TLRs en diferentes subpoblaciones de linfocitos T. Nuestros resultados no nos permiten concluir si se debe a alguna subpoblación en particular (CD4 o CD8), pero sería posible resolver esto con experimentos de doble marcaje. Asimismo, aunque nosotros determinamos por PCR la presencia/ausencia de los diferentes TLRs en las células que utilizamos a lo largo de este trabajo, no se pudo realizar una comparación cuantitativa de la expresión de los TLRs entre las diferentes células y las diferentes subpoblaciones de linfocitos T.

Como ya mencionamos anteriormente, la respuesta inmune, y en particular la activación de linfocitos T, están orquestadas por las señales de múltiples moléculas de la superficie celular, por lo que, adicionalmente, evaluamos si otras moléculas accesorias como CD2, CD3, CD28 y PD-1 eran moduladas como CD43, en respuesta a las señales de los receptores tipo Toll. Observamos que ninguna de ellas sufre modificaciones en su expresión a los tiempos observados para CD43. De manera interesante, durante la realización de este trabajo, se publicó un reporte que señala que los niveles de expresión de CD28 también pueden ser modulados aunque a tiempos más largos de 72 y 96 horas¹⁴⁸.

Si bien se han descrito varias estrategias celulares para la proteólisis de CD43, este trabajo constituye el primer reporte referente a la regulación de la expresión de CD43 por los

receptores TLR. En linfocitos activados a través de CD43, así como en granulocitos y polimorfonucleares estimulados a través de esteroides de forbol, se libera un fragmento de la porción extracelular de CD43^{138,149-151}. Las enzimas responsables de este procesamiento son sensibles a inhibidores de metaloproteasas y de serin-proteasas y el fragmento liberado tiene las mismas características de migración electroforética que CD43 soluble (Galgp), el cual corresponde a la porción extracelular de la molécula y se encuentra en altas concentraciones en el suero humano¹⁵². En polimorfonucleares se realiza un primer corte mediado por Catepsina G, dejando en la superficie celular una forma de CD43 que es entonces sensible a presenilina/ γ -secretasa, la cual corta lo que queda del dominio extracelular de CD43, liberando el dominio intracelular¹⁵¹. Un proceso semejante se ha descrito en células tumorales de colon, en las que dicho corte promueve la disociación del dominio intracelular de CD43 con ezrina, el descubrimiento de un sitio de localización nuclear y la traslocación del dominio intracelular al núcleo, en donde interactúa con β -catenina, una proteína involucrada en la regulación de la expresión de genes inducidos por Wnt, lo que resulta en un aumento en los niveles de c-Myc y de Ciclina D, dos moléculas requeridas para la proliferación y supervivencia celular¹⁴⁷. Recientemente, se describió que la metaloproteasa dependiente de Zn^{2+} , StcE (Secreted protease of C1 esterase inhibitor from EHEC) de *E.coli* enteropatógena corta específicamente a proteínas con características de mucinas, como el inhibidor de la esterasa C1 y CD43¹⁵³. Esta multiplicidad de mecanismos para regular los niveles de expresión de CD43 pone en relieve que regular los niveles de expresión de esta molécula, y modular los umbrales de respuesta de las células linfoides, es importante para la respuesta a patógenos.

Para este trabajo queda entonces la pregunta ¿cuáles son las señales intracelulares generadas por los TLRs que conducen a la regulación de los niveles de expresión de CD43? Una posibilidad es que las señales de TLR2/TLR6 generen la secreción de proteasas que corten o degraden a la molécula. De hecho, reportes muestran que hay secreción de metaloproteasas MP-3 en adipocitos viscerales mediante la señalización de TLR2, las cuales degradan a los ácidos grasos libres inducidos por VEGF¹⁵⁴. La señalización por TLR4 promueve la secreción de la metaloproteasa 9 que corta a CD23 de la superficie celular de linfocitos B¹⁵⁵. Un fenómeno parecido podría estar sucediendo con la molécula CD43.

