



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Las señales de CD43 promueven la activación de vías que favorecen la supervivencia de los linfocitos T

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctor en Ciencias

PRESENTA:

María Elena Bravo Adame

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay
(Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Claudia González Espinosa
(Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional)

Dr. Federico Sánchez Rodríguez
(Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México)

Ciudad de México, Noviembre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO DE EXAMEN

Dr. Jean Louis Charli Casalonga
(Presidente)

Dr. Fernando Esquivel Guadarrama
(Secretario)

Dra. Rosa Victoria Pando Robles
(Vocal)

Dr. Vianney Ortiz Navarrete
(Vocal)

Dra. Carmen Beltrán Núñez
(Vocal)

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se desarrolló con fondos provenientes de diferentes proyectos:

PAPIIT: IN219307, IN206913, IN212716

CONACYT: 100275, 220990

Asimismo, conté con una beca CONACYT durante el doctorado (Núm. Becario: 172690) y con el apoyo del “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)” para la asistencia a cursos y congresos.

Al Banco de Sangre del Hospital Regional del IMSS y el Centro Regional para la Transfusión Sanguínea en Cuernavaca, Morelos, por contribuir con la materia prima para mis experimentos.

A la Unidad de Docencia del IBt por todo su apoyo durante mis estudios de posgrado.

A los miembros de mi comité tutorial por sus críticas, sus sugerencias, sus consejos y su entusiasmo. Gracias por la orientación y el apoyo que siempre me brindaron.

A los miembros del jurado de examen por las recomendaciones hechas a mi trabajo y por sus palabras cuando nos sentamos a revisar mi tesis.

A la Dra. Yvonne Rosenstein por haberme aceptado en el laboratorio, por su confianza, sus consejos, sus críticas y sugerencias. Gracias por abrirme las puertas para entrar en el mundo de la ciencia. Gracias por el apoyo que siempre me brindó, en lo académico y en lo personal, ¡muchas gracias!

A la Dra. Rosario Vera y a la Dra. Bronwyn Barkla porque siempre me apoyaron durante esta etapa. Gracias por sus consejos, por sus pláticas, por estar siempre dispuestas a contribuir en todas las maneras posibles. Gracias porque siempre me recibieron con una amable sonrisa para escucharme, aconsejarme y ayudarme cada vez que se los pedí.

Al Dr. Omar Pantoja por el entusiasmo que siempre mostró, por toda su ayuda y sus consejos.

Al Dr. Gustavo Pedraza, al Dr. Mario Cruz y al Dr. Ismael Secundino por estar siempre abiertos a escuchar y ayudarme a resolver mis dudas, por las preguntas, las críticas y las sugerencias hechas a mi trabajo. ¡Gracias!

A todos los miembros del laboratorio: Erika, Monse, Daniela, Álvaro, Steph, Ángel, Víctor, Alicia, Roberto, Constance, Pablo, Brenda, Paulina, Nacho, Citlali y Cecilia. Gracias por siempre animarme y apoyarme, por sus preguntas, sus sugerencias, por todas las cosas que aprendí de ustedes. Gracias por las pláticas tan divertidas, por ser unos excelentes compañeros y amigos.

A mis papás, por toda su confianza y por el apoyo que siempre me han dado. Gracias por ayudarme a terminar esta etapa, siempre han sido un ejemplo de éxito personal y profesional y por eso este logro es de ustedes también. Gracias por siempre animarme a salir adelante, por sus consejos, por ser un pilar y un ejemplo tan importante en mi vida. Gracias por todo lo que han hecho para mi formación como profesionista y como persona. Gracias por ser mi guía y un apoyo tan importante para la formación de “mi pequeña familia”. Los adoro!!!

A Israel, gracias amor por tu apoyo incondicional, por motivarme a seguir adelante y escucharme siempre. Gracias por ayudarme a cumplir mis sueños, por tu paciencia y por acompañarme a lo largo de todos estos años, este logro también es tuyo ojos. Gracias por compartir conmigo sueños y aspiraciones, por trabajar siempre juntos para lograr nuestras metas personales. ¡Gracias por formar conmigo una hermosa familia, te amo ojos!

A Regina, mi princesa, eres nuestra más grande bendición, nuestro orgullo, nuestro motor para superarnos, para unirnos más como familia. Gracias por todas tus sonrisas, tus abrazos y tu amor. Te amo princesa y siempre recuerda que puedes lograr todos tus sueños.

Al resto de mi familia, no menciono todos sus nombres, pero saben que les agradezco enormemente su interés, su cariño y el apoyo que siempre me han demostrado.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	11
1.1 La respuesta inmune	12
1.1.1 La respuesta celular.....	14
1.1.2 El receptor para el antígeno: el complejo TCR-CD3	15
1.2 Metabolismo de los linfocitos T	17
1.2.1 Flexibilidad en el metabolismo de los linfocitos T	18
1.2.2 Las señales co-estimuladoras regulan el metabolismo de los linfocitos T.....	22
1.2.3 El metabolismo define la viabilidad de los linfocitos T	25
1.3 CD43	27
1.3.1 El gen	28
1.3.2 La proteína	29
1.3.3 Regulación de la expresión de CD43	31
1.3.4 Los ligandos	32
1.3.5 Las funciones	34
1.3.6 CD43: una molécula accesoria	36
1.3.7 Participación de CD43 en distintas patologías	38
II. HIPÓTESIS	42
III. OBJETIVO	44
IV. RESULTADOS PUBLICADOS.....	46
V. RESULTADOS NO PUBLICADOS.....	60
5.1 Expresión diferencial de proteínas en respuesta al entrecruzamiento del TCR y CD43 ...	61
5.2 Las señales conjuntas del TCR y de CD43 modulan el metabolismo de glucosa	66
5.3 Las señales de CD43 inducen la expresión del transportador de glucosa Glut-1 de manera dependiente de la vía de PI3K/Akt/mTOR	68
5.4 La interacción de CD43 con HSA favorece la supervivencia de los linfocitos T	71
VI. DISCUSIÓN	74

VII. CONCLUSIÓN	82
VIII. REFERENCIAS	84
IX. ANEXOS.....	97
Anexo 1. Materiales y Métodos	99
Anexo 2. Revisión “CD43”	105
Anexo 3. Lista de proteínas identificadas por spot en el análisis proteómico.....	114
Anexo 4. Lista total de proteínas identificadas y número de acceso en Uniprot	142
Anexo 5. Resultado del análisis bioinformático utilizando la herramienta DAVID para identificar procesos biológicos enriquecidos	144
Anexo 6. Resultado del análisis bioinformático utilizando la herramienta STRING para identificar procesos biológicos enriquecidos	145
Anexo 7. Resultado del análisis bioinformático utilizando la herramienta STRING para identificar las vías enriquecidas.....	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Cooperación entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa.	13
El complejo del receptor para el antígeno TCR.	16
Modelo de activación de linfocitos T dependiente de dos señales.	17
Metabolismo de glucosa en linfocitos T.	18
Los programas metabólicos de los linfocitos T varían de acuerdo a sus necesidades funcionales. .	19
La regulación del metabolismo de glucosa en células en reposo y activadas.	20
Programas metabólicos de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T.	22
La vía de PI-3K/Akt/mTOR.	25
Los linfocitos T requieren señales extracelulares para cubrir sus demandas metabólicas y sobrevivir.	27
Estructura de los O-glicanos de CD43.	31
Alineamiento múltiple de la región intracelular de CD43.	37
Vías de señalización que se activan en respuesta a las señales generadas por el entrecruzamiento de CD43.	38
Activación de linfocitos T CD4+ a través del TCR y CD43.	62
2D-DIGE.	63
Procesos biológicos enriquecidos en células co-estimuladas a través del TCR y CD43.	65
Las señales de CD43 inducen moderadamente la producción de lactato y el consumo de glucosa. 67	
Las señales de CD43 inducen un aumento en la expresión de Glut-1 en la membrana.	69
La expresión de Glut-1 en la membrana de linfocitos estimulados a través del TCR y CD43 o CD28 se induce a partir de 1 hora de activación.	70
La translocación de Glut-1 a la membrana en respuesta a las señales del TCR y CD43 depende de la vía de PI3K y mTOR.	71
La unión de HSA a CD43 aumenta la viabilidad de los linfocitos T.	72
La estimulación a través de CD43 activa la vía de Akt.	73
Vía de señalización de CD43.	78

ABREVIATURAS

2D-DIGE	Two-dimensional difference in gel electrophoresis
APC	Antigen presenting cell
Bad	Bcl-2 associated death promoter
CREB	cAMP response element binding protein
Glut-1	Glucose transporter 1
HSA	Human serum albumin
LDH	Lactate dehydrogenase
MEK5	Mitogen activated protein kinase kinase 5
PEP	Phosphoenolpyruvate
PKM2	Pyruvate kinase isoform M2
PPP	Pentose phosphate pathway
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
TCR	T cell receptor

RESUMEN

CD43 es una de las moléculas co-estimuladoras más abundantes en la superficie de los linfocitos T. En este trabajo nos enfocamos en evaluar por medio de un análisis proteómico la importancia que tienen las señales co-estimuladoras de CD43 en la regulación de la supervivencia de células linfoides. Utilizando citometría de flujo mostramos que las señales de CD43 favorecen la localización del transportador de glucosa Glut-1 en la membrana celular. Aunque los ensayos de actividad enzimática mostraron un incremento ligero en la ingesta y el metabolismo de glucosa, la fosforilación de la enzima glicolítica piruvato cinasa M2 en la Y¹⁰⁵ en respuesta al entrecruzamiento del TCR y de CD43, promueve una función alterna de la piruvato cinasa M2 que favorece la supervivencia de las células. Por medio de la co-estimulación de los linfocitos con anticuerpos anti-TCR y anti-CD43 describimos una vía de señalización que no había sido identificada para CD43, donde destaca la participación de la piruvato cinasa M2, PKA, Stat3 y ERK5 como proteínas reguladoras que favorecen la supervivencia al inducir la fosforilación de blancos como CREB y Bad. Asimismo, la incubación de los linfocitos con albúmina sérica humana, uno de los ligandos naturales de CD43, induce la activación de la vía de PI-3K/Akt, la cual junto con mTOR, regula la localización de Glut-1 hacia la membrana. Finalmente, la incubación de los linfocitos T con albúmina sérica humana también favorece la supervivencia, evaluada por la reducción de sales de tetrazolio y por citometría de flujo. En conjunto, nuestros resultados demuestran la activación de nuevas vías de señalización en respuesta a las señales co-estimuladoras del CD43, y resaltan su importancia para promover la viabilidad de los linfocitos T.

ABSTRACT

CD43 is one of the most abundant co-stimulatory molecules in the T cell surface. Here we used a proteomic approach to evaluate the importance of CD43 co-stimulatory signals in the regulation of cell viability. Our flow cytometry results show that CD43 signals promote the translocation of the glucose transporter Glut-1 to the cell surface. Even though only a mild increase in glucose uptake and metabolism was detected in enzyme activity assays, the tyrosine phosphorylation (Y¹⁰⁵) of the glycolytic enzyme pyruvate kinase M2 resulting of TCR and CD43 crosslinking, induces an alternative function for pyruvate kinase M2 that promotes cell survival. Lymphocyte co-stimulation through the TCR and CD43 with specific antibodies allowed us to describe a new signaling pathway for CD43, where pyruvate kinase M2, PKA, Stat3, and ERK5 regulate cell survival through phosphorylation of CREB and Bad. In addition, treatment with human serum albumin, one of the natural ligands of CD43, induces the activation the PI-3K/Akt pathway, which together with the mTOR pathway, regulates Glut-1 translocation to the plasma membrane. Finally, treatment with human serum albumin also favored T cell survival, as measured by the reduction of tetrazolium salts and flow cytometry. Altogether, our results describe the activation of novel signaling pathways for CD43, and underscore a role for this molecule in promoting cell survival.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 La respuesta inmune

El sistema inmunológico protege al organismo de sustancias u organismos potencialmente nocivos, distinguiendo entre los antígenos propios del cuerpo y los extraños, para los cuales se produce una respuesta. Las células y moléculas responsables de tal respuesta constituyen el sistema inmunológico. El efecto de reconocimiento y protección contra un antígeno determinado se lleva a cabo a través de dos tipos de respuesta inmune: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa [1].

La respuesta inmune innata se desarrolla como primera línea de defensa contra patógenos. Entre los mecanismos efectores de la respuesta innata, se encuentran barreras fisicoquímicas como la piel y las mucosas; células, como los macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales (NK) y células cebadas; y moléculas, como el complemento, el interferón γ (IFN- γ) o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Las células de la respuesta innata reconocen Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) a través de seis familias de receptores conocidos como Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs, por sus siglas en inglés), entre los cuales figuran los Receptores tipo Toll (TLRs), Receptores tipo NOD (NLRs), Lectinas tipo C (CTLs), Receptores tipo RIG-I (RLRs), Receptores tipo AIM2 (ALRs), y los Receptores tipo OAS (OLRs) [2].

Al activarse a través de estos receptores, las células del sistema inmune innato aumentan la fagocitosis y la expresión de moléculas co-estimuladoras en la superficie celular, las cuales a su vez son necesarias para la activación de las células del sistema inmune adaptativo durante el reconocimiento del antígeno. Asimismo, las células del sistema inmune innato secretan citocinas y quimiocinas que reclutan a las células del sistema inmune adaptativo hacia los sitios de inflamación. Así, las células de la respuesta innata y la respuesta adaptativa trabajan en conjunto para la eliminación de patógenos (Fig. 1). Originalmente se consideraba que sólo la respuesta inmune adaptativa poseía la capacidad de generar memoria, sin embargo, se ha sugerido que, tras una primera exposición a un antígeno, las células del sistema inmune innato sufren cambios epigenéticos que le permiten montar una respuesta aumentada ante una segunda exposición a diferentes estímulos [3-5].

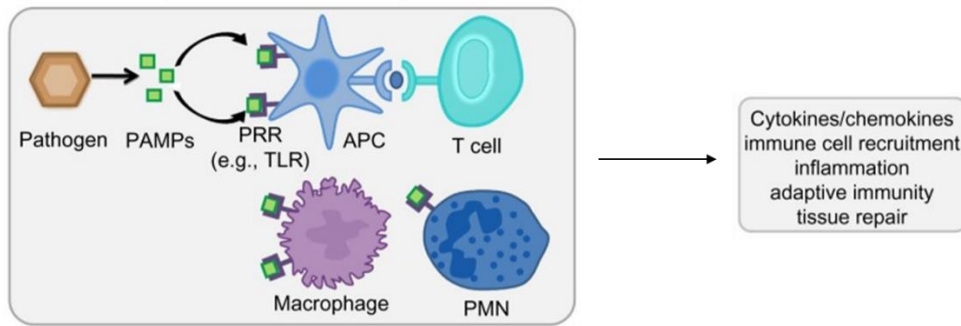


Fig. 1. Cooperación entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa.

El reconocimiento de patógenos a través de PRRs induce la activación de células de la respuesta inmune innata que, mediante la secreción de citocinas y la expresión de moléculas co-estimuladoras en su superficie, favorecen la activación de los linfocitos. Tomado de [6].

Los componentes principales de la respuesta inmune adaptativa son los linfocitos T, los linfocitos B y las células dendríticas [1]. Las características principales de la respuesta adaptativa son la habilidad para reconocer de manera específica a diferentes patógenos y la protección mejorada ante una re-infección por el mismo patógeno [7]. La respuesta inmune adaptativa supera las limitaciones de la respuesta inmune innata al permitir el reconocimiento de una diversidad casi infinita de antígenos, de tal forma que la respuesta a cada patógeno es dirigida de manera específica. Esto es posible porque cada linfocito posee un receptor para el antígeno con diferente especificidad. Como se menciona en la Sección 1.1.2, dicha especificidad está determinada por mecanismos genéticos que operan durante el desarrollo de los linfocitos en la médula ósea y en el timo y que generan millones de variantes de los genes que codifican el receptor para el antígeno (TCR). Por lo tanto, dado que un linfocito posee un receptor para el antígeno específico para un solo antígeno, la especificidad de cada linfocito es diferente, lo que asegura que los millones de linfocitos presentes en el organismo conformen un repertorio amplio de especificidades. Sólo los linfocitos que se encuentren con su antígeno serán activados para proliferar y diferenciarse a células efectoras que eliminarán al patógeno. Una subpoblación de los linfocitos que proliferan se diferencian a células de memoria, que responderán rápidamente ante un segundo encuentro con el mismo patógeno [7]. La memoria de la inmunidad adaptativa es específica para un antígeno y tiene una duración prolongada [5].

La respuesta adaptativa se clasifica a su vez en dos tipos: la respuesta humoral, mediada por los linfocitos B, y la respuesta celular, mediada por los linfocitos T.

1.1.1 La respuesta celular

Los linfocitos T son los componentes esenciales de la respuesta celular específica y se clasifican en dos poblaciones principales: los linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos T CD8⁺. En humanos, las primeras representan aproximadamente el 65% de las células T, y las segundas corresponden al 35% restante. En conjunto, ambas poblaciones ejercen un papel central en la inmunidad mediada por células y cooperan con los linfocitos B en la generación de anticuerpos [1].

Los linfocitos T CD4⁺ reconocen al péptido antigénico presentado por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II y desempeñan una función crucial en la respuesta inmune, ya que tras reconocer al antígeno a través del receptor para el antígeno (TCR), y con la participación de una serie de moléculas co-estimuladoras, se activan y expanden clonalmente, secretando citocinas clave para la activación de otras células (B, T, macrófagos), motivo por el cual reciben la denominación de linfocitos T cooperadores [1]. Funcionalmente, se han descrito distintos tipos de poblaciones de linfocitos T cooperadores (Th): Th1 que participan en la respuesta a bacterias intracelulares liberando IFN- γ ; Th2 que promueven las respuestas humorales y confieren protección contra patógenos extracelulares produciendo IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10; Th9 que tienen un papel protector frente a tumores y nemátodos y producen IL-9 e IL-10; Th17, productoras de IL-17, IL-21 e IL-22 para la respuesta a infecciones por bacterias extracelulares y hongos; Th22 que secretan IL-22 y participan en la inmunidad de mucosas; células T foliculares (T_{FH}), productoras de IL-21, involucradas en la respuesta de los centros germinales y en la cooperación con los linfocitos B; y células Treg que regulan la respuesta de los linfocitos T mediante la producción de IL-10 y TGF- β [8-11]. Las vías de diferenciación que originan estos grupos no son definitivas, pues algunas subpoblaciones pueden adquirir la habilidad de producir citocinas específicas de otros linajes [12]. Por otra parte, los linfocitos T CD8⁺, o linfocitos citotóxicos, reconocen antígenos expuestos en moléculas MHC-I de células propias infectadas con virus o transformadas. Las señales generadas por el reconocimiento del antígeno a través del TCR, y las de las moléculas co-estimuladoras con sus contra-receptores, junto con aquellas proporcionadas por la interacción de las citocinas presentes con sus respectivos receptores, provoca la activación y proliferación de los linfocitos T, culminando con la lisis de células propias enfermas [1].

1.1.2 El receptor para el antígeno: el complejo TCR-CD3

El receptor para el antígeno de los linfocitos T (TCR) es un receptor de membrana formado por heterodímeros de las cadenas $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$, cada una de las cuales contiene un dominio variable y uno constante en la región extracelular. Los TCRs funcionales se generan a partir de la recombinación somática de los segmentos V-D-J de la cadena β , y los segmentos V y J de la cadena α . En humanos existen 42 segmentos funcionales $V\beta$, 2 $D\beta$, 12 $J\beta$, 43 $V\alpha$ y 58 $J\alpha$. Durante el desarrollo de los linfocitos T en el timo, los segmentos génicos se recombinan y sufren splicing junto con la región constante (C) para dar lugar a un TCR $\alpha\beta$ funcional, de manera que cada linfocito T expresa sólo un tipo de receptor recombinado. Los dominios variables se encuentran en la región amino terminal de las cadenas y presentan secuencias muy diversas que dan lugar a tres regiones hipervariables (CDRs, del inglés Complementarity-Determining Regions). La diversidad de los segmentos $V\alpha$ y $V\beta$ depende del uso de diferentes regiones CDR, codificadas en distintos segmentos V. Potencialmente, la diversidad del TCR se ubica en un rango de 10^{12} - 10^{15} TCRs diferentes. Sin embargo, después de la selección positiva y negativa en el timo, el número de TCRs $\alpha\beta$ en el repertorio de un humano es aproximadamente 2×10^7 [13] (Fig. 2A). En los dominios constantes, la secuencia es altamente conservada y se localiza además una secuencia corta de conexión que permite la formación de un enlace disulfuro entre las dos cadenas del receptor. El dominio intracelular del TCR es corto, formado por solamente 5 a 12 aminoácidos y su región transmembranal contiene cargas positivas que favorecen las interacciones de este receptor con el complejo CD3, el cual es responsable de la transducción de señales en respuesta al reconocimiento del antígeno [3] (Fig. 2 B).

El complejo CD3 al cual se asocia el TCR es un complejo macromolecular formado por cinco cadenas polipeptídicas. Las cadenas del complejo CD3 se asocian entre sí para dar lugar a tres dímeros que difieren en la composición de sus cadenas: un heterodímero $\gamma\epsilon$, un heterodímero $\delta\epsilon$ y un homodímero $\zeta\zeta$ o un heterodímero $\zeta\eta$. La cadena ζ se caracteriza por tener una región extracelular muy corta, una región transmembranal con cargas negativas que le permiten interactuar con las cargas positivas de la región transmembranal del TCR, y finalmente una cola citoplasmática larga en la que destacan los llamados "Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs" (ITAMs). El estado de fosforilación de las tirosinas de los ITAMs regula la interacción de estas cadenas polipeptídicas con cinasas de tirosinas, y participa de manera importante en la transducción de señales. Las cadenas γ , δ y ϵ contienen un solo ITAM, mientras que las cadenas ζ y η contienen tres [3]. Por lo tanto, el complejo TCR-CD3 consta de cuatro dímeros: el heterodímero $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$ del TCR que determina la especificidad de la unión al antígeno, y tres dímeros CD3 que se requieren para la expresión del TCR en la membrana, así como para la transducción de señales [3] (Fig. 2 B).