En resumen, los resultados que obtuvimos a lo largo de este trabajo indican que los receptores para PAMPS/MAMPS tipo TLR expresados por linfocitos T, B y monocitos, regulan negativamente los niveles de expresión de la molécula CD43. Las implicaciones biológicas de esto podrían ser varias. Considerando que CD43 es una molécula muy abundante y muy rígida, se podría considerar que al disminuir sus niveles se podrían facilitar otras interacciones moleculares necesarias para la activación de las células y una respuesta eficiente para combatir al agente invasor. Esta primera posibilidad establecería un papel regulador negativo de la activación de linfocitos para CD43. Sin embargo, numerosos datos de la literatura indican que, a través de sus señales intracelulares, CD43 también participa de manera importante en la activación de células linfoides de manera autónoma y en colaboración con la vía del TCR^{107,118,156-162}. En función de esto, se podría pensar que disminuir su expresión en la superficie de las células inmunes sería una estrategia ventajosa para ciertos microorganismos.

PERSPECTIVAS

Los datos obtenidos en este trabajo son la base de la caracterización del mecanismo por el cual las señales de los TLRs modulan la expresión de CD43 en la superficie celular. Sin embargo, aún falta dilucidar las etapas de este proceso y cómo éstas se presentan, por lo cual se necesitan realizar experimentos con anticuerpos que reconozcan diferentes porciones de la molécula. En particular, será útil un anticuerpo que reconozca específicamente la región intracelular de CD43, lo que permitirá caracterizar el corte que sufre la molécula.

Considerando que la disminución en la expresión de CD43 podría estar regulada por proteasas o por procesos de degradación vesicular, será interesante marcar la región intracelular de la molécula y monitorear su presencia en el interior de la célula por microscopía confocal.

En este trabajo sólo se reportó la modulación de CD43 a tiempos cortos, sin embargo, debido a los antecedentes podrían considerarse tiempos más largos de 24, 48, 72 y 96 hrs. A estos tiempos, será necesario evaluar si los niveles de CD43 se recuperan, como ocurre

con otras moléculas accesorias como CD28¹⁴⁸), así como la expresión de otras moléculas accesorias como CD2, CD3, CD28, CD45, ICAM-1, CD40, CTLA4 y PD-1. Asimismo, se podría evaluar el efecto de las señales de otros TLRs no incluidos en este trabajo como TLR 1, TLR 5 y TLR 7, utilizando sus ligandos específicos.

Por otra parte, para identificar qué molécula es la encargada de degradar a CD43 en respuesta a las señales de los TLRs, se podrían utilizar diferentes inhibidores de metaloproteasas, ubiquitin ligasas y γ -secretasa. Recientemente se ha descrito que en células tumorales de carcinoma de colon y en líneas celulares derivadas de leucocitos, CD43 sufre un corte proteolítico por preselina/ γ -secretasa^{163,151,147}. Para definir si se trata de metaloproteasas, serin-proteasas o cortes mediados por preselina/ γ -secretasa, incubaremos a las células con inhibidores específicos para cada uno de estos grupos de proteasas (1,10-phenanthrolina para metaloproteasas, N-(p-tosyl)-L-lisine chloromethyl ketone, Pefabloc SC e inhibidor de catepsina para serin-proteasas, y L68458 o MG132 para γ -secretasa¹⁵¹) y evaluaremos la regulación de la expresión de CD43 en respuesta a las señales de los diferentes TLRs.

Los resultados de este trabajo muestran que hay una respuesta diferencial en la población total de linfocitos T, por lo cual hace falta analizar si esta diferencia se debe a distintas subpoblaciones de células T como CD4 y CD8. Para ello será necesario realizar dobles tinciones en los linfocitos T estimulados, o bien purificar por selección negativa cada una de las poblaciones antes de ser estimuladas.