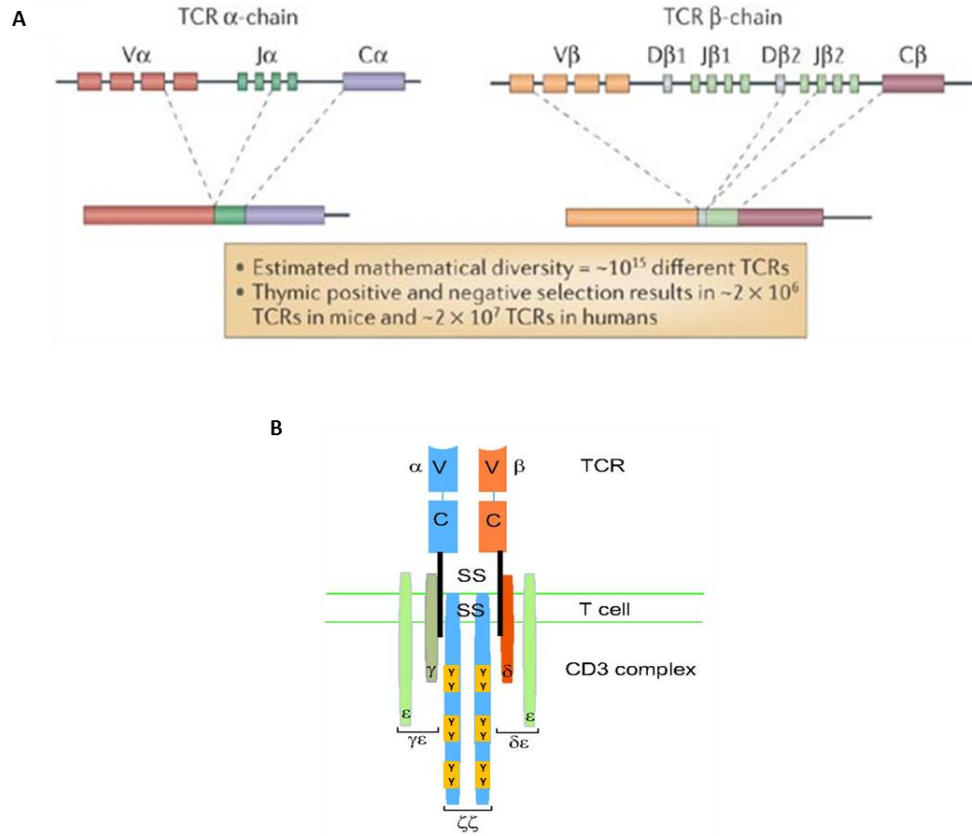


Fig. 2. El complejo del receptor para el antígeno TCR.

A, Recombinación de los segmentos V-(D)-J del dominio variable de las cadenas α β . B, Estructura del receptor para el antígeno asociado al complejo CD3. Modificado de [13, 14].

A pesar de transducir numerosas señales, las señales intracelulares que se generan a partir del solo reconocimiento del antígeno por el complejo TCR-CD3 no son suficientes para activar a los linfocitos. Se considera que la activación exitosa de los linfocitos T requiere por lo menos de dos tipos de señales: 1) las generadas por la interacción específica del TCR con los péptidos presentados por las moléculas del MHC de las células presentadoras de antígeno (APCs) y 2) las que resultan de la interacción de moléculas co-receptoras en la superficie de las células T con sus contra-receptores en las APCs [1] (Fig. 3). Cuando las moléculas co-estimuladoras entran en contacto con sus ligandos en las APCs, regulan la migración, el reconocimiento, la adhesión, la activación y las múltiples funciones efectoras de los linfocitos. Asimismo, las señales generadas por moléculas co-estimuladoras permiten cubrir los requerimientos metabólicos de las células [15, 16] al mantener la ingesta basal de nutrientes de las células en reposo, así como promoviendo el

incremento en la demanda energética y biosintética de las células activadas [17-19]. De esta forma, la modulación de la señalización de células T se da por la contribución de múltiples moléculas co-receptoras, entre las cuales destacan CD2, CD4, CD8, CD28, CD40-L, integrinas y CD43, entre otras.

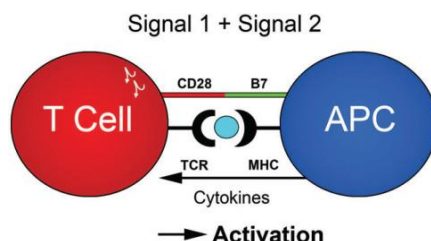


Fig. 3. Modelo de activación de linfocitos T dependiente de dos señales.

La señal 1 corresponde al reconocimiento del antígeno a través del TCR y la señal 2 depende de la interacción de moléculas co-estimuladoras en los linfocitos T con sus ligandos en las APCs. Tomado de [20].

1.2 Metabolismo de los linfocitos T

El entrecruzamiento del TCR inicia una respuesta transcripcional y traduccional necesaria para la función efectora [15]. Para poder crecer y dividirse, los linfocitos T, como todas las células en etapa de proliferación, requieren generar precursores de carbono, equivalentes reductores (NADPH) y energía libre (ATP) para la síntesis de biomoléculas [21]. La glucosa es la principal fuente de energía y de precursores biosintéticos [22], por lo que el primer paso limitante en la disponibilidad de nutrientes es la ingesta de glucosa, la cual es transportada a través de la membrana plasmática por el transportador Glut-1. Durante la glicólisis, la hexocinasa fosforila la glucosa y genera glucosa-6-fosfato (G6P), la cual puede seguir por la vía glicolítica generando NADH, ATP y piruvato, o alternativamente puede ser desviada hacia la vía de las pentosas fosfato (PPP), la cual juega un papel importante en la síntesis de ácidos nucleicos, así como en la generación de NADPH para la síntesis de lípidos y en el mantenimiento de la homeostasis del estado redox intracelular. En presencia de oxígeno, el piruvato generalmente entra a la mitocondria y se oxida completamente para producir ATP. Cuando el oxígeno es limitado, el piruvato se convierte en lactato por acción de la lactato deshidrogenasa (LDH) y la glicólisis se convierte en la principal fuente de producción de ATP [23] (Fig. 4).

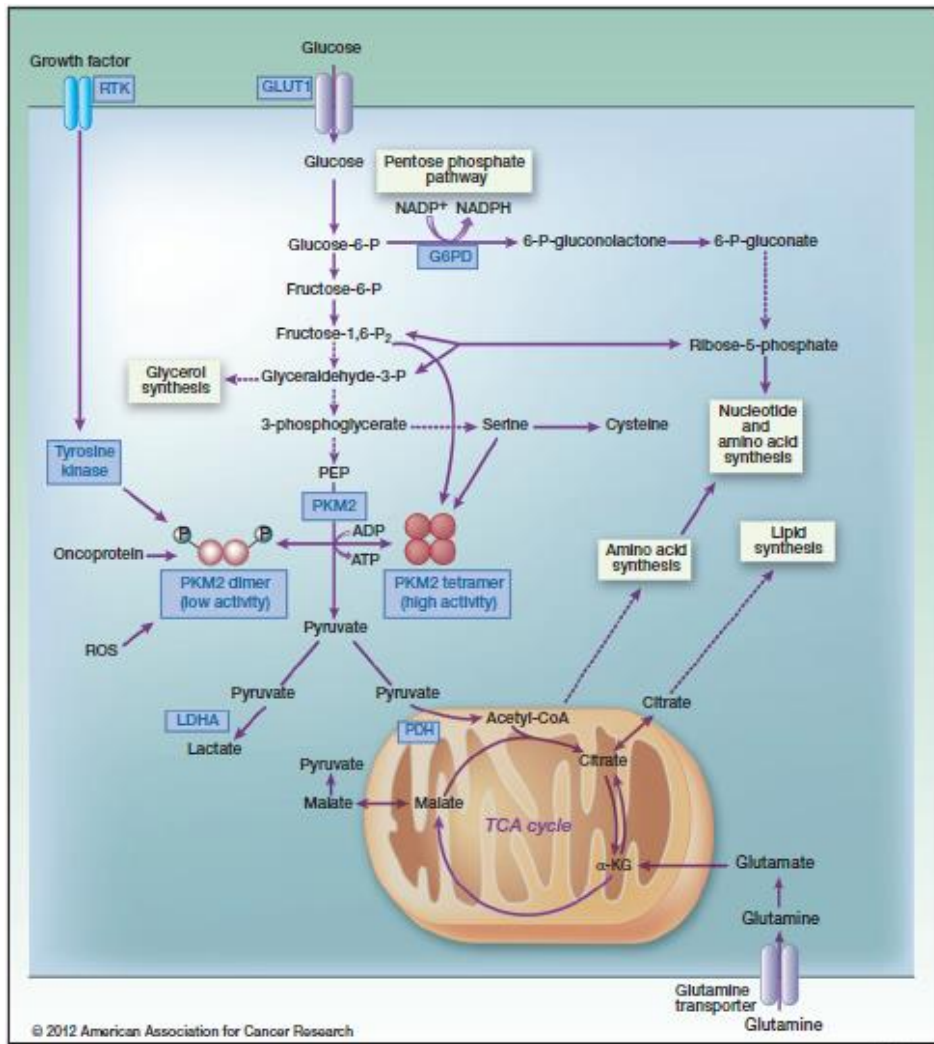


Fig. 4. Metabolismo de glucosa en linfocitos T.

Una vez internalizada la glucosa, ésta puede seguir por diferentes rutas metabólicas: a través de la vía glicolítica se genera piruvato, el cual puede convertirse en lactato o continuar su oxidación en el ciclo de Krebs; alternatively, la glucosa puede desviarse hacia vías colaterales para la síntesis de nucleótidos, lípidos y aminoácidos. Tomado de [24].

1.2.1 Flexibilidad en el metabolismo de los linfocitos T

Las demandas energéticas cambian de acuerdo a las necesidades particulares de cada etapa de la vida de un linfocito T. En el estado de reposo, los linfocitos utilizan preferentemente procesos que llevan a la generación de ATP, mientras que los linfocitos efectores requieren mayor flujo metabólico a través de vías que promueven el crecimiento (Fig. 5). De hecho, las diferentes subpoblaciones de linfocitos T tienen diferentes requerimientos metabólicos y biosintéticos. Las vías que controlan el

metabolismo y la función de las células del sistema inmune están estrechamente relacionadas, por lo que el metabolismo celular es actualmente considerado como un regulador maestro de la función y el destino de los linfocitos T.

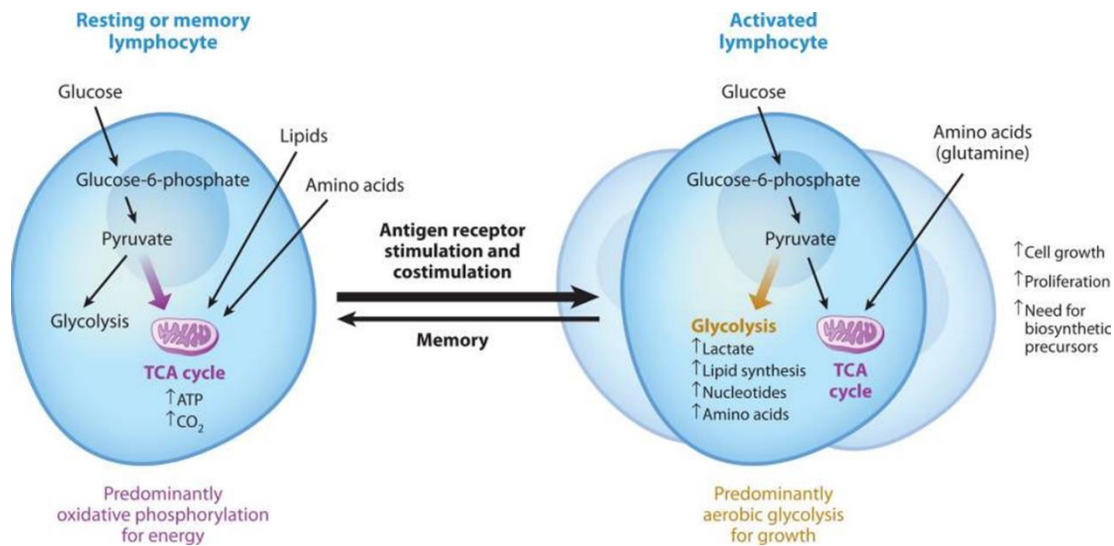


Fig. 5. Los programas metabólicos de los linfocitos T varían de acuerdo a sus necesidades funcionales.

Los linfocitos T en reposo oxidan el piruvato, los lípidos y los aminoácidos para producir ATP. Tras la activación, la oxidación de lípidos disminuye y la glicólisis y la oxidación de glutamina aumentan para poder cumplir con la producción de los precursores biosintéticos necesarios para el crecimiento y la proliferación. Al final de la respuesta inmune, las células que se convertirán en células de memoria reversion a una oxidación de lípidos. Tomado de [25].

Los linfocitos T en reposo y activados tienen requerimientos metabólicos únicos que se mantienen por medio de las señales generadas a través de receptores para citocinas, receptores para el antígeno, y por moléculas co-estimuladoras [15]. El estado quiescente de los linfocitos es altamente regulado y demanda energía. El ATP que se genera durante la fosforilación oxidativa es usado para suprimir activamente la expresión de proteínas del ciclo celular [26] y proviene de la degradación de glucosa, lípidos y aminoácidos [15]. Los linfocitos T en reposo consumen glucosa y otros nutrientes esenciales a una tasa baja [17, 27, 28], suficiente para mantener las funciones de mantenimiento básico. El metabolismo de los linfocitos en reposo está limitado por la disponibilidad de señales tróficas y no por la disponibilidad de nutrientes, por lo tanto, para mantener la tasa metabólica basal, los linfocitos requieren señales extracelulares [18, 29] (Fig. 6). Estas señales son recibidas por receptores para citocinas, el TCR y por moléculas co-estimuladoras [15].

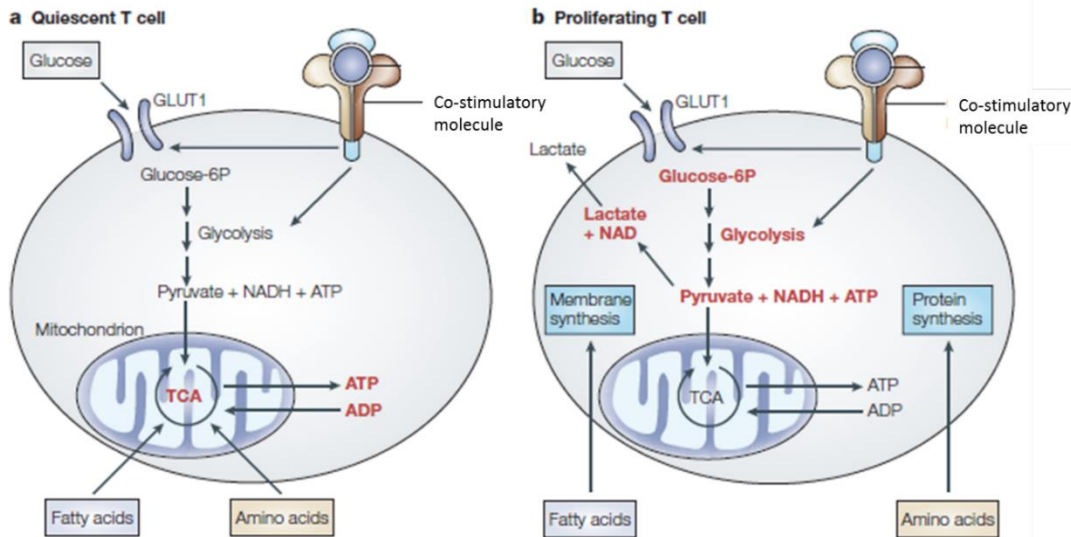


Fig. 6. La regulación del metabolismo de glucosa en células en reposo y activadas.

A, Las células en reposo generan la mayor parte del ATP que requieren a partir de fosforilación oxidativa. Los ácidos grasos y aminoácidos también se degradan para mantener la producción de ATP. B, En células activadas, las señales co-estimuladoras inducen un aumento en la ingesta de glucosa. El metabolismo de glucosa (glicólisis aeróbica, señalada en letras rojas) aumenta para generar ATP. Los ácidos grasos y aminoácidos se dirigen a vías anabólicas para síntesis de membranas y de proteínas, respectivamente. [Adaptada de [15]].

Ante la presencia de un patógeno, los linfocitos cambian de un fenotipo quiescente a uno activo en el transcurso de horas. Las demandas bioenergéticas de los linfocitos aumentan dramáticamente, y aunque los nutrientes como la glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos se mantienen a niveles constantes en la circulación, los linfocitos T carecen de la habilidad de controlar de manera autónoma la ingesta de sustratos metabólicos cruciales para la producción de ATP y síntesis de proteínas y membranas. Los linfocitos deben recibir señales instructivas de su entorno para poder consumir los nutrientes extracelulares. En respuesta a las señales percibidas por el TCR, los receptores para citocinas y las moléculas co-estimuladoras, las células entran al ciclo celular. Durante la proliferación celular, los precursores de lípidos y aminoácidos son desviados hacia la producción de macromoléculas requeridas para el crecimiento. Como resultado, los linfocitos cambian a una dependencia alta en glicólisis, aún en presencia de oxígeno (glicólisis aeróbica), para proveer moléculas de ATP y NADH que son indispensables para

sostener el metabolismo [30]. Así, los linfocitos se vuelven aún más dependientes de su habilidad para ingerir glucosa para mantenerse vivos [15]. El aumento en el metabolismo de glucosa provee sustratos para la vía PPP, produciendo azúcares necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos y NAD(P)H como poder reductor [31], además de contribuir en la síntesis de lípidos [32] (Fig. 6).

Junto con las primeras señales de activación, el microambiente de citocinas promueve la diferenciación de los linfocitos T CD4+ hacia linfocitos T efectores Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, o T_{FH}, o hacia linfocitos T reguladores (Treg), teniendo cada subpoblación funciones distintas en la inmunidad, como se mencionó en la sección 1.1.1. De una manera general, los linfocitos Th1 están involucrados en la inmunidad mediada por células, los linfocitos Th2 y T_{FH} se relacionan con la inmunidad humoral, los linfocitos Th9 con la respuesta contra parásitos extracelulares, los linfocitos Th17 con la inmunidad en mucosas y la inflamación, y los linfocitos Th22 con la inflamación en la piel [11, 33], mientras que los linfocitos Treg limitan la magnitud de la respuesta inmune al suprimir a los linfocitos T efectores [34]. En congruencia con los diferentes roles de los linfocitos T CD4+ en la inmunidad, las necesidades metabólicas de cada subpoblación también difieren. Por un lado, los linfocitos T CD4+ efectores dependen de glucosa para favorecer su rápido crecimiento y proliferación. Sin embargo, los linfocitos Treg dependen principalmente de la oxidación de lípidos para obtener su energía [35, 36]. Asimismo, se ha descrito que los linfocitos T CD8+ también elevan su tasa glicolítica tras la activación, siendo mayor a los niveles observados para los linfocitos T CD4+. Más aún, los linfocitos T CD4+ tienen un metabolismo mitocondrial oxidativo y una capacidad respiratoria mayor que los linfocitos CD8+. Estas diferencias podrían explicar por qué los linfocitos CD8+ crecen y proliferan más rápido que los linfocitos T CD4+ activados [37]. De manera similar a los linfocitos Treg, las células T CD8+ de memoria reversion a un metabolismo oxidativo caracterizado por la oxidación de lípidos [21, 38] (Fig. 7A).

Una vez que un linfocito ha recibido todas las señales necesarias para entrar al ciclo celular (reconocimiento específico del antígeno, señales de moléculas co-receptoras, señales tróficas y señales acerca de la disponibilidad de nutrientes), la tasa de proliferación es tan elevada, que la expansión clonal ha llegado a compararse a la de una clona de células tumorales. De hecho, varios de los oncogenes que regulan el metabolismo de las células tumorales también regulan los cambios metabólicos de los linfocitos T, entre estos destacan Myc, el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF 1 α), el receptor relacionado a estrógeno α (ERR α) y la vía de PI3K/mTOR (Fig. 7B) [39].

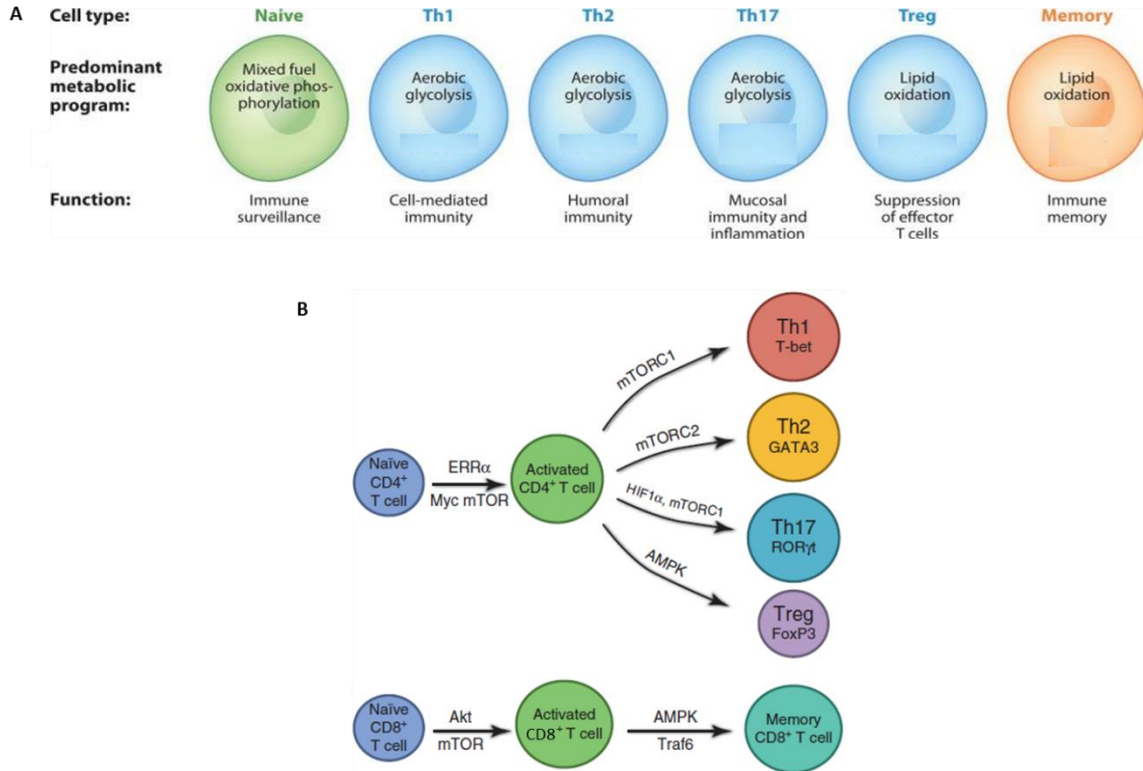


Fig. 7. Programas metabólicos de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T.

A, Los diferentes linajes tienen requerimientos metabólicos determinados para mantener sus funciones. B, Las moléculas involucradas en la regulación de los cambios metabólicos durante la activación y la contracción de la respuesta inmune son específicas para cada linaje. Se ha sugerido que los linfocitos Th9 dependen de la vía glicolítica que se induce en respuesta a las señales de mTOR y HIF1 α [40], mientras que los linfocitos T_{FH} requieren de bajos niveles de glicólisis y metabolismo mitocondrial para mantener sus funciones [41]. El programa metabólico de los linfocitos Th22 se desconoce. Dado que las subpoblaciones Th9, Th22 y T_{FH} se describieron recientemente, existe poca información respecto a sus requerimientos metabólicos. Adaptado de [25].

1.2.2 Las señales co-estimuladoras regulan el metabolismo de los linfocitos T

Las señales de receptores en la superficie celular son necesarias para que las células puedan ingerir y utilizar nutrientes del medio que las rodea [18]. Las señales proporcionadas por las moléculas co-estimuladoras regulan el metabolismo de manera tal que permite a los linfocitos T activados cubrir sus necesidades energéticas y biosintéticas durante la respuesta efectora [17, 19].

CD28 es la molécula co-estimuladora prototipo de linfocitos T cuyas funciones y vías de señalización han sido ampliamente estudiadas. Las señales de CD28 bajan el umbral de activación de los linfocitos T, complementando las señales del TCR, favoreciendo la proliferación celular incluso a dosis bajas de antígeno. El entrecruzamiento de CD28 induce la activación de las cinasas de la familia de Src, Lck o Fyn, en el complejo TCR/CD3, lo que permite la fosforilación de la Y¹⁹¹ del dominio intracelular de CD28, lo que a su vez favorece el reclutamiento de la cinasa de lípidos PI-3K [42-48]. Como consecuencia de la activación de PI-3K, se genera fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), un sitio de reclutamiento para las cinasas PDK1 y Akt, entre otras. La fosforilación de Akt en la T³⁰⁸ por PDK1 es fundamental para la transducción de señales río abajo, pues entre sus blancos se encuentran la cinasa GSK3, mTOR, CREB, Bad, Bcl-x_L, los factores de transcripción FOXO y el inhibidor IκB. De esta forma, las señales de CD28 activan una vía dependiente de PI-3K que puede regular funciones diversas como el ciclo celular, la apoptosis, el metabolismo y la producción de IL-2 [47].

La estimulación a través de CD28 regula el metabolismo de glucosa, lo que permite a las células obtener los requerimientos energéticos asociados con el estado de activación, sugiriendo que el aumento en el metabolismo de los linfocitos T no es una consecuencia de la activación, sino un paso previo que permite a la célula activarse eficientemente [15, 49]. La activación de la vía de PI-3K/Akt/mTOR en respuesta a las señales de CD28 favorece un incremento en la ingesta de glucosa y en la actividad glicolítica, así como un aumento en la expresión del transportador de aminoácidos CD98 y del receptor de transferrina CD71 [16, 17, 50].

La activación de Akt resulta importante porque actúa en varios niveles. Por un lado, la actividad de Akt promueve la transcripción y traducción del transportador de glucosa Glut-1, favorece su translocación a la membrana celular, previene su internalización y favorece la ingesta de glucosa [51-56]. Akt también aumenta la glicólisis al fosforilar y promover la actividad de enzimas que regulan el flujo glicolítico (hexocinasa y fosfofructocinasa) [17, 22, 57, 58]. El aumento en la ingesta de glucosa promueve la fosforilación inhibitoria de GSK3 [59], impacta positivamente la activación de las células al disminuir la exportación del factor de transcripción NFAT del núcleo hacia el citosol [60] y protegiendo a las células de apoptosis al estabilizar a la proteína anti-apoptótica Mcl-1 [59, 61].

Por otra parte, Akt regula al complejo 1 de la cinasa mTOR (mTORC1) al fosforilar, y por lo tanto inhibir, al factor de represión TSC (del inglés Tuberos Sclerosis Complex), formado por las subunidades TSC1 y TSC2. Este complejo funciona como una proteína activadora de GTPasa que inhibe a la proteína de unión a GTP Rheb. Cuando Rheb se encuentra unido a GTP interactúa con mTOR y favorece su activación. Akt también fosforila a PRAS40 para

liberar su inhibición sobre mTORC1. El complejo mTORC1 es un modulador central de la biosíntesis de macromoléculas: regula la síntesis proteica a través de los blancos que fosforila como la cinasa p70-S6 (S6K), un regulador de la función ribosomal, y la proteína de unión al factor de iniciación eucariota 4E (4E-BP), un inhibidor de la traducción [62]. mTORC1 también regula de manera negativa la autofagia, promueve la síntesis de lípidos, la biogénesis mitocondrial, y dirige la expresión de varios transportadores de nutrientes hacia la superficie celular, incluyendo transportadores de aminoácidos, el receptor de lipoproteína de baja densidad y el receptor de transferrina [63, 64]. Por lo tanto, las vías de Akt y mTOR coordinan el transporte de glucosa con la ingesta de otros nutrientes requeridos para el crecimiento celular [65]. Sin embargo, la disminución en el cociente de ATP/ADP puede activar a la cinasa dependiente de AMP (AMPK), la cual inhibe la actividad de mTOR a través de la fosforilación en otros sitios de TSC2 y/o RAPTOR [66]. Finalmente, se ha asociado al complejo 2 de mTOR (mTORC2) con la supervivencia celular y la organización del citoesqueleto. De hecho, Akt es fosforilada en la Ser 473 por mTORC2, lo que implica a ambos complejos de mTOR en un circuito de retroalimentación positiva para favorecer la regulación procesos fisiológicos que promueven el crecimiento celular (Fig. 8).

Al iniciar múltiples cascadas de señalización, las señales provenientes de moléculas co-estimuladoras favorecen la activación de los linfocitos por medio de una regulación precisa de los flujos metabólicos que permitirán al linfocito llevar a cabo su función efectora. Como se mencionó, las vías de señalización que regulan el metabolismo comparten entre sí varias moléculas blanco, lo que da lugar a la existencia de circuitos reguladores que permiten al linfocito modular efectivamente su metabolismo en respuesta a una señal de activación.

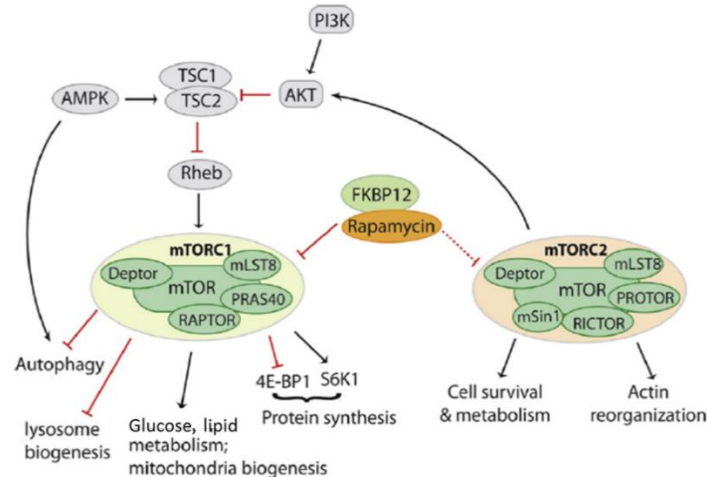


Fig. 8. La vía de PI-3K/Akt/mTOR.

La cinasa mTOR funciona a través de dos complejos. mTORC1 controla actividades como la autofagia, la traducción de proteínas y el metabolismo, mientras que mTORC2 regula la organización del citoesqueleto, la sobrevivencia y el metabolismo. El complejo mTORC1 está formado por cuatro subunidades: la proteína de andamiaje RAPTOR (del inglés Regulatory-Associated protein of mTOR), DEPTOR (del inglés DEP-containing mTOR-interacting protein), MlSt8 (Mammalian Lethal with Sec 13 protein 8) y el sustrato de Akt rico en prolinas (PRAS40). El complejo mTORC2 está formado por RICTOR (Raptor-Independent Comparison of Tor), mSIN1 (Mammalian stress-activated protein kinase), DEPTOR, MlSt8 y PROTOR (proteína observada con RICTOR (PROTOR)). La Rapamicina forma un complejo con FKBP12 para inhibir la actividad de cinasa de mTORC1. La inhibición de mTORC2 requiere dosis altas o exposición prolongada de Rapamicina. Tomado de [67, 68].

1.2.3 El metabolismo define la viabilidad de los linfocitos T

La regulación de la homeostasis de los linfocitos es crítica para el desarrollo y formación de respuestas inmunes productivas. Los números celulares deben mantenerse para permitir que haya suficientes linfocitos para combatir patógenos foráneos, pero al mismo tiempo se debe prevenir la acumulación de linfocitos, pues esto pudiera aumentar el riesgo de desarrollar autoinmunidad o cáncer, además del hecho de que el costo energético de la respuesta inmune se cubre a partir de la energía que se requiere para otros procesos fisiológicos indispensables para la vida del individuo. Una vez eliminada la causa de una respuesta inmune, para restaurar la homeostasis, aproximadamente 90% de las células efectoras mueren por apoptosis, asimismo, los niveles de citocinas inflamatorias también disminuyen y la célula recibe menos señales extrínsecas, haciendo imposible mantener el metabolismo de glucosa, aumentando así su susceptibilidad para sufrir apoptosis [18, 69, 70]. Durante esta etapa, el metabolismo de glucosa disminuye y

se revierte hacia un metabolismo oxidativo para proveer la generación eficiente de ATP a expensas de precursores biosintéticos. Al terminar la activación, los linfocitos T deben regresar a un estado quiescente y favorecer el establecimiento de células de memoria [71-73] que responderán vigorosamente al reencontrarse con su antígeno. La vida prolongada de las células de memoria se debe a la expresión del receptor para IL-7 (IL-7R) y del receptor de quimiocinas CCR7, lo que permite a estas células migrar hacia los sitios de producción de IL-7 en los órganos linfoides, asegurando así la expresión de factores anti-apoptóticos en respuesta a las señales de IL-7. Más aún, la sobrevivencia de las células de memoria se favorece por la expresión del receptor para IL-15 (IL-15R), a través del cual se induce un cambio en el metabolismo que favorece la oxidación de lípidos durante el estado de reposo [74].

El metabolismo de glucosa representa un programa fisiológico crítico que no solo provee energía para sostener la proliferación celular, sino que también modula directamente vías de señalización de muerte celular. Los miembros de la familia de proteínas pro- y anti-apoptóticas Bcl-2 (del inglés B-cell lymphoma 2) están regulados por el metabolismo de glucosa. Por una parte, la pérdida de glucosa induce decremento en los niveles de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 [59, 75], la inducción de la expresión de las proteínas pro-apoptóticas Noxa y Bim [75] y la activación de Bax [76, 77]. Asimismo, la sobreexpresión de Glut-1 y/o hexocinasa 1 en líneas celulares y células hematopoyéticas estabiliza Mcl-1 y atenúa la muerte celular inducida por la privación de factores de crecimiento. El aumento en el metabolismo de glucosa también protege a las células al activar diferentes isoformas (convencionales y novel) de la cinasa PKC y promover así la inhibición de GSK-3, el cual en su estado activo promueve la degradación de Mcl-1 [59] (Fig. 9).

Estos datos confirman la importancia de la regulación del metabolismo de glucosa, pues además de favorecer el aumento de precursores y vías anabólicas que le permiten al linfocito contender con el gasto energético de una respuesta efectora, modula la contracción de la respuesta inmune, donde sólo un número determinado de células debe sobrevivir para favorecer el establecimiento de memoria. Nuevamente, resulta importante el papel de las moléculas co-estimuladoras en la regulación del metabolismo de glucosa, así como en la regulación de las vías de muerte y sobrevivencia para mantener la homeostasis del sistema inmune.

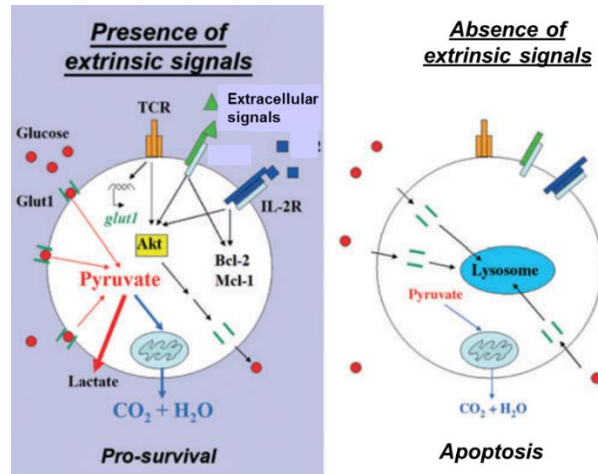


Fig. 9. Los linfocitos T requieren señales extracelulares para cubrir sus demandas metabólicas y sobrevivir.

Las señales extrínsecas promueven la translocación de Glut-1 a la membrana por medio de la activación de la vía de Akt, favorecen la ingesta de glucosa y su metabolismo y estabilizan la expresión de proteínas anti-apoptóticas. Tomado de [38].

1.3 CD43

La participación de moléculas receptoras en el linfocito tales como CD28, receptores para factores de crecimiento, y el propio TCR por ejemplo, es esencial para la regulación del metabolismo y la viabilidad, pues las señales provenientes de éstas regulan la ingesta de nutrientes en linfocitos en reposo, lo que favorece su viabilidad [15, 18]. Como se mencionó anteriormente, los linfocitos en reposo tienen menor demanda por moléculas biosintéticas, requieren una baja, pero no despreciable, tasa de metabolismo energético para mantener funciones de mantenimiento básico como el transporte de iones y la integridad de la membrana [22]. En la ausencia de señales informativas desde el entorno, los linfocitos T en reposo no pueden ingerir nutrientes extracelulares suficientes para mantenerse. La baja bioenergética resultante puede desencadenar la apoptosis y la célula muere por atrofia progresiva y colapso bioenergético [18]. Dada la importancia de las moléculas co-estimuladoras en la modulación del metabolismo de los linfocitos, resulta importante comprender el papel de estos receptores en la regulación de la supervivencia.

Como se mencionó anteriormente, CD28 es la molécula co-estimuladora prototipo de los linfocitos T, sin embargo, el ratón deficiente de CD28 no tiene un fenotipo particular. El desarrollo de linfocitos T y B es normal y las respuestas *in vivo* a diferentes infecciones sugieren que señales de activación pueden surgir a partir de otras moléculas co-

estimuladoras. En particular, se ha reportado que en ausencia de CD28 la sialomucina CD43 puede suplir las funciones de esta importante molécula co-receptora [78].

El co-receptor CD43 es una de las glicoproteínas más abundantes que se expresa en la membrana de todas las células hematopoyéticas, excepto en eritrocitos y en células B en reposo [79, 80]. Aunque en un principio se le consideró como una molécula exclusiva del linaje hematopoyético, recientemente se ha descrito su expresión en cerebro, útero y en células de origen epitelial, estas últimas de importancia en un contexto tumoral. CD43 es considerada como una mucina por tener arreglos secuenciales de residuos de serina y treonina en la estructura primaria de la proteína, la mayoría de los cuales está glicosilado en el grupo hidroxilo de la cadena lateral (O-glicosilación) [81, 82]. CD43 tiene también un alto contenido de ácido siálico en los extremos de las cadenas de O-glicanos, lo que le confiere una carga negativa a la molécula, y se ha sugerido que de esta manera podría regular las interacciones entre células [83], aunque como se expone más adelante, CD43 tiene más de una función (Ver Sección 1.3.5).

1.3.1 El gen

El gen que codifica para CD43 en humanos está localizado en el cromosoma 16 [83, 84]. La región del promotor no contiene cajas TATA o CAAT, pero es rica en citosinas y guaninas, y tiene secuencias cortas repetidas (GGTG). El gen tiene dos sitios principales para el inicio de la transcripción y un intrón de 378 pares de bases que interrumpe la secuencia que determina la región 5' no traducida del mRNA [85]. El gen de CD43 consta de dos exones, pero sólo el segundo codifica las regiones extracelulares, transmembranales e intracelulares de la proteína [86], por lo que no ocurren eventos de splicing alternativo. Se ha comprobado que señales alternativas de poliadenilación generan mRNAs de 1.9 y 4.3 kilobases, los cuales difieren en la longitud de sus regiones 3' no traducidas: una señal de poliadenilación a 2301 pares de bases río abajo del primer sitio de inicio de la transcripción define el extremo 3' del mRNA de 1.9 kilobases, mientras que cinco señales de poliadenilación que se sobrelapan y comienzan 2290 pares de bases río abajo, determinan el extremo 3' del mRNA de 4.3 kilobases.

La secuencia que se encuentra de -53 a -40 pares de bases del lado 5' del sitio de inicio de la transcripción también participa en la expresión de CD43. Esta secuencia 5'GGGTGGGTGGACGG3' representa una secuencia de promotor poco frecuente para otras moléculas expresadas en linfocitos T [86]. La transcripción a partir de esta región del promotor depende del factor de transcripción Sp1, el cual se une a secuencias repetidas GGGTGG de la región 5' [87]. Asimismo, entre los nucleótidos +18 a +39 del promotor del

gen de CD43, existe una secuencia que presenta repeticiones (CCCC) a las cuales se une el factor nuclear PyRo1, favoreciendo la transcripción [88]. En la línea celular K562 (eritroleucemia humana), los niveles de expresión del mRNA de CD43 están regulados por la ribonucleoproteína nuclear heterogénea K (hnRNP-K) y por Pura α , que actúan juntos para mediar la represión del promotor de CD43 durante la activación celular [89]. La metilación del DNA juega un papel importante en la regulación de la expresión génica de CD43, ya que la metilación de la región 5' del DNA reduce la actividad transcripcional *in vitro*, y la expresión tejido-específica del gen de CD43 puede ser regulada por medio de metilación [87].

1.3.2 La proteína

El co-receptor CD43 está formado por tres dominios: un dominio extracelular de 239 aminoácidos que sale de la membrana plasmática aproximadamente 45 nm y se encuentra altamente glicosilado, un dominio transmembranal de 23 aminoácidos, y un dominio citoplasmático de 123 aminoácidos [90, 91]. La porción polipeptídica de CD43 tiene un peso molecular de 38.5 kDa [92]. El núcleo protéico tiene un contenido bajo de lisinas y un alto contenido de prolina e hidrox-aminoácidos (12.5 residuos de serina y 12.5 residuos de treonina por cada 100 aminoácidos) [90]. El dominio transmembranal y el citoplasmático están altamente conservados entre primates, ratón, rata, cerdo, vaca, caballo y perro, lo que sugiere un importante papel regulador de CD43 en las funciones de las células que lo expresan.

El dominio extracelular es extendido y rígido y contiene cinco secuencias de 18 aminoácidos que se repiten (Ile-116 a Ser-205) y se encuentran próximos a la membrana; el significado biológico de estos repetidos se desconoce. La región extracelular de CD43 es rica en residuos de prolina, serina y treonina (39% de los aminoácidos del dominio son serinas y treoninas), la mayoría de los cuales están O-glicosilados. CD43 tiene un alto contenido de carbohidratos, siendo la galactosa y la N-acetilgalactosamina (GalNAc) los más abundantes y presentes en cantidades más o menos equimolares (25 y 22 residuos por cada 100 aminoácidos, respectivamente), además de cantidades mucho menores de N-acetilglucosamina, fucosa y manosa. Una de las cadenas de azúcares presenta una unión N-glicosídica, y el resto, aproximadamente 80, tienen uniones O-glicosídicas, constituyendo en su totalidad más de la mitad del peso molecular de la molécula [81-83, 85, 90].