REFERENCIAS

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. *Cellular and molecular immunology*. (Saunders Elsevier: 2007).
2. Alberts, B., Bray, D. & Hopkin, K. *Introducción a la biología celular*. (Editorial Médica Panamericana: 2006).
3. Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A. & Kuby, J. *Immunology*. (W H Freeman & Co: 2006).
4. Akira, S. & Hemmi, H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett* **85**, 85-95 (2003).
5. Dunkelberger, J.R. & Song, W. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* **20**, 34-50 (2010).
6. Damoiseaux, J. Regulatory T cells: back to the future. *Neth J Med* **64**, 4-9 (2006).
7. Stockinger, B. & Veldhoen, M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr. Opin. Immunol* **19**, 281-286 (2007).
8. Stockinger, B., Veldhoen, M. & Martin, B. Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol* **19**, 353-361 (2007).
9. Kanavaros, P., Boulland, M.L., Petit, B., Arnulf, B. & Gaulard, P. Expression of cytotoxic proteins in peripheral T-cell and natural killer-cell (NK) lymphomas: association with extranodal site, NK or Tgammadelta phenotype, anaplastic morphology and CD30 expression. *Leuk. Lymphoma* **38**, 317-326 (2000).
10. Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **388**, 621-625 (2009).
11. Brown, G.D. et al. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J. Exp. Med* **197**, 1119-1124 (2003).
12. Dostert, C. & Tschopp, J. Dectin-1 fungal pathogens. *Nat Immunol* **8**, 17-18 (2007).
13. Geijtenbeek, T.B.H. & Gringhuis, S.I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol* **9**, 465-479 (2009).
14. Ikeda, Y. Dissociation of Toll-like receptor 2-mediated innate immune response to Zymosan by organic solvent-treatment without loss of Dectin-1 reactivity. *Biol. Pharm. Bull* **31**, 13-18 (2008).
15. Dennehy, K.M. & Brown, G.D. The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J. Leukoc. Biol* **82**, 253-258 (2007).
16. Geijtenbeek, T.B.H. & Gringhuis, S.I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**, 465-479 (2009).
17. Apostolopoulos, V. & McKenzie, I.F. Role of the mannose receptor in the immune response. *Curr. Mol. Med* **1**, 469-474 (2001).
18. Ji, X., Gewurz, H. & Spear, G.T. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. *Mol. Immunol* **42**, 145-152 (2005).
19. Ji, X., Mannose-binding lectin binds to Ebola and Marburg envelope glycoproteins, resulting in blocking of virus interaction with DC-SIGN and complement-mediated virus neutralization. *J. Gen. Virol* **86**, 2535-2542 (2005).
20. Creagh, E.M. & O'Neill, L.A.J. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* **27**, 352-357 (2006).
21. Kato, H., Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**,

- 19-28 (2005).
22. Zhang, J., Kumar, A., Wheeler, M. & Yu, F.X. Lack of MD-2 expression in human corneal epithelial cells is an underlying mechanism of lipopolysaccharide (LPS) unresponsiveness. *Immunol. Cell Biol* **87**, 141-148 (2009).
 23. Takeda, K. [Toll-like receptor]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* **28**, 309-317 (2005).
 24. Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Cell Death Differ* **13**, 816-825 (2006).
 25. O'Neill, L.A.J. The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction. *Biochem. Soc. Trans* **31**, 643-647 (2003).
 26. O'Neill, L.A.J. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr. Opin. Immunol* **18**, 3-9 (2006).
 27. O'Neill, L.A.J. When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction. *Immunity* **29**, 12-20 (2008).
 28. Yamamoto, M. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol* **169**, 6668-6672 (2002).
 29. Yamamoto, M. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-643 (2003).
 30. Yamamoto, M., Takeda, K. & Akira, S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol. Immunol* **40**, 861-868 (2004).
 31. Yamamoto, M. & Akira, S. TIR domain-containing adaptors regulate TLR signaling pathways. *Adv. Exp. Med. Biol* **560**, 1-9 (2005).
 32. Hayashi, F. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-1103 (2001).
 33. Hazeki, K. Toll-like receptor-mediated tyrosine phosphorylation of paxillin via MyD88-dependent and -independent pathways. *Eur. J. Immunol* **33**, 740-747 (2003).
 34. Wu, X. & Peng, S.L. Toll-like receptor 9 signaling protects against murine lupus. *Arthritis Rheum* **54**, 336-342 (2006).
 35. Takeuchi, O. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J. Immunol* **169**, 10-14 (2002).
 36. Aliprantis, A.O. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* **285**, 736-739 (1999).
 37. Takeuchi, O. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443-451 (1999).
 38. Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. & Kirschning, C.J. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem* **274**, 17406-17409 (1999).
 39. Means, T.K. Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. *J. Immunol* **163**, 3920-3927 (1999).
 40. Hajjar, A.M. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J. Immunol* **166**, 15-19 (2001).
 41. Coelho, P.S. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. *J. Leukoc. Biol* **71**, 837-844 (2002).
 42. Opitz, B. Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-