Los patrones de glicosilación post-traducciona l de CD43 están altamente regulados y resultan en dos isoformas con pesos moleculares característicos que se expresan en diferentes tipos de células:

- Un producto de 115 kDa que está presente en timocitos, linfocitos T CD4+ en reposo y en monocitos.
- Un producto de 130 kDa que se expresa en linfocitos CD8+ en reposo, CD4+ activados, neutrófilos, plaquetas, linfocitos B y macrófagos [79, 93].

Las diferencias en el peso molecular se deben a cambios en la estructura de los carbohidratos. Las estructuras de los O-glicanos son características para cada tipo celular y para cada etapa de diferenciación. Los linfocitos T en reposo expresan “core1 O-glicanos” con secuencias Gal β 1,3GalNAc, mientras que las células T activadas presentan estructuras más complejas que dan lugar a los “core2 O-glicanos” con secuencias Gal β 1,4GalNAc unidas a las ramificaciones de los glicanos core1 mediante un enlace GlcNAc β 1,6GalNAc [94-96] (Fig. 10). Sin embargo, una misma célula puede co-expresar diferentes isoformas de CD43 al mismo tiempo, sugiriendo que las isoformas son funcionalmente distintas.

El cambio entre una y otra forma de glicanos que ocurre tras la activación celular se debe a un aumento en la expresión de la enzima β 1 \rightarrow 6GlcNAc-transferasa, o core 2 GlcNAc transferasa (C2GnT), la cual es responsable de iniciar las ramificaciones en los O-glicanos core 2 favoreciendo el enlace GlcNAc β 1,6GalNAc. La falta de estas enzimas resulta en una disminución de la función de barrera de la mucosa intestinal, acompañado de un aumento en las estructuras core 1[97]. Se ha sugerido que los O-glicanos que se expresan en la superficie celular podrían afectar las interacciones célula-célula regulando la respuesta inmune. Particularmente, los O-glicanos de core 2 constituyen una estructura en la que se forman ligandos para selectinas, lo cual puede contribuir al reclutamiento de linfocitos T CD4+ de memoria hacia los sitios de inflamación [95, 98-102]. De hecho, como se menciona más adelante (Sección 1.3.4), la selectina E ha sido reportada como un ligando de CD43.

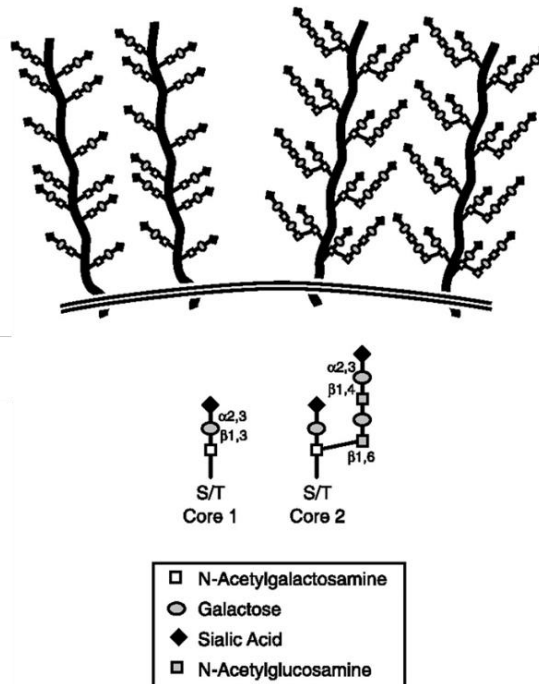


Fig. 10. Estructura de los O-glicanos de CD43.

CD43 presenta aproximadamente 80 uniones O-glicosídicas con estructuras de carbohidratos que pueden ser lineales (core 1) o ramificadas (core 2) [103].

1.3.3 Regulación de la expresión de CD43

El nivel de expresión de CD43 en la superficie celular es controlado en diferentes células por medio de mecanismos como regulación de la expresión génica [87], proteólisis [80, 104, 105], secreción [106] o segregación [107, 108].

El corte proteolítico constituye un mecanismo para regular la expresión de ciertas moléculas en la superficie celular. La proteólisis de CD43 [109-115] se ha reportado en neutrófilos activados con el factor de necrosis tumoral α (TNF α) [112], el ionóforo de calcio A23187 [113], fMLP, PMA [105, 114, 115], así como en linfocitos estimulados con anticuerpos anti-CD43 [105, 114], los cuales podrían mimetizar la acción de los ligandos naturales de CD43. Se ha demostrado que la activación de los neutrófilos induce el corte de CD43 por la elastasa, generando fragmentos solubles de 52 y 40 kDa [104, 116]. Además, enzimas como la γ -secretasa de líneas celulares de carcinoma de colon (COLO 205) y de leucemia T (Jurkat), son responsables de la proteólisis de CD43 en estas células [117]. Aunque se desconoce la función que tiene la porción soluble de CD43, es posible especular que podría regular las interacciones entre el receptor anclado a la membrana y sus ligandos [105]. De hecho, el corte proteolítico de CD43 ocurre *in vivo*. Prueba de ello

son las altas concentraciones de CD43 soluble (Gal pg) presentes en el suero de individuos sanos [118], aunque no se sabe cuáles son las células que contribuyen en esto. Asimismo, dado que el dominio intracelular de CD43 contiene señales de localización nuclear, se ha descrito que el corte del dominio extracelular de CD43 libera las señales de localización nuclear que promueven la translocación del dominio intracelular al núcleo, donde protege a las células de las señales apoptóticas [110, 111].

El reconocimiento del antígeno por el TCR, induce la exclusión de CD43 del sitio de contacto entre la célula T y la APC, y se ha demostrado que la familia de proteínas adaptadoras del citoesqueleto ezrina-radixina-moesina (ERM) participan en estos eventos, a través de un mecanismo dependiente de PKC θ . Al suceder esto, CD43 migra fuera de la sinapsis inmunológica [107, 108, 119], o al urópodo de las células, donde genera señales intracelulares que modulan de manera positiva o negativa a las del TCR [120-122].

Finalmente, la secreción de moléculas de CD43 intracelulares es otro mecanismo de regulación de la expresión de CD43. En respuesta a un estímulo con LPS, la cantidad de CD43 intracelular en las células epiteliales del intestino aumenta, lo que correlaciona con la secreción de CD43 al lumen intestinal, sugiriendo una función de esta molécula como un mecanismo de defensa ante una infección en el epitelio intestinal [106].

1.3.4 Los ligandos

CD43 es una glicoproteína para la cual se han identificado hasta la fecha siete ligandos naturales, cada uno de los cuales tiene a su vez otros ligandos: ICAM-1, galectina-1, el complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC-I), albúmina sérica humana (HSA), E-selectina, sialoadhesina (Siglec-1) y nucleolina [Revisado en [123]. Además, CD43 ha sido reconocido como ligando de varias moléculas de organismos patógenos [124-130], como se menciona en la Sección 1.3.7. Hay muy poca información acerca de las funciones reguladas cuando CD43 interacciona con cada uno de sus ligandos; asimismo, no se sabe si las distintas isoformas de CD43 interaccionan con distintos ligandos, y si de esta manera ejercen diferentes funciones.

Al utilizar anticuerpos monoclonales anti-ICAM-1, se demostró que ICAM-1, un marcador de los procesos inflamatorios, es un ligando para CD43. La función principal de ICAM-1 es la adhesión firme, detención y migración transendotelial de los leucocitos, a través de la interacción con sus ligandos, las integrinas LFA-1 (CD11a/CD18) y CR3 (CD11b/CD18) [131, 132]. Estas últimas participan de manera imprescindible en la regulación de la migración y contactos celulares de los linfocitos. Además, las moléculas CR3 son receptores del fragmento C3b del complemento [133]. Por medio de la interacción con ICAM-1, CD43

regula la adhesión celular [134], aunque se desconoce cómo la interacción de CD43 con ICAM-1 afecta la interacción de ICAM-1 con sus otros ligandos.

También se reportó que galectina-1, una lectina S, es un ligando para la isoforma de 130 kDa de CD43, así como para CD45, CD7 y CD3. La galectina-1 puede regular la apoptosis de linfocitos T durante su desarrollo en el timo, así como después de ser estimulados en la periferia [135-139]. CD43 regula de manera positiva la muerte de linfocitos T inducida por galectina-1, posiblemente concentrando las moléculas de galectina-1 en la superficie celular y haciéndolas accesibles para su unión con CD7, el cual es indispensable para que ocurra la muerte en respuesta a galectina-1 [103]. Sin embargo, en células dendríticas, CD43 influye en otros procesos celulares como la producción de citocinas, la adhesión y el tráfico celular [140-142]. Diferencias en la glicosilación de CD43 entre células dendríticas inmunogénicas y células dendríticas tolerogénicas son responsables de la regulación diferencial de galectina-1 sobre la migración de estas células a través de la matriz extracelular y a través de células endoteliales [143]. En polimorfonucleares, la interacción de CD43 con galectina-1 parece promover quimiotaxis [144].

Por otra parte, se observó que las moléculas del MHC-I de células presentadoras de antígeno de origen mieloide o linfocitos B tienen la capacidad de interactuar con las moléculas de CD43 de células T en reposo. Esta interacción y el entrecruzamiento de CD43 en los linfocitos T incrementan la adhesividad de CD2 por CD58. A su vez, la unión de CD2 con sus ligandos activa a CD43 y aumenta su afinidad por las moléculas del MHC-I. Se ha sugerido que este sistema podría jugar un papel importante en la activación de las células T y en la mediación de las funciones efectoras [145].

Se reportó que la isoforma de CD43 de 130 kDa que se expresa en neutrófilos se une específicamente con albúmina sérica humana (HSA). A través de interacciones específicas con HSA, CD43 podría controlar la extensión de los neutrófilos sobre el sustrato. Asimismo, se ha propuesto que la interacción entre HSA y CD43 podría proteger a la molécula de ser degradada de la superficie de los neutrófilos por la elastasa, probablemente inhibiendo la función de los neutrófilos [146].

Recientemente, se reportó que la isoforma de 130 kDa de CD43, rica en O-glicanos de core 2, es también reconocida por la selectina E presente en la superficie de células endoteliales. Esta molécula regula el rodamiento de los leucocitos que expresan ligandos para la selectina E, como los neutrófilos y los linfocitos T activados, sugiriendo entonces que CD43 podría participar en la migración de los linfocitos T activados hacia los sitios de inflamación [147].

Asimismo, Siglec-1, un receptor de macrófagos que se une a estructuras de carbohidratos que contienen ácido siálico, tanto core 1 como core 2, se une a CD43. Siglec-1 es mediador en la adhesión de células linfoides y mieloides. Considerando la estructura alargada, así como la longitud de ambas moléculas, es posible que éstas funcionen como mediadores de las interacciones intercelulares a larga distancia, promoviendo los contactos físicos iniciales entre macrófagos y linfocitos T [148].

Por último, la nucleolina que se puede expresar en la superficie de monocitos y macrófagos permite el reconocimiento de células que se encuentran en etapas tempranas de apoptosis mediante su unión a las cadenas de ácido siálico y polilactosaminoglicanos de CD43 de las células apoptóticas. Esta unión es inhibida por anticuerpos anti-nucleolina, así como por anticuerpos anti-CD43, lo cual sugiere un papel importante de CD43 en el reconocimiento y la unión de macrófagos con linfocitos T. Aunque la afinidad de la nucleolina por los carbohidratos es baja, se ha sugerido que la agregación de glicoproteínas que ocurre cuando las células inician apoptosis, favorece un aumento en la avidéz de esta unión [149].

En resumen, la multiplicidad de los ligandos, y la gama de funciones que desempeñan, sugiere un rol complejo de CD43 en la regulación de la adhesión y/o la activación celular a través de las interacciones específicas de cada isoforma con sus ligandos.

1.3.5 Las funciones

La abundancia de CD43, su estructura altamente glicosilada, su configuración extendida y el alto grado de conservación de los dominios transmembranal e intracelular que se observa entre especies, sugieren que participa en el establecimiento y la regulación de los contactos entre células, así como en los mecanismos de diferenciación y activación de las células linfoides [150]. Aparentemente, CD43 tiene una doble personalidad, pues ejerce efectos reguladores positivos o negativos, dependiendo del momento en que participe durante la respuesta inmune, de la isoforma y probablemente del ligando con el que interactúe.

Por su estructura alargada y su alto contenido de ácido siálico, se sugirió que CD43 confiere una fuerte carga negativa a la membrana celular y que constituye una barrera física que previene las interacciones célula-célula. A través de un impedimento estérico, CD43 podría interferir con la interacción de otras moléculas de adhesión con sus ligandos. Los resultados obtenidos con células transfectadas con el gen humano de CD43 o células deficientes en la expresión de CD43 (CD43^{-/-}), apoyan esta idea y sugieren que CD43

regula de manera negativa la adhesión de linfocitos T con células blanco o células presentadoras de antígenos [151].

Sin embargo, la teoría de la barrera negativa se contrapone con reportes que demuestran que anticuerpos anti-CD43 inhiben el rodamiento de linfocitos T sobre las células epiteliales de vénulas altas, y tampoco explica por qué numerosos anticuerpos anti-CD43 inducen fenómenos de agregación homotípica, independientes de la participación de las integrinas leucocitarias [152-154]. Si bien el ratón CD43-deficiente no tiene un fenotipo particular en condiciones normales, se ha reportado un defecto en la migración de los leucocitos hacia los órganos linfoides secundarios, en respuesta a un proceso inflamatorio [155-157]. Asimismo, se ha reportado que un anticuerpo monoclonal anti-CD43 retarda significativamente el establecimiento de diabetes e inhibe específicamente el reclutamiento de linfocitos T a los islotes del páncreas, así como a las glándulas salivales y lacrimales, bloqueando los procesos inflamatorios [158]. Estos resultados sugieren que CD43 participa en la migración celular y que anticuerpos anti-CD43 podrían tener usos terapéuticos. Además, los experimentos realizados con líneas de ratones CD43 $-/-$ sugieren también, que la carencia de CD43 se traduce en un retraso en la contracción de la respuesta de los linfocitos CD8+ citotóxicos, lo cual altera la homeostasis de la respuesta inmune y podría favorecer el establecimiento de padecimientos autoinmunes [94].

CD43 se expresa desde etapas muy tempranas durante el desarrollo de las células hematopoyéticas (se expresa junto con CD34 en células madre hematopoyéticas pluripotentes [159, 160]), y como ya se mencionó en la sección anterior, se han reportado funciones apoptóticas y antiapoptóticas para este receptor. Se demostró que el anticuerpo MEM-59 que reconoce a CD43 humano es capaz de inducir apoptosis, lo que sugiere que CD43 podría participar como un regulador negativo en las etapas tempranas de la hematopoyesis [161]. En células Jurkat (leucemia T humana), el ligamiento de CD43 con el anticuerpo monoclonal J393 que reconoce la isoforma de 130 kDa, genera también una señal de apoptosis [162]. Por otra parte, la expresión constitutiva de CD43 en linfocitos B reduce la susceptibilidad de estas células de entrar en arresto en la fase G1 del ciclo celular y retarda los procesos apoptóticos [163-165]. Asimismo, la proliferación descontrolada y el aumento en la supervivencia de los linfocitos B provenientes de linfomas, concuerda con el mal pronóstico de la enfermedad al expresar CD43 en estas células [150]. Además, las señales de CD43 inducen la expresión de los receptores para IFN γ e IL-4 en linfocitos T en células de recién nacido, demostrando la importancia de CD43 en la preparación de las células para su diferenciación a células efectoras [166].

En conjunto, estos resultados sugieren que CD43, y las señales intracelulares que se generan en el momento en que interacciona con su(s) ligando(s), participan en los procesos de homing y migración celular, en la regulación de las interacciones célula-célula, así como en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune, y que la regulación de sus funciones podría ser un blanco terapéutico.

1.3.6 CD43: una molécula accesoria

CD43 genera señales de manera intrínseca, y la función de CD43 como molécula co-estimuladora es aceptada, y para ello requiere de su región intracelular [167, 168]. La región intracelular está formada por 123 aminoácidos, entre los cuales se encuentran once serinas y seis treoninas potencialmente fosforilables [83, 169]. Asimismo, se han identificado una secuencia rica en prolinas [170] que le permite interactuar con proteínas que contienen dominios SH3, así como dos sitios de unión a las proteínas adaptadoras del citoesqueleto ezrina, radixin y moesina (ERM's) [171] que empalman con dos secuencias de localización nuclear [83, 107, 108, 119, 123] (Fig. 11).

En linfocitos T las señales generadas a partir de CD43 han sido estudiadas con cierto detalle (Fig. 12). El ligamiento de CD43 con diferentes anticuerpos monoclonales induce la generación de diacilglicerol y fosfatos de inositol, movilización de Ca^{2+} y la activación de PKC [172, 173]. El entrecruzamiento de CD43 en células T humanas, induce la asociación de CD43 con cinasas de la familia Src [170]. La porción intracelular de CD43 se une al dominio SH3 de Fyn y Lck a través de su región rica en prolinas, y posteriormente las señales mediadas por CD43 resultan en la fosforilación de la cadena ζ del complejo CD3 [174], así como en la formación de complejos macromoleculares que comprenden a las moléculas adaptadoras Shc, Grb2, SLP-76 y el factor intercambiador de guanina Vav [175]. Además, las señales específicas de CD43 promueven la activación de ERK, que participa en diferentes fenómenos: regulación del citoesqueleto de actina [154], activación de un loop de retroalimentación positiva sobre las señales de Lck y regulación de la expresión génica [175-177]. Cuando las células reciben las señales de CD43 antes de recibir las del TCR, PKC θ se activa y fosforila a Cbl, disminuyendo así la actividad de E3 ligasa de Cbl y favoreciendo la activación de las células a través de una mayor fosforilación de Zap-70 y de la cadena ζ [178], disminuyendo así el umbral de activación de los linfocitos. El entrecruzamiento de CD43 induce la actividad de unión a DNA de los factores de transcripción AP-1, NF- κ B y NF-AT [177], así como la expresión génica de IL-2, sin requerir señales adicionales de otras moléculas receptoras. La activación de AP-1 y NF κ B resulta de un pico alto y transitorio de calcio, así como de señales provenientes de la vía de las MAPKs [177, 179]. Como resultado de las señales intracelulares que genera, CD43

estimula la expresión de los genes que codifican proteínas necesarias para la función efectora de las células T y para la expansión clonal, por ejemplo: CD69 y CD40L. Asimismo, se ha demostrado que además de inducir la expresión del gen de IL-2, CD43 induce la expresión de una serie de citocinas y quimiocinas, muchas de las cuales son pro-inflamatorias [176, 179].

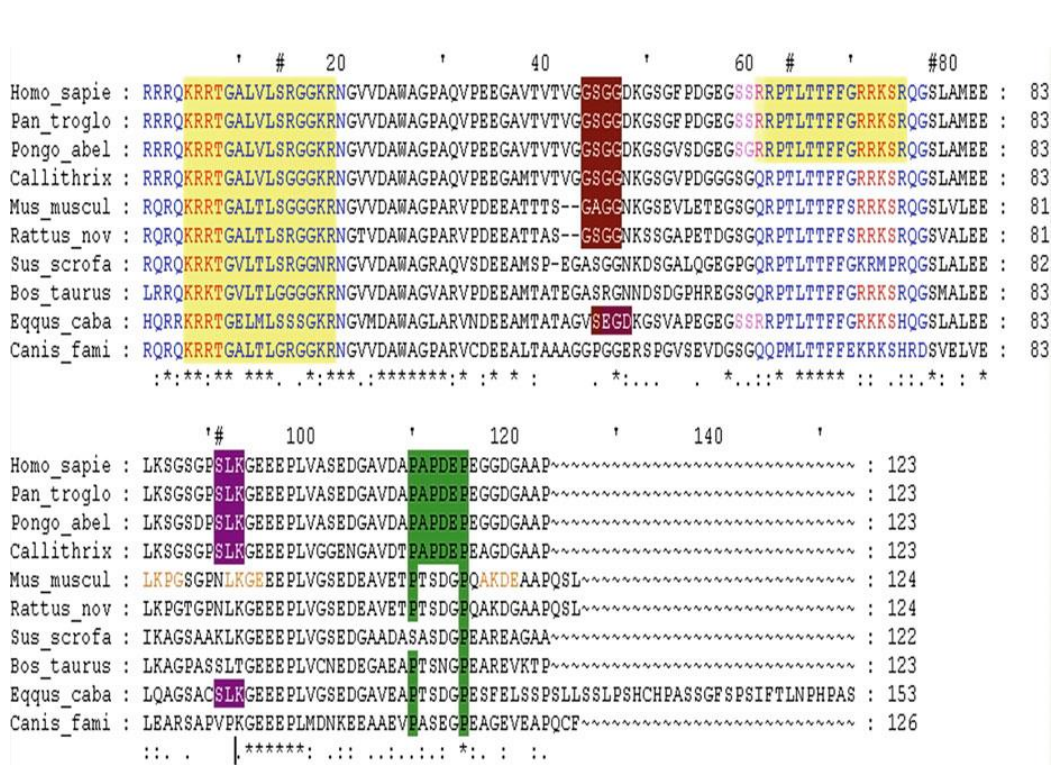


Fig. 11. Alineamiento múltiple de la región intracelular de CD43.

Los dos sitios de unión a proteínas de la familia ERM se muestran en letras azules. Las dos señales de localización nuclear se indican con sombreado amarillo y sobrelapan con los dominios de unión a ERMs. Se muestran sitios potenciales de fosforilación: por cinasas dependientes de cAMP y cGMP (letras rojas), por PKC (letras rosas y sombreado morado), por casein cinasa II (sombreado café). Asimismo, se indican tres sitios potenciales de sumoylación (letras naranjas) y la región rica en prolina (sombreado verde) que permite la unión de CD43 con proteínas que contienen dominios SH3 [123].

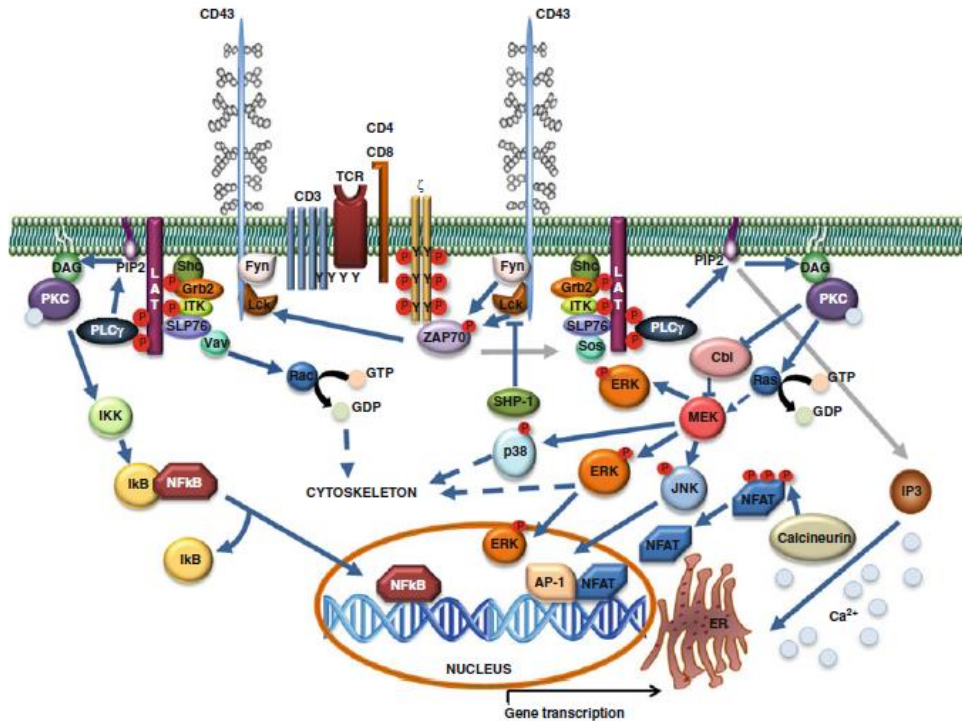


Fig. 12. Vías de señalización que se activan en respuesta a las señales generadas por el entrecruzamiento de CD43 [123].

A través de la activación de múltiples vías de señalización, las señales generadas por el entrecruzamiento de CD43 regulan diferentes procesos biológicos que en conjunto favorecen la respuesta efectora de los linfocitos. Resulta interesante que muchas de las moléculas blanco descritas en las vías de señalización de CD43 pueden ser reguladas también por otras vías, lo que sugiere un papel regulador de CD43 durante la activación de los linfocitos T.

1.3.7 Participación de CD43 en distintas patologías

La importancia funcional de CD43 es puesta en evidencia por su asociación con diversas patologías. En algunos casos, funciona como receptor de reconocimiento de patógenos.

La expresión alterada de CD43 está asociada con el síndrome Wiskott-Aldrich, una inmunodeficiencia ligada al cromosoma X, que involucra una disfunción severa de plaquetas y linfocitos [180]. El síndrome incluye procesos patológicos crónicos que mejoran con la ablación del bazo [181, 182]. Sin embargo, el síndrome está causado por una mutación en el gen que codifica para la proteína WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome

Protein), la cual es una molécula adaptadora que participa activamente en los rearrreglos del citoesqueleto y en la señalización celular [183]. Sin embargo, hasta el momento se desconoce la relación que existe entre CD43 y WASP en el desarrollo de esta enfermedad.

Por otra parte, todos los pacientes con VIH tienen autoanticuerpos anti-CD43 circulantes durante la fase asintomática de la infección. Se demostró que el entrecruzamiento de CD43 estimula la producción del VIH de manera independiente de CD28, y que esto está mediado por los factores de transcripción NF- κ B y NFAT [184], los cuales son activados a través de la vía de señalización de CD43 [177]. Esto sugiere que CD43 podría modular la expresión de VIH-1 en los linfocitos T. Cabría preguntarse si, *in vivo*, los autoanticuerpos anti-CD43 entrecruzan a CD43 y activan así dichas vías de señalización; alternativamente, se podría pensar que los autoanticuerpos anti-CD43 podrían contribuir a la pérdida de células T que se observa en estos pacientes.

CD43 funciona también como un receptor para el virus de la influenza A en polimorfonucleares. Por medio de ensayos de inmunoprecipitación con la hemaglutinina del virus, se comprobó que la unión es dependiente de ácido siálico y que la hemaglutinina reconoce las dos isoformas de CD43, así como a otras moléculas de la superficie celular ricas en ácido siálico. La unión del virus de la influenza A a los polimorfonucleares estimula la expresión de integrinas y reduce la expresión de CD43, L-selectina y el ligando de P-selectina. Estos resultados sugieren que CD43 puede ser un punto de entrada del virus y/o de desactivación de los neutrófilos, aunque los mismos autores sugieren que existen otros sitios de unión para el virus que también pueden mediar la desactivación de los neutrófilos [126, 127, 185].

Por otro lado, se reportó que la porción extracelular de CD43 es indispensable para la unión de los macrófagos con la chaperona Cpn 60.2 de *Mycobacterium tuberculosis* y que las señales de CD43 son necesarias para la producción de TNF- α . CD43 podría funcionar como un co-receptor que facilita la unión y la internalización de las micobacterias a los macrófagos [124, 125]. Además, se han asociado polimorfismos en el gen de CD43 con diferencias en la susceptibilidad, las manifestaciones clínicas y el desarrollo de la tuberculosis [186]. Igualmente, la transialidasa de *Trypanosoma cruzi* se une y co-estimula a los linfocitos T a través de su interacción con CD43 en la superficie de los linfocitos T CD4+, y rescata a las células de la muerte inducida por activación a través de un mecanismo dependiente del entrecruzamiento de CD43 [128]. Asimismo, se ha descrito la interacción de CD43 con la adhesina Hsa de *Streptococcus gordonii*, el agente causal de la endocarditis [129]. Recientemente se reportó que CD43 también es un sustrato de la metaloproteasa StcE de *Escherichia coli* enterohemorrágica [130]. En conjunto, esto sugiere que CD43 puede funcionar como un receptor de reconocimiento de patrones que

al identificar moléculas microbianas, o patrones moleculares asociados a patógenos, puede inducir vías de señalización que modulan la activación de las células y contribuye así a definir la calidad de la respuesta inflamatoria.

Se ha reportado una disminución en la expresión de CD43 en la superficie celular de células polimorfonucleares de líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide [187], así como un aumento en la expresión de esta molécula en los linfocitos T infiltrados en el sinovio de pacientes con osteoartritis [188]. En pacientes con lupus eritematoso sistémico, los anticuerpos anti-CD43 y anti-galectina-1, junto con los niveles altos de galectina-1 soluble correlacionan con el tiempo de evolución de la enfermedad y niveles bajos del complemento [189]. Sin embargo, los mecanismos asociados a la participación de CD43 en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes aún se desconoce.

Si bien por mucho tiempo se consideró que CD43 era una molécula esencialmente hematopoyética, se ha descrito que su expresión es frecuente no sólo en tumores de origen hematopoyético, sino también en tumores de mama, pulmón, colon, vejiga, cérvix y próstata [150]. De hecho, se ha comenzado a estudiar su papel en el desarrollo del tumor. En humanos, la expresión de CD43 en tumores de linfocitos B es considerado como un mal pronóstico [190]. En un linfoma murino de células B, CD43 confiere a las células un aumento en la viabilidad y proliferación al ser privadas de suero durante el cultivo. Interesantemente, el dominio extracelular de CD43 es necesario para el desarrollo de esta función, sugiriendo que la interacción con sus ligandos favorece la supervivencia de los linfocitos B [165]. Por su parte, los linfocitos T provenientes de linfomas que expresan el protooncogen c-Maf, también expresan CD43 junto con niveles altos de ciclina D1 y D2 [191]. Más aún, ante la falta de los supresores de tumores p53 y ARF, la sobreexpresión de CD43 en una línea de carcinoma humano protege a las células de apoptosis mediada por Fas, favoreciendo así la proliferación celular [192]. Asimismo, la translocación al núcleo del dominio intracelular de CD43 le permite interactuar con beta catenina, lo que resulta en un aumento en la expresión de los genes de c-Myc y ciclina D1 [111]. El silenciamiento dirigido de CD43 en células tumorales de pulmón A549 y en células tumorales de cáncer de mama MCF7, disminuyen la migración transendotelial, aumentan la adhesión homotípica, la susceptibilidad para sufrir apoptosis y la vulnerabilidad a la lisis por células NK. El silenciamiento también disminuye el crecimiento de tumores primarios en ratones desnudos [193, 194]. Finalmente, se ha demostrado que niveles altos de ácido siálico en las moléculas de CD43 de células de leucemia protegen a las células de la lisis mediada por linfocitos T citotóxicos [195]. En conjunto, estos datos demuestran la participación de CD43 en la regulación de la adhesión, movilidad y el control del ciclo celular, favoreciendo así la transformación y la invasividad de las células tumorales.

Estos ejemplos, además de poner en evidencia la participación de CD43 en diversas enfermedades, recalcan cuán importante es entender las funciones que desempeña esta molécula en la regulación de la respuesta inmune. En función de esto, nos hemos propuesto estudiar la participación de la molécula co-estimuladora CD43 en la respuesta de los linfocitos T.

II. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

La activación de un linfocito T depende de las señales que éste recibe a través del TCR y de las moléculas accesorias. Debido a que las señales de CD43 tienen la capacidad de regular múltiples funciones en la célula, nos hemos propuesto evaluar la participación de CD43 en la activación de los linfocitos, teniendo como hipótesis:

Las señales generadas por CD43 promueven la supervivencia de los linfocitos T por medio de la regulación de vías de señalización que modulan el metabolismo celular.

III. OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Identificar la participación de CD43 en la regulación del metabolismo y la viabilidad de los linfocitos T.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar mediante un análisis proteómico los procesos biológicos regulados por las señales co-estimuladoras de CD43.
2. Validar los resultados del análisis proteómico por medio de ensayos funcionales para verificar la actividad enzimática de las proteínas identificadas.
3. Identificar las moléculas que participan en la vía de señalización que favorecen la supervivencia de los linfocitos T.
4. Evaluar la importancia del dominio intracelular de CD43 en ensayos funcionales para medir la supervivencia.
5. Evaluar las vías de señalización que se activan en respuesta al tratamiento con albúmina sérica humana como ligando de CD43, así como su efecto en la viabilidad de los linfocitos T.

IV. RESULTADOS PUBLICADOS

An alternative mode of CD43 signal transduction activates pro-survival pathways of T lymphocytes

Maria Elena Bravo-Adame,^{1,2}
Rosario Vera-Estrella,³ Bronwyn J.
Barkla,⁴ Cecilia Martínez-
Campos,^{1,2,†} Angel Flores-Alcantar,¹
Jose Pablo Ocelotl-Oviedo,¹
Gustavo Pedraza-Alva¹ and
Yvonne Rosenstein¹

¹Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, ²Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, ³Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México, and ⁴Southern Cross Plant Science, Southern Cross University, Lismore, NSW, Australia

doi:10.1111/imm.12670

Received 29 October 2015; revised 20 August 2016; accepted 31 August 2016.

[†]Present address: Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad 655, Cuernavaca, Morelos 62100, México. Correspondence: Dr Yvonne Rosenstein, Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apo Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, México. Email: yvonne@ibt.unam.mx Senior author: Yvonne Rosenstein

Introduction

The outcome of T-cell responses is determined by the sum of positive and negative signalling events. Lymphocyte activation is considered to follow a two-signal model where both the antigen and co-stimulatory signals are required to induce full T-cell activation. Stimulation

Summary

CD43 is one of the most abundant co-stimulatory molecules on a T-cell surface; it transduces activation signals through its cytoplasmic domain, contributing to modulation of the outcome of T-cell responses. The aim of this study was to uncover new signalling pathways regulated by this sialomucin. Analysis of changes in protein abundance allowed us to identify pyruvate kinase isozyme M2 (PKM2), an enzyme of the glycolytic pathway, as an element potentially participating in the signalling cascade resulting from the engagement of CD43 and the T-cell receptor (TCR). We found that the glycolytic activity of this enzyme was not significantly increased in response to TCR+CD43 co-stimulation, but that PKM2 was tyrosine phosphorylated, suggesting that it was performing moonlight functions. We report that phosphorylation of both Y¹⁰⁵ of PKM2 and of Y⁷⁰⁵ of signal transducer and activator of transcription 3 was induced in response to TCR+CD43 co-stimulation, resulting in activation of the mitogen-activated protein kinase kinase 5/extracellular signal-regulated kinase 5 (MEK5/ERK5) pathway. ERK5 and the cAMP response element binding protein (CREB) were activated, and c-Myc and nuclear factor- κ B (p65) nuclear localization, as well as Bad phosphorylation, were augmented. Consistent with this, expression of human CD43 in a murine T-cell hybridoma favoured cell survival. Altogether, our data highlight novel signalling pathways for the CD43 molecule in T lymphocytes, and underscore a role for CD43 in promoting cell survival through non-glycolytic functions of metabolic enzymes.

Keywords: CD43; cAMP response element binding protein signalling; extracellular signal-regulated kinase 5; pyruvate kinase isoform M2; T-cell survival.

through the T-cell receptor (TCR) defines the specificity to a particular antigen; however, this alone does not fully initiate cell activation responses such as proliferation and cytokine release. Instead, stimulation through the TCR without additional signals provided by co-stimulatory molecules leads to an unresponsive state, where negative feedback signalling loops are induced. When they

Abbreviations: CREB, cAMP response element binding protein; ERK, extracellular signal-regulated kinase; MEK5, mitogen-activated protein kinase kinase 5; NF- κ B, nuclear factor- κ B; PEP, phosphoenolpyruvate; PK, pyruvate kinase; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PKM2, pyruvate kinase isoform M2; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; TCR, T-cell receptor

encounter their cognate ligands on antigen-presenting cells, co-stimulatory molecules initiate diverse signalling pathways that, once integrated, modulate TCR signalling, shaping the activation status of a cell.^{1,2} Along with this complex decision-making process, activated T cells have unique metabolic demands differentially regulated by signals generated through cytokine, antigen and co-stimulatory receptors.³ As activation induces cell growth, proliferation and differentiation, the metabolic requirements of T cells augment considerably. To fulfil these requirements, signals provided by co-stimulatory receptors such as CD28 have been shown to lead to higher glucose uptake and glycolytic activity, as well as to the up-regulation of molecules involved in nutrient uptake,^{4,5} underscoring an important role for co-stimulatory molecules in coordinating T-cell activation and cell metabolism.⁴

CD43 is one of the most abundant molecules on the T-cell surface.^{6–10} The expression of wild-type human CD43, but not that of a mutant form that lacks the intracellular domain, has been shown to enhance the antigen-specific response of a murine T-cell hybridoma specific for HLA-DR antigens.⁹ The phosphorylation of S⁷⁶ of the cytoplasmic domain of CD43 is necessary for T-cell trafficking,¹¹ further demonstrating that CD43 requires its highly conserved cytoplasmic tail to perform its co-receptor molecule functions. Moreover, data from CD43 knockout mice suggest that it participates in naive T-cell migration to inflammatory sites.^{12,13}

A role for this molecule in the regulation of cell number and homeostasis has also been suggested.^{14–16} CD43 has been reported to control cell cycle entry and cell migration in lymphoid cells as well as in lymphoid and non-lymphoid tumours.^{17–20} In T lymphocytes, CD43 ligation results in the association of Src family kinases to the proline-rich region of its cytoplasmic domain,²¹ leading to CD3 ζ -chain phosphorylation²² and to the formation of macromolecular complexes that comprise Shc, Grb2, SLP-76 and Vav.²³ CD43 signals also promote extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) activation, leading to actin cytoskeleton reorganization²⁴ and to the activation of a positive feedback loop on Lck signalling²⁵ triggered by the inhibition of SHP-1 recruitment.²⁶ Cross-linking CD43 also induces diacylglycerol and inositol phosphate generation, along with calcium mobilization and protein kinase C (PKC) activation.^{11,27,28} Collectively, CD43-mediated signals result in activation of activator protein-1 (AP-1), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and nuclear factor of activated T cells (NFAT),^{28–30} coordinating the expression of multiple cytokine genes.^{25,30}

Searching for new signalling pathways and novel functions regulated by CD43, we performed a quantitative proteomic analysis to detect changes in protein abundance patterns upon co-stimulation of normal human CD4⁺ T lymphocytes through the TCR+CD43.

Interestingly, differences in the expression profile of pyruvate kinase (PK) were detected; yet, PK glycolytic activity was not significantly augmented in response to TCR+CD43 co-stimulatory signals. In contrast, we found that CD43 signals favoured the protein kinase function of pyruvate kinase isoform M2 (PKM2). Two isoforms of PKM2 have been described: a tetramer that is an active glycolytic enzyme, catalysing the conversion of phosphoenolpyruvate (PEP) to pyruvate by transferring a phosphate from PEP to ADP, and a dimer that functions both as protein kinase and as a transcriptional co-activator upon post-translational modification.³¹ Particularly, phosphorylation of Y¹⁰⁵ of the PKM2 isoform triggers its ability to phosphorylate signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). In agreement with this, phosphorylation of PKM2 Y¹⁰⁵ and that of STAT3 Y⁷⁰⁵ were augmented in response to TCR+CD43 co-stimulation. Moreover, CD43 signals contributed to the activation of the ERK5 pathway, a STAT3-regulated pathway,^{32,33} as shown by increased phosphorylation of the ERK5 downstream targets cAMP response element binding protein (CREB) and Bad, the up-regulation of c-Myc and cyclin D1 expression, and the activation of the NF- κ B pathway. In addition to the ERK5 pathway, activation of the protein kinase A (PKA) /adenylate cyclase (AC) pathway led to CREB activation following TCR+CD43 engagement. Overall, our results identified a new signalling pathway for CD43 through the regulation of alternative functions of PKM2, favouring cell survival following activation.

Materials and methods

Antibodies and reagents

Ficoll (Lymphoprep) for blood mononuclear cell isolation was obtained from Axis-Shield PoC AS (Alere Technologies AS, Oslo, Norway). The Human Pan T Cell Isolation Kit was from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). The goat anti-mouse IgG magnetic particles used for T-cell purification were from Polysciences, Inc. (Warminster, PA). RPMI (HyClone GE Healthcare Life Sciences, Logan, UT) or Advanced RPMI (A-RPMI) (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) medium were supplemented with the indicated amount of fetal bovine serum (Gibco/Life Technologies), 50 U/ml penicillin (Sigma, St Louis, MO, USA), 50 μ g/ml streptomycin (Sigma), 2 mM glutamine (Gibco/Life Technologies) and 50 μ M β -mercaptoethanol (Sigma) (A-RPMI). Anti-human CD3 (OKT3), anti-mouse CD3 (F23.1), anti-human CD8 (OKT8) and anti-c-Myc (9-E10) antibodies were home purified. Anti-CD43 (L10) was home purified or from Caltag (Burlingame, CA, MK) and anti-CD28 (CD28-2) was from Biolegend (San Diego, CA, USA). Anti-pERK1/2, anti-pERK5 (T²¹⁸/Y²²⁰), anti-p-Akt1, anti-Sp1, anti-cyclin D1, anti-p65, anti-NF- κ B, and

anti-ERK2 primary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-pSTAT3 (Y⁷⁰⁵), anti-pCREB (S¹³³), anti-pPKM2 (Y¹⁰⁵), anti-PKM2, anti-pBad (S¹¹²), and anti-phospho (Ser/Thr) PKA substrates antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), anti-tubulin antibody was from GeneTex, and anti-histone 3 antibody was from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). The anti-rabbit biotinylated antibody was purchased from SouthernBiotech (Birmingham, AL, USA) and the phycoerythrin-labelled streptavidin was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). The horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology. The Cell Proliferation Dye eFluor 670 was from eBioscience (San Diego, CA, USA). The kinase inhibitor XMD8-92 was from Santa Cruz Biotechnology, and the inhibitors PD98059, H89, Gö6976 and LY294004 were obtained from Calbiochem (Spring Valley, CA, USA). The Src family kinases inhibitor PP2 was from Cayman Laboratories (Ann Arbor, MI, USA).

Cells

Human T cells were isolated from the peripheral blood of healthy donors. Leucocyte concentrates were provided by the 'Banco de Sangre del Hospital Regional del IMSS' and the 'Centro Regional para la Transfusión Sanguínea' in Cuernavaca, Morelos, Mexico. Institutional committees approved the acquisition and isolation of human peripheral blood leucocytes. Peripheral blood mononuclear cells were first isolated by Ficoll gradient centrifugation. T cells were then purified with a Human Pan T-Cell Isolation Kit, as instructed by the manufacturer. Finally, CD4⁺ T cells were enriched by negative selection by incubating the cells with anti-CD8 antibody (OKT8), followed by incubation with goat anti-mouse IgG-bound magnetic particles. The purity of CD4⁺ T cells was > 90%, as determined by FACS staining. Before stimulation, cells were arrested overnight in RPMI-1640 medium supplemented with 2% fetal bovine serum. Jurkat and the Lck-deficient Jurkat cells (JCAM-1),³⁴ (see Supplementary material, Fig. S1) were cultured in A-RPMI medium supplemented with 5% fetal bovine serum (5K), and arrested in serum-free RPMI-1640 for 36 hr before stimulation. Stable transfectants of the murine T-cell hybridoma BY155.16 expressing wild-type human CD43 (CD43 WT), a mutant lacking the intracellular domain of CD43 (CD43 Δ IC),⁹ or human CD4,³⁵ and control cells (pFneo)⁹ were cultured in A-RPMI 5K.