- induced NF-kappaB translocation. *J. Biol. Chem* **276**, 22041-22047 (2001).
43. Werts, C. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol* **2**, 346-352 (2001).
 44. Underhill, D.M. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* **401**, 811-815 (1999).
 45. Asea, A. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem* **277**, 15028-15034 (2002).
 46. Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R. & Flavell, R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738 (2001).
 47. Poltorak, A. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088 (1998).
 48. Kawasaki, K. Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J. Biol. Chem* **275**, 2251-2254 (2000).
 49. Kurt-Jones, E.A. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat. Immunol* **1**, 398-401 (2000).
 50. Rassa, J.C., Meyers, J.L., Zhang, Y., Kudaravalli, R. & Ross, S.R. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **99**, 2281-2286 (2002).
 51. Bulut, Y. Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J. Immunol* **168**, 1435-1440 (2002).
 52. Okamura, Y. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem* **276**, 10229-10233 (2001).
 53. Termeer, C. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med* **195**, 99-111 (2002).
 54. Johnson, G.B., Brunn, G.J., Kodaira, Y. & Platt, J.L. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J. Immunol* **168**, 5233-5239 (2002).
 55. Smiley, S.T., King, J.A. & Hancock, W.W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J. Immunol* **167**, 2887-2894 (2001).
 56. Takeuchi, O. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443-451 (1999).
 57. Takeuchi, O. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol* **13**, 933-940 (2001).
 58. Ozinsky, A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 13766-13771 (2000).
 59. Heil, F. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol* **33**, 2987-2997 (2003).
 60. Hemmi, H. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol* **3**, 196-200 (2002).
 61. Heil, F. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol* **33**, 2987-2997 (2003).
 62. Crompton, P.D. The TLR9 ligand CpG promotes the acquisition of Plasmodium

- falciparum-specific memory B cells in malaria-naive individuals. *J. Immunol* **182**, 3318-3326 (2009).
63. Travassos, L.H. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* **5**, 1000-1006 (2004).
 64. Alexopoulou, L. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat. Med* **8**, 878-884 (2002).
 65. Kasakura, K., Takahashi, K., Aizawa, T., Hosono, A. & Kaminogawa, S. A TLR2 Ligand Suppresses Allergic Inflammatory Reactions by Acting Directly on Mast Cells. *Int. Arch. Allergy Immunol* **150**, 359-369 (2009).
 66. Kawai, T. & Akira, S. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J. Biochem* **141**, 137-145 (2007).
 67. Matsumoto, M. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol* **171**, 3154-3162 (2003).
 68. Fischer, H., Yamamoto, M., Akira, S., Beutler, B. & Svanborg, C. Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. *Eur. J. Immunol* **36**, 267-277 (2006).
 69. Sheedy, F.J. & O'Neill, L.A.J. The Troll in Toll: Mal and Tram as bridges for TLR2 and TLR4 signaling. *J. Leukoc. Biol* **82**, 196-203 (2007).
 70. Hemmi, H. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745 (2000).
 71. Krieg, A.M. A role for Toll in autoimmunity. *Nat. Immunol* **3**, 423-424 (2002).
 72. Ishikawa, T. Deteriorative effect of smoking on target lesion revascularization after implantation of coronary stents with diameter of 3.0 mm or less. *Circ. J* **69**, 227-231 (2005).
 73. Latz, E., Visintin, A., Espevik, T. & Golenbock, D.T. Mechanisms of TLR9 activation. *J. Endotoxin Res* **10**, 406-412 (2004).
 74. Latz, E. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol* **5**, 190-198 (2004).
 75. Wagner, H. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Microbiol* **5**, 62-69 (2002).
 76. Gazzinelli, R.T. & Denkers, E.Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat. Rev. Immunol* **6**, 895-906 (2006).
 77. Ramirez-Ortiz, Z.G. Toll-like receptor 9-dependent immune activation by unmethylated CpG motifs in *Aspergillus fumigatus* DNA. *Infect. Immun* **76**, 2123-2129 (2008).
 78. van de Veerdonk, F.L. *Legionella pneumophila* DNA in serum samples during Legionnaires' disease in relation to C-reactive protein levels. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* **28**, 371-376 (2009).
 79. Cottalorda, A. TLR2 engagement on CD8 T cells lowers the threshold for optimal antigen-induced T cell activation. *Eur. J. Immunol* **36**, 1684-1693 (2006).
 80. Crellin, N.K. Human CD4⁺ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *J. Immunol* **175**, 8051-8059 (2005).
 81. Pasare, C. & Medzhitov, R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity* **21**, 733-741 (2004).
 82. Komai-Koma, M., Jones, L., Ogg, G.S., Xu, D. & Liew, F.Y. TLR2 is expressed on

- activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 3029-3034 (2004).
83. Peng, G. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4⁺ regulatory T cell function. *Science* **309**, 1380-1384 (2005).
 84. Caramalho, I. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med* **197**, 403-411 (2003).
 85. Wesch, D. Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes. *J. Immunol* **176**, 1348-1354 (2006).
 86. Deetz, C.O. Gamma interferon secretion by human Vgamma2Vdelta2 T cells after stimulation with antibody against the T-cell receptor plus the Toll-Like receptor 2 agonist Pam3Cys. *Infect. Immun* **74**, 4505-4511 (2006).
 87. Komai-Koma, M., Jones, L., Ogg, G.S., Xu, D. & Liew, F.Y. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 3029-3034 (2004).
 88. Chen, Q., Davidson, T.S., Huter, E.N. & Shevach, E.M. Engagement of TLR2 does not reverse the suppressor function of mouse regulatory T cells, but promotes their survival. *J. Immunol* **183**, 4458-4466 (2009).
 89. Sobek, V. Direct Toll-like receptor 2 mediated co-stimulation of T cells in the mouse system as a basis for chronic inflammatory joint disease. *Arthritis Res. Ther* **6**, R433-446 (2004).
 90. Kabelitz, D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol* **19**, 39-45 (2007).
 91. Bendigs, S., Salzer, U., Lipford, G.B., Wagner, H. & Heeg, K. CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol* **29**, 1209-1218 (1999).
 92. Dolganiuc, A., Garcia, C., Kodys, K. & Szabo, G. Distinct Toll-like receptor expression in monocytes and T cells in chronic HCV infection. *World J. Gastroenterol* **12**, 1198-1204 (2006).
 93. Månsson, A., Adner, M., Höckerfelt, U. & Cardell, L. A distinct Toll-like receptor repertoire in human tonsillar B cells, directly activated by PamCSK, R-837 and CpG-2006 stimulation. *Immunology* **118**, 539-548 (2006).
 94. Mansson, A., Adner, M. & Cardell, L.O. Toll-like receptors in cellular subsets of human tonsil T cells: altered expression during recurrent tonsillitis. *Respir. Res* **7**, 36 (2006).
 95. Chang, X., Zheng, P. & Liu, Y. FoxP3: a genetic link between immunodeficiency and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* **5**, 399-402 (2006).
 96. Suttmuller, R.P.M., Morgan, M.E., Netea, M.G., Grauer, O. & Adema, G.J. Toll-like receptors on regulatory T cells: expanding immune regulation. *Trends Immunol* **27**, 387-393 (2006).
 97. Wang, R., Peng, G. & Wang, H.Y. Regulatory T cells and Toll-like receptors in tumor immunity. *Semin. Immunol* **18**, 136-142 (2006).
 98. Remold-O'Donnell, E. & Parent, D. Downregulation of neutrophil CD43 by opsonized zymosan. *Blood* **85**, 337-342 (1995).
 99. Aguilar-Delfin I. Fierro NA, Rosenstein Y., CD43 : Full Text : UCSD-Nature Molecule Pages. en <<http://www.signaling-gateway.org/molecule/query;jsessionid=c6ca4bf1229c98dbcdf2faee4537ac4dcf9e36bc86d?afcsid=A000565&type=abstract>>

100. Cyster, J.G. & Williams, A.F. The importance of cross-linking in the homotypic aggregation of lymphocytes induced by anti-leukosialin (CD43) antibodies. *Eur. J. Immunol* **22**, 2565-2572 (1992).
101. Fukuda, M., Carlsson, S.R., Klock, J.C. & Dell, A. Structures of O-linked oligosaccharides isolated from normal granulocytes, chronic myelogenous leukemia cells, and acute myelogenous leukemia cells. *J. Biol. Chem* **261**, 12796-12806 (1986).
102. Piller, F., Piller, V., Fox, R.I. & Fukuda, M. Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis. *J. Biol. Chem* **263**, 15146-15150 (1988).
103. Remold-O'Donnell, E., Zimmerman, C., Kenney, D. & Rosen, F.S. Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* **70**, 104-109 (1987).
104. Pallant, A. Characterization of cDNAs encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **86**, 1328-1332 (1989).
105. Shelley, C.S. . Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **86**, 2819-2823 (1989).
106. Alvarado, M., Klassen, C., Cerny, J., Horejsí, V. & Schmidt, R.E. MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation. *Eur. J. Immunol* **25**, 1051-1055 (1995).
107. Pedraza-Alva, G., Mérida, L.B., Burakoff, S.J. & Rosenstein, Y. CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase. *J. Biol. Chem* **271**, 27564-27568 (1996).
108. Andersson, C.X. CD43 has a functional NLS, interacts with beta-catenin, and affects gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **316**, 12-17 (2004).
109. Fitzgerald, K.A. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med* **198**, 1043-1055 (2003).
110. Ardman, B., Sikorski, M.A., Settles, M. & Staunton, D.E. Human immunodeficiency virus type 1-infected individuals make autoantibodies that bind to CD43 on normal thymic lymphocytes. *J. Exp. Med* **172**, 1151-1158 (1990).
111. Woodman, R.C. The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice. *J. Exp. Med* **188**, 2181-2186 (1998).
112. McEvoy, L.M., Sun, H., Frelinger, J.G. & Butcher, E.C. Anti-CD43 inhibition of T cell homing. *J. Exp. Med* **185**, 1493-1498 (1997).
113. Johnson, G.G., Mikulowska, A., Butcher, E.C., McEvoy, L.M. & Michie, S.A. 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 (1999).
114. Sperling, A.I. CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28. *J. Exp. Med* **182**, 139-146 (1995).
115. He, Y.W. & Bevan, M.J. High level expression of CD43 inhibits T cell receptor/CD3-mediated apoptosis. *J. Exp. Med* **190**, 1903-1908 (1999).
116. Brown, T.J. Characterization of a CD43/leukosialin-mediated pathway for inducing apoptosis in human T-lymphoblastoid cells. *J. Biol. Chem* **271**, 27686-27695 (1996).
117. CD43 : Full Text : UCSD-Nature Molecule Pages. en <<http://www.signaling-gateway.org/molecule/query.jsessionid=c6ca4bf1229c98dbcdf2faee4537ac4dcf9e36b>