Cell activation

CD4⁺ T lymphocytes (15×10^6), Jurkat, or JCAM-1 cells (5×10^6) were stimulated in 1 ml of serum-free RPMI-1640 with 2 μ g/ml each, of anti-CD3 (OKT3), and/or

anti-CD43 (L10), or 1 μ g/ml of anti-CD28 (CD28.2) antibodies for 3 min at room temperature, following which primary antibodies were cross-linked with isotype-specific secondary antibodies (anti-IgG1 for L10 and CD28, and anti-IgG2a for OKT3), and incubated at 37°, 5% CO₂ for the indicated times. At the end of stimulation, cells were spun down at 400 g to remove excess antibodies and pellets were stored at -70° for further analysis. When indicated, before stimulation, cells were pre-incubated for 30 min with the following inhibitors: MEK inhibitor PD98059 (8.3 μ M), ERK5 inhibitor XMD8-92 (5 μ M); PKA inhibitor H89 (9 μ M), PKC inhibitor Gö6976 (4 nM), p38 inhibitor SB203580 (0.83 μ M), phosphoinositide 3-kinase (PI-3K) inhibitor LY294004 (10 or 40 μ M), or Src inhibitor PP2 (10 μ M).

Pyruvate kinase glycolytic activity

T lymphocytes stimulated for 48 hr as described under 'Cell activation', were lysed in 25 mM HEPES pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, with 1 mM PMSF, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM NaF, 200 μ M NaVO₄, 1 μ g/ml leupeptin, 50 μ g/ml antipain, 10 μ g/ml aprotinin, 0.5 mM DTT. Lysates were spun down at 18 000 g for 15 min at 4° and supernatants were stored at -70°. Pyruvate kinase activity was measured on total lysates according to the coupled method.³⁶ Briefly, 50 μ g of cell lysate protein was incubated in a total volume of 1 ml with reaction buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 225 mM KCl, 12 mM MgCl₂, 0.6 mM ADP, 4.3 mM PEP, 0.6 mM NADH, and 4 IU L-Lactate dehydrogenase]. The initial rate of NADH utilization was monitored at 340 nm using a Hewlett Packard 8452A Diode-array spectrophotometer (Hewlett Packard, Palo Alto, CA).

Immunoblot

Pyruvate kinase protein abundance was validated on cells stimulated and lysed as described under 'Pyruvate kinase glycolytic activity'. One hundred microgrammes of protein were desalted/cleaned with the ReadyPrep 2D Cleanup kit (BioRad, Hercules, CA, USA). The protein pellet was resuspended in rehydration buffer [7 M urea, 2 M thiourea, 5% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulphonate hydrate (CHAPS), 2% Bio-Lyte ampholytes 3/10]. Ready Strip IPG strips (7 cm, linear pH 3-10, BioRad) were layered gel side down onto samples, covered with 1 ml of mineral oil, and active rehydration was performed for 16 hr in a protean IEF Cell (BioRad). Isoelectric focusing was performed with a three-step ramping protocol for a total of 30 000 V-hr at 20° and a maximum current setting of 50 mA per strip. Strips were then equilibrated for 15 min in DTT equilibration buffer (6 M urea, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 2%

SDS, 20% glycerol and 2% DTT), followed by a 15 min incubation in iodoacetamide equilibration buffer (6 M urea, 0.375 Tris-HCl, pH 8.8, 2% SDS, 20% glycerol and 2.5% iodoacetamide). Finally, IEF gel strips were loaded onto 10% acrylamide gels for SDS-PAGE, at 50 V for 4 hr at 4°. SDS-PAGE-separated proteins were transferred onto nitrocellulose membranes as previously described.³⁷ Following transfer, membranes were blocked with TBS (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.5) containing 0.02% (w/v) NaN₃ and 5% (w/v) fat-free milk powder for 2 hr at room temperature. Blocked membranes were incubated overnight at 4° with the appropriate primary antibodies, followed by the addition of a 1 : 5000 dilution of secondary antibodies (goat anti-rabbit) conjugated to horseradish peroxidase. Immunodetection was carried out using the chemiluminescent ECL Western blotting analysis system (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA). Mean intensity of the immunodetected protein bands was calculated as a relative calibrated measurement of the total band size and intensity using ECL molecular weight markers as loading control standards (Fermentas/Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Cytosolic and nuclear extracts were prepared as described previously.³⁸ Lysates were resolved by SDS-PAGE and proteins were transferred onto 0.22- μ m nitrocellulose membranes (Whatman/GE Healthcare). Membranes were blocked with 3% BSA in TBS-T buffer (20 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 0.05% Tween-20). Primary antibodies were diluted in 3% BSA and horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies were diluted in 5% low-fat milk in TBS-T buffer. Proteins were visualized with Western Lighting Plus-ECL substrate (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Densitometric analysis was performed with the help of a Molecular Imager Gel DocTMXR+ Imaging System (BioRad) and the IMAGE LAB software (BioRad, Version 5.2.1).

Phosphoflow

CD4⁺ T lymphocytes (3×10^6) were stimulated as described under 'Cell activation' for 3 hr. Paraformaldehyde was immediately added directly to the cells to a final concentration of 1.5%; cells were then vortexed, incubated for 10 min at room temperature, and pelleted by centrifugation at 400 g for 5 min at 4°. The supernatant was decanted and cells, resuspended in the residual volume, were permeabilized by adding 500 μ l of cold 100% methanol and stored overnight at -70°. Cells were then labelled (barcoded, so that the identity of each sample is recognized on the flow cytometer on the basis of fluorescence) with serial dilutions of the cell proliferation dye eFluor 670 (eBioscience) and pooled together before antibody staining.³⁹ Briefly, cells in methanol were labelled with 20 μ l of serial dilutions of the dye eFluor 670 (1,

0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, or 0.03125 μ M), vortexed and further diluted with 500 μ l of ice-cold PBS. Following a 10 min incubation at 37° in the dark, excess dye was washed out by adding 3 ml of staining medium twice (PBS, 0.01% NaN₃, 2% fetal bovine serum) and centrifuging for 5 min at 400 g at 4° each time. Barcoded samples were resuspended in 250 μ l of staining media and pooled by transferring 200 μ l from each tube into an empty FACS tube, and washed once more with staining media before the addition of anti-pCREB and secondary biotinylated anti-rabbit antibodies. Pooled cells were incubated with primary and secondary antibodies for 1 hr; excess antibody was removed and phycoerythrin-labelled streptavidin was added and incubated for 30 min. Finally, cells were washed and resuspended in 300 μ l of staining media for analysis on a FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) with the FACSDIVA software (Becton Dickinson). Data were analysed using FLOWJO software.⁴⁰

Cell viability assays

T-cell BY155.16 hybridoma cells (10^5) expressing CD43 WT, CD43 Δ IC or CD4, and control cells (pFneo) were stimulated with PMA (50 ng/ml)/ ionomycin (1 μ g/ml) for 48 hr at 37°, 5% CO₂, in 48-well plates in a final volume of 1 ml; alternatively, cells were stimulated with 4 μ g/ml of plate-bound anti-TCR (F23.1). At the end of the incubation period, propidium iodide (400 ng/ml) was added to the cells for 10 min at room temperature, in the dark, before analysis on a FACSCanto II flow cytometer, looking for changes in forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) as hallmarks of cell death. Propidium-iodide-negative cells were quantified as live cells. Data were analysed using FLOWJO software.⁴⁰

Statistical analysis

Data shown in the graphs represent the mean \pm SD. Data were analysed by a paired *t*-test and Tukey's method with PRISM software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA), considered significant at $P \leq 0.05$.

Results

CD43 co-stimulation does not enhance pyruvate kinase glycolytic activity

Cellular signalling efficacy ultimately depends on the integration of internal metabolic cues. Particularly, T-cell activation calls for higher levels of biosynthetic precursors and energy for effector functions. Pyruvate kinase catalyses the conversion of PEP to pyruvate by transferring a phosphate group from PEP to ADP, releasing one ATP molecule. As a quantitative proteomic analysis revealed

Table 1. Pyruvate kinase activity

	Average	SD	<i>P</i> value
Unstimulated	1	0	
TCR+CD43	1.701	0.423	0.125
TCR+CD28	1.877	0.183	0.125

CD4⁺ T lymphocytes (1.5×10^7) were stimulated for 48 hr through the T-cell receptor (TCR)+CD43, or TCR+CD28, to evaluate pyruvate kinase glycolytic activity in cell lysates. Enzyme activity was measured using the coupled method, as described in 'Materials and methods'. The data shown represent four independent experiments. Numbers represent fold change in absorbance values.

that co-stimulation through TCR+CD43 resulted in regulation of pyruvate kinase protein levels (unpublished results), we first assessed whether the classical function of PK was activated in response to CD43. Under our experimental conditions, TCR+CD43 as well as TCR+CD28 stimulated CD4⁺ T lymphocytes exhibited a trend to up-regulate PK activity (Table 1), suggesting that TCR+CD43 co-stimulation does not drive the cells into a glycolytic pathway, but rather that PK performed alternative signalling functions.

CD43 co-stimulatory signals favour PKM2 tyrosine phosphorylation and activate moonlight functions of PK

Since the glycolytic activity of PK was not significantly augmented in response to TCR+CD43 co-stimulation, and given that our quantitative proteomic analysis revealed that co-stimulation through the TCR+CD43 resulted in regulation of PK protein abundance in two different protein spots as determined by differential in gel electrophoresis (unpublished results), we evaluated the possibility that potential post-translational modifications of this enzyme were at the source of these differences. Notably, PKM2 Y¹⁰⁵ phosphorylation impairs the formation of the tetramer necessary for the glycolytic function of PKM2 and favours that of a dimer with alternative, non-glycolytic, functions.⁴¹ Furthermore, PKM2 is predominant in activated T cells.⁴² Human T lymphocytes were left unstimulated or activated with the anti-CD43 L10 and the anti-CD3 OKT3 monoclonal antibodies. After a 6-hr stimulation period, PKM2 tyrosine phosphorylation was evaluated. We found that TCR+CD43 co-stimulation significantly increased PKM2 Y¹⁰⁵ phosphorylation compared with control cells (Fig. 1a).

Phosphorylated PKM2 has a protein kinase activity, potentially leading to phosphorylation of the transcription factor STAT3 and up-regulation of the MEK5/ERK5 pathway.³² TCR+CD43 co-stimulation significantly increased phosphorylation of STAT3 on Y⁷⁰⁵ (Fig. 1b), as well as that of ERK5 (Fig. 1c). Engaging the TCR+CD28 resulted in

PKM2 Y¹⁰⁵ phosphorylation, and in STAT3 phosphorylation (Fig. 1b), as previously reported.⁴³ Engagement of CD43 or of the TCR alone did not lead to significant PKM2, STAT3 or ERK5 phosphorylation (Fig. 1b,c), suggesting that signals from both receptors cooperate to induce the alternative functions of PKM2. Altogether, these data support that co-stimulating the cells through the TCR+CD43 induces PKM2 tyrosine phosphorylation, favouring the activity of PKM2 protein kinase, as well as STAT3 phosphorylation and activation of the MEK5/ERK5 mitogen-activated protein kinases, two pathways associated with quiescence, cell survival and proliferation.^{44,45}

The moonlighting function of PKM2 induced by TCR+CD43 co-stimulatory signals activates downstream targets of ERK5

To further assess the role of the PKM2/STAT3 pathway in up-regulating MEK5/ERK5 signalling, we evaluated the activation status of downstream targets of ERK5: CREB, Bad, cyclin D1, c-Myc and NF- κ B.⁴⁵ TCR+CD43 co-stimulation of CD4⁺ T lymphocytes, as well as TCR or CD43 independent stimulation, resulted in a modest but consistent phosphorylation of the transcription factor CREB (Fig. 1d). In contrast, the abundance of cyclin D1 and c-Myc significantly increased in cells stimulated with TCR+CD43 or with TCR only, but not in cells with only CD43 stimulation, suggesting that TCR signalling is accountable for c-Myc and cyclin D1 accumulation in the nucleus (Fig. 1e). Although engagement of CD43 alone induced a modest phosphorylation of the pro-apoptotic protein Bad compared with that resulting from TCR ligation, co-stimulating the cells through the TCR+CD43 had a synergistic effect (Fig. 1e), suggesting the activation of anti-apoptotic pathways. As expected,^{43,46,47} TCR+CD28 stimulation induced the phosphorylation of CREB and Bad, as well as increasing abundance of c-Myc and cyclin D1 (Fig. 1d,e).

To determine if the CREB, c-Myc, STAT3, Bad and NF- κ B activation we detected following TCR+CD43 co-stimulation was dependent on ERK5 enzymatic activity, we stimulated CD4⁺ T lymphocytes in the presence of XMD8-92, a specific ERK5 inhibitor.⁴⁸ As CD43-mediated signals induced Bad and CREB phosphorylation (Fig. 1d,e), but STAT3 phosphorylation, c-Myc and NF- κ B activation required signalling through TCR+CD43 (Fig. 1d, e, and see Supplementary material, Fig. S1a), we evaluated the importance of the ERK5 pathway in the activation of the latter proteins in TCR+CD43 co-stimulated cells. As a consequence of ERK5 inhibition, Bad phosphorylation, but not that of CREB, was reduced, and the up-regulation of c-Myc protein levels was partially abolished in TCR+CD43 co-stimulated cells (Fig. 2a), suggesting the participation of additional pathways. Likewise, NF- κ B activation and STAT3

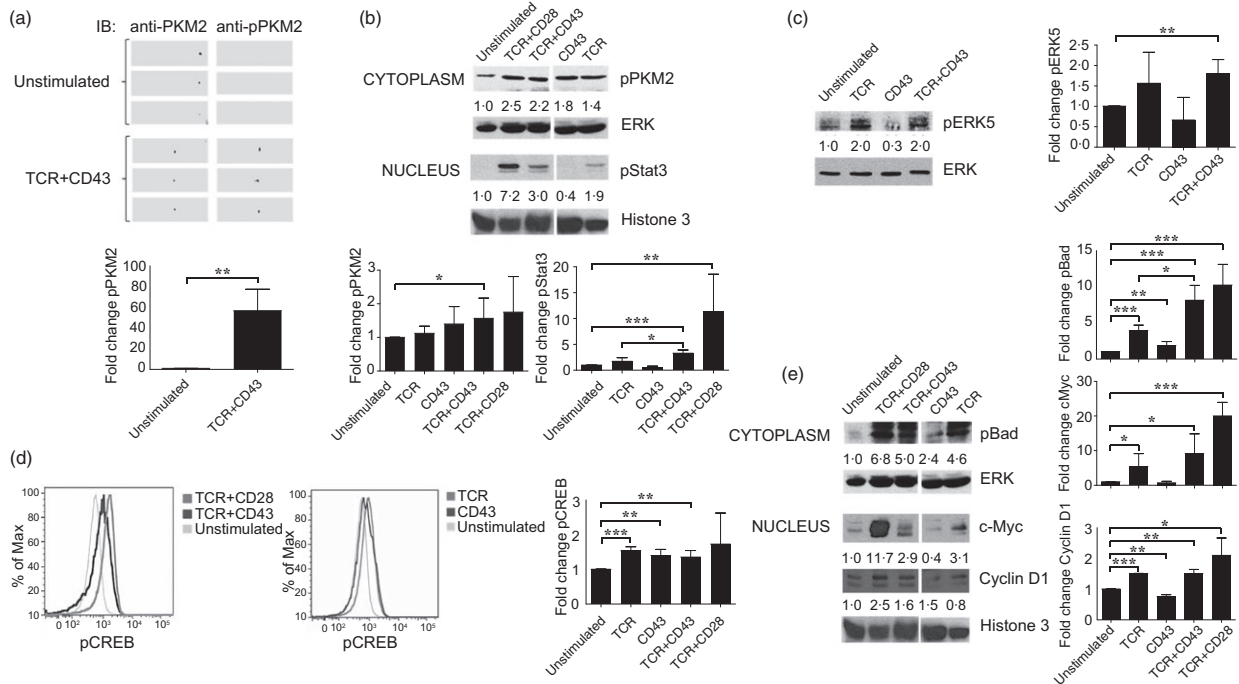


Figure 1. CD43 co-stimulatory signals induce pyruvate kinase isoform M2 (PKM2) moonlight functions. (a) Quantitative proteomic analysis results were validated in cell lysates from CD4⁺ T cells activated for 6 hr as described in the Experimental Procedures. PKM2 and PKM2 Y¹⁰⁵ phosphorylation was assessed by immunoblot of two-dimensional gels with samples from three different donors. (b) CD4⁺ T cells (1.5 × 10⁷) were left unstimulated or stimulated through the T-cell receptor (TCR), CD43, TCR+CD43, or TCR+CD28 for 3 hr and nuclear and cytosolic extracts were prepared. Phosphorylation of PKM2 on Y¹⁰⁵ (pPKM2) and that of signal transducer and activator of transcription (STAT) on Y⁷⁰⁵ was assessed by immunoblot in cytosolic and nuclear extracts. Total extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) and histone 3 levels in the cytoplasm and nuclei, respectively, are shown as loading controls. The data shown are representative of three independent experiments. Numbers represent fold increase values. (c) The levels of pERK5 were evaluated in total cell extracts from unstimulated or TCR, CD43 or TCR+CD43 co-stimulated CD4⁺ T cells for 3 hr. Total tubulin levels are shown as loading control. The data shown are representative of three independent experiments. Numbers represent fold increase values. (d) cAMP response element binding protein (CREB) phosphorylation was assessed by phosphoflow analysis of T cells co-stimulated for 3 hr with TCR+CD43, TCR+CD28, TCR, or CD43 alone and compared with unstimulated cells. The data shown are representative of three independent experiments. Fold change analysis was based on MFI. (e) The activation of downstream targets of the PKM2/STAT3/ERK5 pathway was assessed after 3 hr stimulation in cytoplasmic or nuclear extracts from unstimulated, TCR, CD43, TCR+CD28, or TCR+CD43 co-stimulated CD4⁺ T cells, using specific antibodies for phosphorylated Bad (pBad), cyclin D1 and c-Myc; ERK 2 and histone 3 protein levels are shown as loading control for cytoplasmic and nuclear fractions, respectively. The data shown are representative of three independent experiments. Numbers represent fold increase values. Graphs show fold change in protein phosphorylation or abundance in three donors. *P* values were considered significant if *P* ≤ 0.05 (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001).

phosphorylation were found to be dependent on the ERK5 pathway in response to TCR+CD43 co-stimulation (Fig. 2a). Inhibition of the ERK5 pathway in cells stimulated with TCR only or CD43 only had no impact on Bad or CREB phosphorylation (see Supplementary material, Fig. S1b), further suggesting that co-stimulation through both receptors is necessary for the activation of the ERK5 pathway.

CD43-dependent signals activate Src kinases, particularly Fyn and Lck.^{21,49} Interestingly, PKM2^{50–52} and the MEK5/ERK5 pathway^{53,54} have been described as being targets of Src family kinases. To evaluate the role of Src kinases in the activation of the PKM2/ERK5 pathway, CD4⁺ T lymphocytes were stimulated in the presence of an Src inhibitor

(PP2). We found that the phosphorylation of ERK5 and Bad as a result of TCR+CD43 or TCR+CD28 stimulation was dependent on Src family kinases as both events were abolished in PP2-treated cells (Fig. 2b). Src inhibition in cells stimulated with TCR only or CD43 only did not significantly reduce ERK5 or Bad phosphorylation (see Supplementary material, Fig. S1b). These data suggest that the phosphorylation of ERK5 and Bad resulting from TCR+CD43 co-stimulation is Src-dependent.

Additionally, wild-type and Lck-deficient Jurkat cells (JCAM-1) (see Supplementary material, Fig. S2) were stimulated following the same protocol as T lymphocytes. In wild-type Jurkat cells, enhanced phosphorylation of PKM2, Bad and ERK5 was observed following

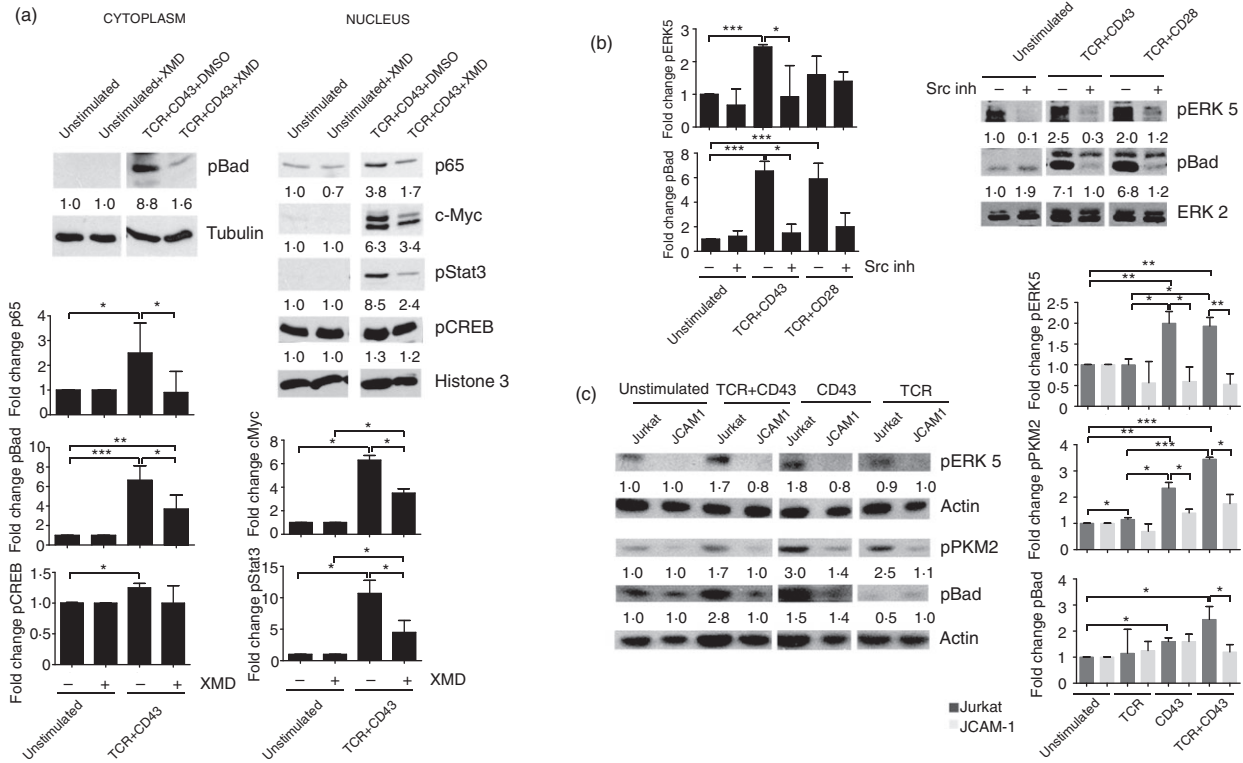


Figure 2. The T-cell receptor (TCR)+CD43-induced pyruvate kinase isoform M2 (PKM2)/ signal transducer and activator of transcription (STAT3)/extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) pathway targets Bad, nuclear factor- κ B (NF- κ B) and c-Myc. (a) Cells were pre-incubated with the ERK5 inhibitor XMD8-92 (5 μ M) 30 min before stimulation for 3 hr with TCR+CD43. Phosphorylation levels of pSTAT3, cAMP response element binding protein (pCREB) and pBad, as well as nuclear c-Myc and p65 levels, were evaluated by immunoblot; total tubulin and histone 3 levels are shown as loading controls for cytoplasmic and nuclear fractions, respectively. The data shown are representative of three independent experiments. Numbers represent fold increase values. (b) CD4⁺ T lymphocytes were pre-incubated with the Src inhibitor PP2 (10 μ M) 30 min before stimulation with TCR+CD43 or TCR+CD28. ERK5 and Bad phosphorylation was evaluated by immunoblot; ERK2 levels are shown as loading control. Numbers represent fold increase values. (c) Jurkat and JCAM-1 cells were stimulated with TCR, CD43, or TCR+CD43, for 3 hr and pPKM2, pBad, and pERK5 phosphorylation levels were evaluated by immunoblot; total actin levels are shown as loading controls. The data shown are representative of three independent experiments. Numbers represent fold increase values. Graphs show fold change in protein phosphorylation or abundance in three donors. *P* values were considered significant if *P* \leq 0.05 (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001).

TCR+CD43 co-stimulation. CD43-dependent signals also induced ERK5, PKM2 and Bad phosphorylation in Jurkat cells, whereas, in contrast to CD4⁺ T lymphocytes, TCR signalling resulted only in a modest increase in PKM2 phosphorylation, but not in that of ERK5 or Bad. Notably, phosphorylation of ERK5 was comparable in Jurkat cells stimulated with CD43 only or TCR+CD43, and PKM2 and Bad phosphorylation was further increased following TCR+CD43 engagement compared with cells stimulated with TCR only or CD43 only, supporting a co-stimulatory role for CD43 in the activation of the PKM2/ERK5 pathway. In JCAM-1 cells, TCR ligation did not induce ERK5, PKM2 or Bad phosphorylation, whereas CD43-mediated signals resulted in modest PKM2 and Bad phosphorylation, and in TCR+CD43-stimulated cells, levels of pPKM2 or pBad were comparable to those of cells activated by CD43 only or TCR only,

but no ERK5 phosphorylation was detected in either (Fig. 2c). These data suggest that in Jurkat cells, the signalling pathway leading to PKM2, ERK5 and Bad phosphorylation induced in response to TCR+CD43 engagement is dependent on Lck.

Altogether, these results suggest that CD43 co-stimulatory signals support the activation of the MEK/ERK5 pathway, that up-regulation of c-Myc and NF- κ B (p65), and phosphorylation of STAT3 and Bad are dependent on ERK5 activation, and that Src family kinases, namely Lck, participate in PKM2 Y¹⁰⁵ phosphorylation in Jurkat cells.

CD43 co-stimulatory signals activate PKA to synergize with the PKM2/STAT3/ERK5 pathway

CREB is a transcription factor that regulates diverse cellular responses, including proliferation, survival and

differentiation.⁵⁵ Since ERK5 inhibition had no effect on TCR+CD43-induced CREB phosphorylation (Fig. 2a), we searched for other signalling pathways responsible for the regulation of this transcription factor. In Jurkat cells, stimulation through the TCR alone or co-stimulation through TCR+CD43 led to CREB phosphorylation (Fig. 3a). Since CD43 signalling alone did not induce CREB phosphorylation in Jurkat cells, and TCR+CD43-induced CREB phosphorylation was significantly higher than that observed for TCR-stimulated Jurkat cells, we evaluated that signalling pathways that could be responsible for CREB phosphorylation in TCR+CD43 co-stimulated cells. We found that in Jurkat cells, CREB phosphorylation is PKA-dependent while MEK 1/2, p38 or PKC inhibition had no effect on the phosphorylation of this transcription factor (Fig. 3b). PKA activation following TCR+CD43 signalling was confirmed by immunoblot using an antibody that recognizes PKA-phosphorylated substrates (see Supplementary material, Fig. S3). As CREB is also a target for Akt,⁵⁶ a kinase that delivers anti-apoptotic signals through the PI-3K-dependent pathway,⁵⁷ and since the PKA inhibitor (H89) also prevents the activation of Akt,⁵⁷ we evaluated whether the PI-3K/Akt pathway was involved in TCR+CD43-mediated CREB activation. TCR+CD43 co-stimulation induced Akt phosphorylation in Jurkat cells, and treatment with the PKA inhibitor H89 prevented the activation of this kinase (see Supplementary material, Fig. S4, left panel). Accordingly, inhibition of PI-3K with LY904002 led to decreased Akt phosphorylation in TCR+CD43 co-stimulated Jurkat cells, but CREB phosphorylation was not affected (see Supplementary material, Fig. S4, right panel). These data

suggest that the phosphorylation of CREB resulting from TCR+CD43 co-stimulation depends on the activation of the PKA pathway, and that this is independent of the PI-3K/Akt pathway.

Expression of wild-type CD43 favours cell survival following cell activation

The expression of CD43 has been shown to convey a survival advantage for CD4⁺ and CD8⁺ splenocytes during apoptosis induction via growth factor withdrawal,⁵⁸ independent of antibody-mediated ligation. Based on our results supporting a role for CD43-mediated signals in activating anti-apoptotic and pro-survival molecules, and in view of the fact that T-cell hybridomas can undergo apoptotic cell death when activated through the T-cell receptor complex,⁵⁹ clones of the By155.16 T-cell hybridoma expressing comparable amounts of the TCR and of human CD43 WT, CD43 ΔIC or CD4 (Fig. 4a) were evaluated for survival in response to PMA/Ionomycin or F23.1 stimulation. Expressing CD43 WT protected the cells from PMA/Ionomycin-induced cell death, resulting in significantly more live cells (79%), compared with pFneo cells (65%) or BY CD4 cells (61%). On the contrary, expressing a CD43 mutant lacking the intracellular domain (CD43 ΔIC) rendered the cells even more sensitive to PMA/Ionomycin-induced cell death with a survival toll of 46% (Fig 4b). CD43 WT transfected BY155.16 cells significantly survived more with plate-bound anti-TCR monoclonal antibody (F23.1) (96%) compared with BY pFneo (80%) or BY CD4 cells (72%), and expressing CD43 ΔIC also resulted in a higher susceptibility to TCR-induced cell death (Fig. 4c).

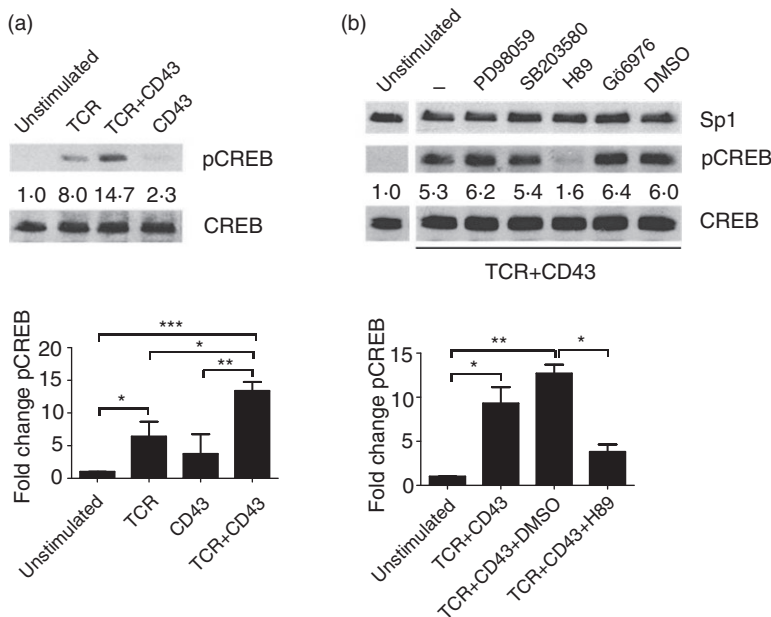


Figure 3. T-cell receptor (TCR)+CD43 signals induce protein kinase A (PKA)-dependent cAMP response element binding protein (CREB) activation. (a) Jurkat cells were stimulated with anti-TCR, and/or anti-CD43 antibodies for 10 min and pCREB and total CREB levels were measured in whole cell lysates by immunoblot. The data shown are representative of three independent experiments. (b) Jurkat cells were left untreated or pre-incubated with enzyme inhibitors for MEK 1/2 (PD98059, 8.3 μM), p38 (SB203580, 0.83 μM), protein kinase A (PKA; H89, 8.3 μM), and protein kinase C (PKC; G66976, 3.3 nM) before TCR+CD43 co-stimulation. pCREB levels were evaluated by immunoblot in whole cell lysates after 10 min of stimulation; CREB and Sp1 levels are shown as loading controls. Numbers represent fold change values. The data shown are representative of two independent experiments. (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001).

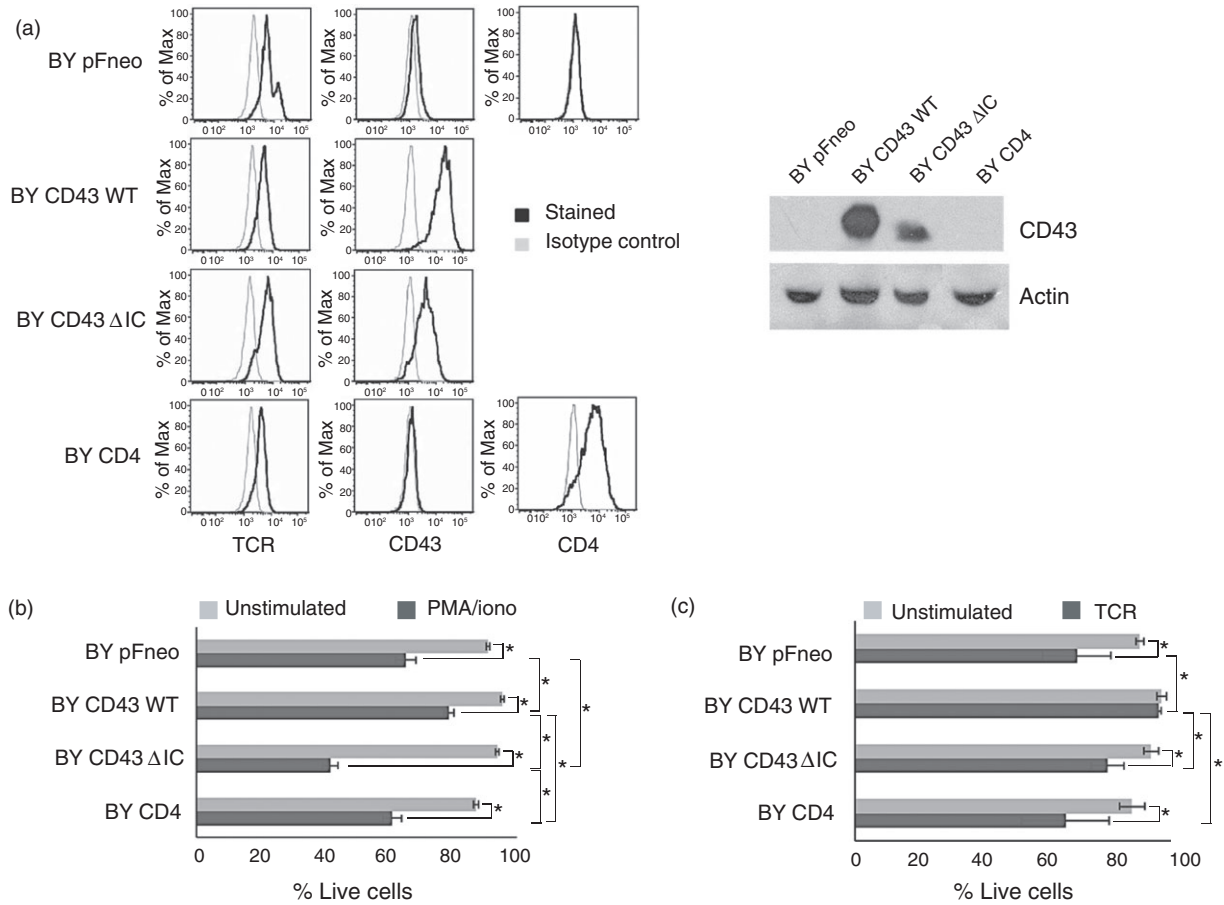


Figure 4. CD43 expression promotes cell survival of activated cells. (a) The murine T-cell hybridoma BY155.16 was transfected with empty vector (pFneo), full-length human CD43 (CD43 WT), a mutant lacking the intracellular domain (CD43 ΔIC), or human CD4. The surface expression of each co-stimulatory molecule was evaluated by FACS analysis (left panel). The molecular weight of the full-length CD43 (CD43 WT) and truncated CD43 (CD43 ΔIC) was determined by immunoblot (right panel) using the L10 anti-CD43 monoclonal antibody. Actin levels are shown as loading control. (b) Cells were left unstimulated (☉) or stimulated with PMA (50 ng/ml)/ionomycin (1 μg/ml) (P/I) for 48 hr, and cell viability was measured by quantification of propidium-iodide-negative cells. The data shown are representative of four independent experiments. (c) Alternatively, cells were left unstimulated (☉) or stimulated with 4 μg/ml plate-bound anti-TCR monoclonal antibody (F23.1) for 48 hr, and cell viability was measured by quantification of propidium iodide-negative cells. The data shown are representative of three independent experiments. P values were considered significant if $P \leq 0.05$, * indicates P values from 0.01 to 0.05.

All unstimulated cells had a viability of > 92% when evaluated after a 48-hr incubation. Consistent with previous data showing that the intracellular domain of CD43 is required for the regulation of cell viability,⁵⁸ these results indicate that CD43 expression protects the cells from apoptotic signals, but also that lacking the CD43 intracellular domain represents a disadvantage for cell survival. Altogether, these results suggest that CD43 participates in cell survival in response to TCR- or PMA-dependent signals, potentially contributing to the regulation of T-cell homeostasis following activation.

Discussion

Similar to CD28 signalling cascades,⁶⁰ CD43 engagement activates multiple signalling pathways, ultimately

regulating cell fate.⁶¹ To further characterize the participation of CD43 in T-cell activation, we carried out a proteomic analysis of normal human peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes co-stimulated with TCR+CD43. The biological processes regulated by the proteins found to be modulated in response to TCR+CD43-mediated signals, pointed at the ‘generation of precursor metabolites and energy’ and ‘regulation of apoptosis’ as the most enriched biological processes (23% and 13%, respectively, unpublished results), prompting us to explore the participation of CD43 in the regulation of glucose metabolism. Particularly, the proteomic data indicated that TCR+CD43 signalling modulated the abundance of PK, which we were able to validate by immunoblot. Out of the four isoforms of PK, PKM2 is expressed in most cells,⁶² including activated T cells.⁶³ Sp1, HIF-1 and c-Myc activate PKM2

transcription; in addition, c-Myc also activates the transcription of *hnRNPA1* and *hnRNPA2* (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein), two splicing factors that promote the alternative splicing that generates PKM2 mRNA.^{64–66} Interestingly, according to our proteomic analysis, the expression level of these factors was also modulated in response to TCR+CD43 signals (unpublished data).

Pyruvate kinase is a rate-limiting enzyme that catalyses the last step of glycolysis, converting PEP to pyruvate by transferring a phosphate group from PEP to ADP, releasing one ATP molecule. Contrary to our expectations, under our experimental conditions, TCR+CD43 co-stimulation did not significantly augment PK glycolytic activity, suggesting rather that CD43 co-stimulatory signals favoured the alternative functions of PK. Accordingly, we found that co-stimulating CD4⁺ human T lymphocytes through TCR+CD43 led to phosphorylation of PKM2 on Y¹⁰⁵, a protein modification that impairs the tetramer formation necessary for PKM2 to promote oxidative metabolism for energy production,⁴¹ and favours the formation of a dimer that leads to the anabolic metabolism of glucose, supporting the biosynthesis of macromolecules necessary for cell proliferation.⁵⁰ Although the accumulation of metabolic intermediates upstream of the glycolytic pathway under our experimental conditions remains to be tested, these data correlate with the fact that CD43 engagement did not lead to increased glycolysis.

In addition, we found that STAT3 Y⁷⁰⁵ was phosphorylated in response to TCR+CD43 co-stimulation, suggesting that the TCR+CD43-mediated activation of PKM2 is responsible for the activation of this transcription factor. This is in line with previous reports showing that phosphorylation allows PKM2 to function as a co-activator for transcription factors such as HIF-1 α , HIF-2 α , β -catenin, STAT3 and Oct-4, which in turn favour the transcription of target genes such as: *SLC2A1* (Glut-1), *LDHA*, *PKD1*, *HK1*, *VEGFA*, *CCND1*, *MYC* and *MEK5*.^{32,67–69} Whether the phosphorylation of STAT3 is directly mediated by PKM2 still remains to be determined in our system.

The MEK5/ERK5 signalling pathway is strongly involved in cell survival and proliferation.⁴⁵ ERK5 phosphorylation and higher abundance of several ERK5 targets demonstrated the role of CD43 co-stimulatory signals in activating the MEK/ERK5 pathway. In agreement with this, inhibition of ERK5 led to diminished c-Myc, p65 and pSTAT3 abundance, suggesting that in TCR+CD43 co-stimulated cells, the abundance of these molecules was partially dependent on ERK5, but that other signalling pathways participate for their accumulation in the nucleus. Likewise, CREB and Bad, two proteins involved in apoptosis regulation and potential ERK5 targets⁷⁰ were phosphorylated in response to

TCR+CD43 co-stimulatory signals. Bad and STAT3 phosphorylation were diminished in TCR+CD43 co-stimulated cells in the presence of the ERK5 inhibitor and consistent with data showing that CD43 signalling leads to Lck and Fyn activation,^{21,49} we observed that in TCR+CD43 co-stimulated T cells, ERK5 and Bad phosphorylation is dependent on Src family kinases. Although CREB can be activated as a result of the MEK5/ERK5 pathway, under our experimental conditions, we found that the PKA pathway is the major mechanism responsible for CREB phosphorylation in response to the TCR+CD43 co-stimulatory signals. PKA activation leads also to Bad phosphorylation,⁷¹ whether this happens in response to TCR+CD43 stimulation remains to be investigated. Under our experimental conditions, TCR+CD43 co-stimulatory signals paralleled the TCR+CD28 co-stimulatory ones, although to a lesser extent, in terms of abundance of c-Myc and cyclin D1 and Bad phosphorylation. Altogether this data further suggest that CD43 co-stimulatory signals promote the non-glycolytic functions of PKM2, and that the MEK5/ERK5 and the PKA signalling pathways may be simultaneously activated by CD43, potentially regulating resistance to cell death.

In neutrophils, mast cells, T cells and granulocytes, CD43 is cleaved by γ -secretase following PMA treatment. As a consequence, the extracellular domain of CD43 is shed from the cell surface, and the intracellular domain, which contains two nuclear localization signals, is translocated into the nucleus⁵⁸ where it may interact with β -catenin to promote cell proliferation,⁷² and with promyelocytic nuclear bodies, to regulate growth factor withdrawal-induced apoptosis.^{58,73} Inhibition of γ -secretase impairs nuclear translocation of the cytoplasmic domain of CD43 and prevention of apoptosis.⁵⁸ Consistent with a role for CD43 in cell death protection, targeting CD43 with small interfering RNA increases the susceptibility of breast and lung cancer cells to apoptosis and vulnerability to lysis by natural killer cells.^{74,75} Likewise, in the BY155.16 murine T-cell hybridoma, the expression of wild-type human CD43 protected the cells against apoptosis following TCR engagement or PMA/ionomycin stimulation; on the contrary, the absence of the intracellular domain rather enhanced cell death toll, suggesting that the CD43 mutant lacking the intracellular domain functioned in a dominant negative fashion. Considering that the BY155.16 hybridoma cells express murine CD43, these data also suggest that murine CD43 could be responsible for the remaining live cells in PMA/ionomycin or TCR-stimulated cells (40% or 80%, respectively), counterbalancing the dominant negative function of CD43 Δ IC. Furthermore, in addition, to the conserved S⁷² and S⁷⁶ shown to participate in regulation of cell movement and proliferation and trafficking, respectively,⁷⁶ the intracellular region of human CD43 has other

PKC phosphorylation pattern sites that are not present in murine CD43 (residues 59–61 and 91–93 of CD43 cytoplasmic domain).⁶¹ Whether these sites confer additional capacities to human CD43 over murine CD43 in terms of cell death resistance, and whether murine CD43 can potentially overcome the dominant negative effect of the human CD43 Δ IC favouring the activation on anti-apoptotic pathways, need to be addressed.