- cb86d?afcsid=A000565&type=abstract>
118. Pedraza-Alva, G., Mérida, L.B., Burakoff, S.J. & Rosenstein, Y. T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation. *J. Biol. Chem* **273**, 14218-14224 (1998).
 119. Santana, M.A. CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NFkappa B transcription factors in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem* **275**, 31460-31468 (2000).
 120. Fierro, N.A., Pedraza-Alva, G. & Rosenstein, Y. TCR-dependent cell response is modulated by the timing of CD43 engagement. *J. Immunol* **176**, 7346-7353 (2006).
 121. Rosenstein, Y. CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1. *Nature* **354**, 233-235 (1991).
 122. Stöckl, J. Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation. *J. Exp. Med* **184**, 1769-1779 (1996).
 123. Baum, L.G. Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. *J. Exp. Med* **181**, 877-887 (1995).
 124. Nathan, C., Xie, Q.W., Halbwachs-Mecarelli, L. & Jin, W.W. Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43 (sialophorin, leukosialin). *J. Cell Biol* **122**, 243-256 (1993).
 125. Matsumoto, M. CD43 functions as a ligand for E-Selectin on activated T cells. *J. Immunol* **175**, 8042-8050 (2005).
 126. van den Berg, T.K. Cutting edge: CD43 functions as a T cell counterreceptor for the macrophage adhesion receptor sialoadhesin (Siglec-1). *J. Immunol* **166**, 3637-3640 (2001).
 127. Hirano, K. A multifunctional shuttling protein nucleolin is a macrophage receptor for apoptotic cells. *J. Biol. Chem* **280**, 39284-39293 (2005).
 128. Montiel, J.L. Anti-CD43 and anti-galectin-1 autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Rheumatol* **39**, 50-57 (2010).
 129. Khan, S., Holding, S., Doré, P.C. & Sewell, W.A.C. Abnormal O-glycosylation of CD43 may account for some features of Wiskott-Aldrich syndrome. *Med. Hypotheses* **70**, 269-272 (2008).
 130. Giordanengo, V. 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 (1995).
 131. Lantéri, M. Altered T cell surface glycosylation in HIV-1 infection results in increased susceptibility to galectin-1-induced cell death. *Glycobiology* **13**, 909-918 (2003).
 132. Barat, C. & Tremblay, M.J. Engagement of CD43 enhances human immunodeficiency virus type 1 transcriptional activity and virus production that is induced upon TCR/CD3 stimulation. *J. Biol. Chem* **277**, 28714-28724 (2002).
 133. Abramson, J.S. & Hudnor, H.R. Role of the sialophorin (CD43) receptor in mediating influenza A virus-induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction. *Blood* **85**, 1615-1619 (1995).
 134. Hartshorn, K.L. Neutrophil deactivation by influenza A virus. Role of hemagglutinin binding to specific sialic acid-bearing cellular proteins. *J. Immunol* **154**, 3952-3960 (1995).

135. Gao, W. & Pereira, M.A. Trypanosoma cruzi trans-sialidase potentiates T cell activation through antigen-presenting cells: role of IL-6 and Bruton's tyrosine kinase. *Eur. J. Immunol* **31**, 1503-1512 (2001).
136. Fratazzi, C. A macrophage invasion mechanism for mycobacteria implicating the extracellular domain of CD43. *J. Exp. Med* **192**, 183-192 (2000).
137. Randhawa, A.K., Ziltener, H.J. & Stokes, R.W. CD43 controls the intracellular growth of Mycobacterium tuberculosis through the induction of TNF-alpha-mediated apoptosis. *Cell. Microbiol* **10**, 2105-2117 (2008).
138. Remold-O'Donnell, E. & Parent, D. Downregulation of neutrophil CD43 by opsonized zymosan. *Blood* **85**, 337-342 (1995).
139. Siednienko, J. & Miggin, S.M. Expression analysis of the Toll-like receptors in human peripheral blood mononuclear cells. *Methods Mol. Biol* **517**, 3-14 (2009).
140. Remold-O'Donnell, E. Characterization of a human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Exp. Med* **159**, 1705-1723 (1984).
141. Stefanová, I., Hilgert, I., Angelisová, P., Kristofová, H. & Horejsí, V. Characterization of a 95 kDa human leucocyte sialoglycoprotein: its identity with CD43, gpL115, leukosialin and sialophorin. *Folia Biol. (Praha)* **34**, 255-265 (1988).
142. Stross, W.P. Molecule detected in formalin fixed tissue by antibodies MT1, DF-T1, and L60 (Leu-22) corresponds to CD43 antigen. *J. Clin. Pathol* **42**, 953-961 (1989).
143. Mambula, S.S., Sau, K., Henneke, P., Golenbock, D.T. & Levitz, S.M. Toll-like receptor (TLR) signaling in response to Aspergillus fumigatus. *J. Biol. Chem* **277**, 39320-39326 (2002).
144. Zhu, K. Increased endocytic activity in monocyte-derived dendritic cells in patients with psoriasis vulgaris. *Indian J. Med. Res* **123**, 43-50 (2006).
145. Shibata, K., Hasebe, A., Into, T., Yamada, M. & Watanabe, T. The N-terminal lipopeptide of a 44-kDa membrane-bound lipoprotein of Mycoplasma salivarium is responsible for the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the cell surface of normal human gingival fibroblasts. *J. Immunol* **165**, 6538-6544 (2000).
146. Akira, S. & Hemmi, H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett* **85**, 85-95 (2003).
147. Andersson, C.X. Shedding and gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis of the mucin-type molecule CD43. *Biochem. J* **387**, 377-384 (2005).
148. Simone, R., Floriani, A. & Saverino, D. Stimulation of Human CD4 T Lymphocytes via TLR3, TLR5 and TLR7/8 Up-Regulates Expression of Costimulatory and Modulates Proliferation. *Open Microbiol J* **3**, 1-8 (2009).
149. Bazil, V. & Strominger, J.L. CD43, the major sialoglycoprotein of human leukocytes, is proteolytically cleaved from the surface of stimulated lymphocytes and granulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **90**, 3792-3796 (1993).
150. Bazil, V. A monoclonal antibody recognizing CD43 (leukosialin) initiates apoptosis of human hematopoietic progenitor cells but not stem cells. *Blood* **87**, 1272-1281 (1996).
151. Mambole, A. The cleavage of neutrophil leukosialin (CD43) by cathepsin G releases its extracellular domain and triggers its intramembrane proteolysis by presenilin/gamma-secretase. *J. Biol. Chem* **283**, 23627-23635 (2008).
152. Schmid, K. Amino acid sequence of human plasma galactoglycoprotein: identity with the extracellular region of CD43 (sialophorin). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **89**, 663-

- 667 (1992).
153. Szabady, R.L., Lokuta, M.A., Walters, K.B., Huttenlocher, A. & Welch, R.A. Modulation of neutrophil function by a secreted mucinase of *Escherichia coli* O157:H7. *PLoS Pathog* **5**, e1000320 (2009).
 154. Kawamura, T. Matrix metalloproteinase-3 enhances the free fatty acids-induced VEGF expression in adipocytes through toll-like receptor 2. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **233**, 1213-1221 (2008).
 155. Jackson, L., Cady, C.T. & Cambier, J.C. TLR4-mediated signaling induces MMP9-dependent cleavage of B cell surface CD23. *J. Immunol* **183**, 2585-2592 (2009).
 156. Pedraza-Alva, G. Regulation of Cbl molecular interactions by the co-receptor molecule CD43 in human T cells. *J. Biol. Chem* **276**, 729-737 (2001).
 157. Layseca-Espinosa, E. Expression of CD64 as a potential marker of neonatal sepsis. *Pediatr Allergy Immunol* **13**, 319-327 (2002).
 158. Cruz-Muñoz, M.E. The CD43 coreceptor molecule recruits the zeta-chain as part of its signaling pathway. *J. Immunol* **171**, 1901-1908 (2003).
 159. del Rio, R. PKCtheta is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **325**, 133-143 (2004).
 160. Fernandez-Cabezudo, M.J., Vijayasarathy, C., Pflugh, D.L., Bothwell, A.L.M. & al-Ramadi, B.K. Evidence for a dual pathway of activation in CD43-stimulated Th2 cells: differential requirement for the Lck tyrosine kinase. *Int. Immunol* **16**, 1215-1223 (2004).
 161. Silverman, L.B. Mechanism of mononuclear cell activation by an anti-CD43 (sialophorin) agonistic antibody. *J. Immunol* **142**, 4194-4200 (1989).
 162. Babina, M., Weber, S. & Henz, B.M. CD43 (leukosialin, sialophorin) expression is differentially regulated by retinoic acids. *Eur. J. Immunol* **27**, 1147-1151 (1997).
 163. Seo, W. & Ziltener, H.J. CD43 processing and nuclear translocation of CD43 cytoplasmic tail are required for cell homeostasis. *Blood* **114**, 3567-3577 (2009).