Collectively, our results provide evidence that by regulating the non-glycolytic functions of PKM2, CD43 co-stimulatory signals promote the activation of the MEK/ERK5 and the PKA pathways, two pathways associated with cell growth and proliferation.^{25,30,77} Moreover, our data indicate that TCR+CD43 co-stimulation leads to the activation of multiple signalling pathways that share common key targets, such as CREB and Bad, highlighting the importance of regulating these proteins during cell activation to promote cell survival. Cell survival and proliferation are essential for the effector phase of the immune response and the fine-tuning of these processes is critical for the appropriate contraction and memory establishment. Hence, through the activation of pro-survival signalling pathways, CD43 may contribute to the regulation of homeostasis of the immune response.

Acknowledgements

We thank the blood donors for the generous gift of their lymphocytes. We thank Dr Humberto Vaquera for support with statistical analysis and Erika Melchy for technical support. Work in our laboratories was supported by grants # IN219307, IN206913 and IN212716 from DGAPA/UNAM (Departamento General de Apoyo para el Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México) and grants # 100275 and 220990 from CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), México to YR. MEBA and CMC were recipients of scholarships from CONACyT.

Author contributions

MEBA designed and performed research, analysed data and wrote the paper; RVE and BJB contributed to experimental design, research and paper revision; CMC, AFA and JPOO contributed to research; GPA contributed to experimental design and paper revision; YR contributed to experimental design, data analysis, paper writing and revision, and led the study.

Disclosures

The authors declare they have no competing interests or other interests that might be perceived to influence the

interpretation of results and discussion reported in this paper.

References

- Mueller DL, Jenkins MK, Schwartz RH. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol* 1989; **7**:445–80.
- Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* 2010; **22**:333–40.
- Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol* 2005; **5**:444–52.
- Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, Parry RV, Rathmell JC, Plas DR *et al*. The CD28 signalling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* 2002; **16**:769–77.
- Zheng Y, Delgoffe GM, Meyer CF, Chan W, Powell JD. Anergic T cells are metabolically anergic. *J Immunol* 2009; **183**:6095–101.
- Fukuda M, Carlsson SR. Leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes as differentiation antigens. *Med Biol* 1986; **64**:335–43.
- Carlsson SR, Fukuda M. Isolation and characterization of leukosialin, a major sialoglycoprotein on human leukocytes. *J Biol Chem* 1986; **261**:12779–86.
- Remold-O'Donnell E, Zimmerman C, Kenney D, Rosen FS. Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 1987; **70**:104–9.
- Park JK, Rosenstein YJ, Remold-O'Donnell E, Bierer BE, Rosen FS, Burakoff SJ. Enhancement of T-cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Nature* 1991; **350**:706–9.
- Sperling AI, Green JM, Mosley RL, Smith PL, DiPaolo RJ, Klein JR *et al*. CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28. *J Exp Med* 1995; **182**:139–46.
- Cannon JL, Mody PD, Blaine KM, Chen EJ, Nelson AD, Sayles LJ *et al*. CD43 interaction with ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins regulates T-cell trafficking and CD43 phosphorylation. *Mol Biol Cell* 2011; **22**:954–63.
- Woodman RC, Johnston B, Hickey MJ, Teoh D, Reinhardt P, Poon BY *et al*. The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice. *J Exp Med* 1998; **188**:2181–6.
- Stockton BM, Cheng G, Manjunath N, Ardman B, von Andrian UH. Negative regulation of T cell homing by CD43. *Immunity* 1998; **8**:373–81.
- Manjunath N, Correa M, Ardman M, Ardman B. Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature* 1995; **377**:535–8.
- Onami TM, Harrington LE, Williams MA, Galvan M, Larsen CP, Pearson TC *et al*. Dynamic regulation of T cell immunity by CD43. *J Immunol* 2002; **168**:6022–31.
- Ford ML, Onami TM, Sperling AI, Ahmed R, Evavold BD. CD43 modulates severity and onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2003; **171**:6527–33.
- Misawa Y, Nagaoka H, Kimoto H, Ishii Y, Kitamura K, Tsunetsugu-Yokota Y *et al*. CD43 expression in a B cell lymphoma, WEHI 231, reduces susceptibility to G1 arrest and extends survival in culture upon serum depletion. *Eur J Immunol* 1996; **26**:2573–81.
- Murakami YI, Yatabe Y, Sakaguchi T, Sasaki E, Yamashita Y, Morito N *et al*. c-Maf expression in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2007; **31**:1695–702.
- Kadaja L, Laos S, Maimets T. Overexpression of leukocyte marker CD43 causes activation of the tumor suppressor proteins p53 and ARF. *Oncogene* 2004; **23**:2523–30.
- Camacho-Concha N, Olivios-Ortiz A, Nunez-Rivera A, Pedraza-Saavedra A, Gutierrez-Xicotencatl L, Rosenstein Y *et al*. CD43 promotes cells transformation by preventing merlin-mediated contact inhibition of growth. *PLoS One* 2013; **8**:e80806.
- Pedraza-Alva G, Merida LB, Burakoff SJ, Rosenstein Y. CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase. *J Biol Chem* 1996; **271**:27564–8.
- Cruz-Munoz ME, Salas-Vidal E, Salaiza-Suazo N, Becker I, Pedraza-Alva G, Rosenstein Y. The CD43 coreceptor molecule recruits the ζ -chain as part of its signaling pathway. *J Immunol* 2003; **171**:1901–8.
- Pedraza-Alva G, Merida LB, Burakoff SJ, Rosenstein Y. T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation. *J Biol Chem* 1998; **273**:14218–24.
- Layseca-Espinosa E, Pedraza-Alva G, Montiel JL, del Rio R, Fierro NA, Gonzalez-Amaro R *et al*. T cell aggregation induced through CD43: intracellular signals and inhibition by the immunomodulatory drug leflunomide. *J Leukoc Biol* 2003; **74**:1083–93.
- Fierro NA, Pedraza-Alva G, Rosenstein Y. TCR-dependent cell response is modulated by the timing of CD43 engagement. *J Immunol* 2006; **176**:7346–53.

- 26 Stefanova I, Hemmer B, Vergelli M, Martin R, Biddison WE, Germain RN. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat Immunol* 2003; **4**:248–54.
- 27 Silverman LB, Wong RC, Remold-O'Donnell E, Vercelli D, Sancho J, Terhorst C *et al.* Mechanism of mononuclear cell activation by an anti-CD43 (sialophorin) agonistic antibody. *J Immunol* 1989; **142**:4194–200.
- 28 del Rio R, Rincon M, Layseca-Espinosa E, Fierro NA, Rosenstein Y, Pedraza-Alva G. PKC θ is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **325**:133–43.
- 29 Santana MA, Pedraza-Alva G, Olivares-Zavaleta N, Madrid-Marina V, Horejsi V, Burakoff SJ *et al.* CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NF κ B transcription factors in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 2000; **275**:31460–8.
- 30 Mattioli I, Dittich-Breiholz O, Livingstone M, Kracht M, Schmitz ML. Comparative analysis of T-cell costimulation and CD43 activation reveals novel signaling pathways and target genes. *Blood* 2004; **104**:3302–4.
- 31 Luo W, Semenza GL. Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. *Trends Endocrinol Metab* 2012; **23**:560–6.
- 32 Gao X, Wang H, Yang JJ, Liu X, Liu ZR. Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase. *Mol Cell* 2012; **45**:598–609.
- 33 Song H, Jin X, Lin J. Stat3 upregulates MEK5 expression in human breast cancer cells. *Oncogene* 2004; **23**:8301–9.
- 34 Straus DB, Weiss A. Genetic evidence for the involvement of the Ick tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 1992; **70**:585–93.
- 35 Sleckman BP, Peterson A, Jones WK, Foran JA, Greenstein JL, Seed B *et al.* Expression and function of CD4 in a murine T-cell hybridoma. *Nature* 1987; **328**:351–3.
- 36 Hu B. *Methods of Enzymatic Analysis*. Weinheim, Germany: New York Academy Press, 1963.
- 37 Vera-Estrella R, Barkla BJ, Amezcua-Romero JC, Pantoja O. Day/night regulation of aquaporins during the CAM cycle in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant, Cell Environ* 2012; **35**:485–501.
- 38 Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**:6419.
- 39 Krutzik PO, Clutter MR, Trejo A, Nolan GP. Fluorescent cell barcoding for multiplex flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* 2011; Chapter 6:Unit 6.31.1–6.31.15. doi: 10.1002/0471142956.cy0631s15.
- 40 FlowJo Software. Tree Star, Inc., 1997–2012.
- 41 Hitosugi T, Kang S, Vander Heiden MG, Chung TW, Elf S, Lythgoe K *et al.* Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. *Sci Signal* 2009; **2**:ra73.
- 42 Marjanovic S, Eriksson I, Nelson BD. Expression of a new set of glycolytic isozymes in activated human peripheral lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1087**:1–6.
- 43 Goodman WA, Young AB, McCormick TS, Cooper KD, Levine AD. Stat3 phosphorylation mediates resistance of primary human T cells to regulatory T cell suppression. *J Immunol* 2011; **186**:3336–45.
- 44 Egwuagu CE. STAT3 in CD4⁺ T helper cell differentiation and inflammatory diseases. *Cytokine* 2009; **47**:149–56.
- 45 Drew BA, Burrow ME, Beckman BS. MEK5/ERK5 pathway: the first fifteen years. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1825**:37–48.
- 46 Villalba M, Bushway P, Altman A. Protein kinase C- θ mediates a selective T cell survival signal via phosphorylation of BAD. *J Immunol* 2001; **166**:5955–63.
- 47 Hsueh YP, Liang HE, Ng SY, Lai MZ. CD28-costimulation activates cyclic AMP-responsive element-binding protein in T lymphocytes. *J Immunol* 1997; **158**:85–93.
- 48 Yang Q, Deng X, Lu B, Cameron M, Fearn C, Patricelli MP *et al.* Pharmacological inhibition of BMK1 suppresses tumor growth through promyelocytic leukemia protein. *Cancer Cell* 2010; **18**:258–67.
- 49 Alvarado M, Klassen C, Cerny J, Horejsi V, Schmidt RE. MEM-59 monoclonal antibody detects a CD43 epitope involved in lymphocyte activation. *Eur J Immunol* 1995; **25**:1051–5.
- 50 Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; **43**:969–80.
- 51 Burr JG, Dreyfuss G, Penman S, Buchanan JM. Association of the src gene product of Rous sarcoma virus with cytoskeletal structures of chicken embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; **77**:3484–8.
- 52 Wu S, Le H. Dual roles of PKM2 in cancer metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2013; **45**:27–35.
- 53 Suzaki Y, Yoshizumi M, Kagami S, Koyama AH, Taketani Y, Houchi H *et al.* Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells: potential role in cell survival following oxidative insults. *J Biol Chem* 2002; **277**:9614–21.
- 54 Sun W, Kesavan K, Schaefer BC, Garrington TP, Ware M, Johnson NL *et al.* MEK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway. *J Biol Chem* 2001; **276**:5093–100.
- 55 Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**:599–609.
- 56 Du K, Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 1998; **273**:32377–9.
- 57 Duronio V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J* 2008; **415**:333–44.
- 58 Seo W, Ziltener HJ. CD43 processing and nuclear translocation of CD43 cytoplasmic tail are required for cell homeostasis. *Blood* 2009; **114**:3567–77.
- 59 Shi YF, Sahai BM, Green DR. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature* 1989; **339**:625–6.
- 60 Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 2013; **13**:227–42.
- 61 Bravo-Adame M, Sandoval-Hernandez M, Migueles-Lozano O, Rosenstein Y. CD43. In: Choi S, ed. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. New York: Springer, 2012: 320–8.
- 62 Imamura K, Tanaka T. Multimolecular forms of pyruvate kinase from rat and other mammalian tissues. I. Electrophoretic studies. *J Biochem* 1972; **71**:1043–51.
- 63 Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D *et al.* The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity* 2011; **35**:871–82.
- 64 Clower CV, Chatterjee D, Wang Z, Cantley LC, Vander Heiden MG, Krainer AR. The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**:1894–9.
- 65 Discher DJ, Bishopric NH, Wu X, Peterson CA, Webster KA. Hypoxia regulates β -enolase and pyruvate kinase-M promoters by modulating Sp1/Sp3 binding to a conserved GC element. *J Biol Chem* 1998; **273**:26087–93.
- 66 Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O'Meally R *et al.* Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 2011; **145**:732–44.
- 67 Luo W, Semenza GL. Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget* 2011; **2**:551–6.
- 68 Yang W, Xia Y, Ji H, Zheng Y, Liang J, Huang W *et al.* Nuclear PKM2 regulates β -catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature* 2011; **480**:118–22.
- 69 Lee J, Kim HK, Han YM, Kim J. Pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) interacts and cooperates with Oct-4 in regulating transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; **40**:1043–54.
- 70 Wang X, Tournier C. Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell Signal* 2006; **18**:753–60.
- 71 Lizcano JM, Morrice N, Cohen P. Regulation of BAD by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *Biochem J* 2000; **349**:547–57.
- 72 Andersson CX, Fernandez-Rodriguez J, Laos S, Sikut R, Sikut A, Baeckstrom D *et al.* CD43 has a functional NLS, interacts with β -catenin, and affects gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **316**:12–7.
- 73 Salomoni P, Pandolfi PP. The role of PML in tumor suppression. *Cell* 2002; **108**:165–70.
- 74 Fu Q, Cash SE, Andersen JJ, Kennedy CR, Madadi AR, Raghavendra M *et al.* Intracellular patterns of sialophorin expression define a new molecular classification of breast cancer and represent new targets for therapy. *Br J Cancer* 2014; **110**:146–55.
- 75 Fu Q, Cash SE, Andersen JJ, Kennedy CR, Oldenburg DG, Zander VB *et al.* CD43 in the nucleus and cytoplasm of lung cancer is a potential therapeutic target. *Int J Cancer* 2013; **132**:1761–70.
- 76 Mody PD, Cannon JL, Bandukwala HS, Blaine KM, Schilling AB, Swier K *et al.* Signaling through CD43 regulates CD4 T-cell trafficking. *Blood* 2007; **110**:2974–82.
- 77 Pedraza-Alva G, Merida LB, del Rio R, Fierro NA, Cruz-Munoz ME, Olivares N *et al.* CD43 regulates the threshold for T cell activation by targeting Cbl functions. *IUBMB Life* 2011; **63**:940–8.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5), Bad and cAMP response element binding protein (CREB) phosphorylation, as well as p65 nuclear localization require T-cell receptor (TCR)+CD43 co-stimulatory signals.

Figure S2. Abundance of Lck, pyruvate kinase isoform M2 (PKM2) and extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) in Jurkat and JCAM-1 cells.

Figure S3. T-cell receptor (TCR)+CD43 crosslinking induces protein kinase A (PKA) activation.

Figure S4. T-cell receptor (TCR)+CD43-induced cAMP response element binding protein (CREB) phosphorylation in Jurkat cells is protein kinase A (PKA) dependent.

V. RESULTADOS NO PUBLICADOS

5.1 Expresión diferencial de proteínas en respuesta al entrecruzamiento del TCR y CD43

Datos previos del laboratorio mostraron que el orden y la duración de las señales que recibe el linfocito a través del TCR y/o de CD43, define la calidad de la respuesta de las células. Cuando las células eran estimuladas previamente a través de CD43, y posteriormente a través del TCR, los linfocitos mostraron niveles altos de proliferación y producción de citocinas. Por el contrario, la estimulación previa a través del TCR por tiempos mayores a 30 min indujo un estado de anergia. Interesantemente, las señales anergizantes del TCR pueden ser revertidas si las señales de CD43 ocurren dentro de los primeros 30 min posteriores al entrecruzamiento del TCR. Estos resultados recalcan el papel modulador de CD43 durante la respuesta inmune, así como la importancia del orden y la duración de las primeras señales que recibe el linfocito T durante la activación para definir el tipo de respuesta celular [176].

El entrecruzamiento de CD43 induce la activación de vías de señalización que promueven la formación de complejos macromoleculares que culminan en la activación de la vía de las MAPK, PKC y un aumento en los niveles de calcio intracelular que inducen rearrreglos del citoesqueleto, expresión génica y entrada al ciclo celular [150]. Para ampliar nuestro conocimiento sobre el papel de CD43 durante las primeras horas de la activación de los linfocitos T, evaluamos los perfiles de expresión de proteínas por medio de un estudio proteómico de células activadas a través del TCR y CD43. Los resultados principales de este esfuerzo se reportan en el artículo adjunto "AN ALTERNATIVE MODE OF CD43 SIGNAL TRANSDUCTION ACTIVATES PRO-SURVIVAL PATHWAYS OF T LYMPHOCYTES". En esta sección se describen y discuten resultados adicionales que no fueron incluidos en dicha publicación.

Los linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica se activaron con anticuerpos anti-CD3 o anti-CD43 por diferentes períodos de tiempo (15 min a 2 h) a 37°C, y posteriormente co-estimulando a las células entrecruzando el TCR o CD43 por 6 horas más (Fig. 13 A). A los 15 minutos de estimulación, se verificó por inmunoblot la fosforilación de ERK 1/2 para corroborar la activación de las células. En la Fig. 13 B se muestra, como se esperaba, una mayor fosforilación de ERK 1/2 en respuesta a las señales de CD43, previas al estímulo con el TCR. Por el contrario, en células pre-estimuladas a través del TCR la mayor fosforilación de ERK 1/2 sólo ocurrió a los 15 min de pre-estimulación a través del TCR, y posteriormente fue disminuyendo. Estos resultados concuerdan con datos del laboratorio [176], donde se observó una mayor activación de linfocitos T cuando las señales de CD43 ocurrían dentro de los 30 minutos posteriores a las señales del TCR. Una vez confirmada la activación apropiada de las células de tres donadores independientes, evaluamos las

diferencias en la abundancia de proteínas en respuesta a los diferentes estímulos mediante la técnica 2D-DIGE.

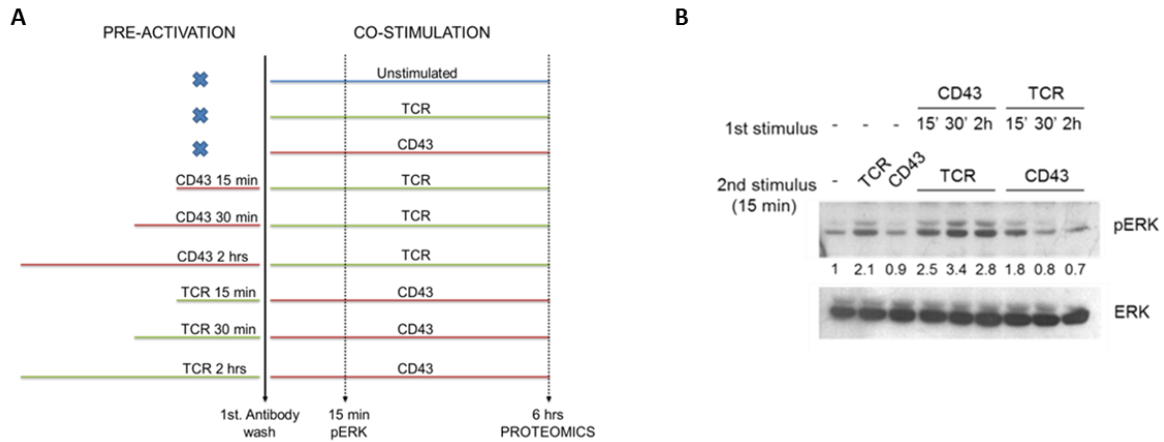


Fig. 13. Activación de linfocitos T CD4+ a través del TCR y CD43.

A, Los linfocitos T CD4+ (15×10^6) se estimularon con anticuerpos anti-CD43 (L10) y/o anti-TCR (OKT3) a $2\mu\text{g}/\text{mL}$, comparando diferentes tiempos de pre-estimulación. B, La fosforilación de ERK 1/2 se evaluó por inmunoblot en lisados celulares de linfocitos T CD4+ activados como se describe en A. Los niveles totales de ERK 2 se muestran como control de carga. Los datos que se muestran son representativos de los resultados obtenidos para cada uno de los tres donadores que se incluyeron en el análisis proteómico.

Los lisados celulares de los diferentes estímulos para los tres donadores se distribuyeron en 12 geles, como se muestra en la Fig. 14 A y B. El análisis proteómico se realizó como se describe en “Materiales y Métodos” (Anexo 1). El análisis de los geles nos permitió identificar 22 spots de proteínas que mostraron cambios significativos en su abundancia (Fig. 14 C). Los spots se extrajeron y su análisis por espectrometría de masas (LC-MS/MS) identificó 82 proteínas (Anexo 3) contenidas entre los 22 spots, lo que refleja el grado de complejidad de las muestras.

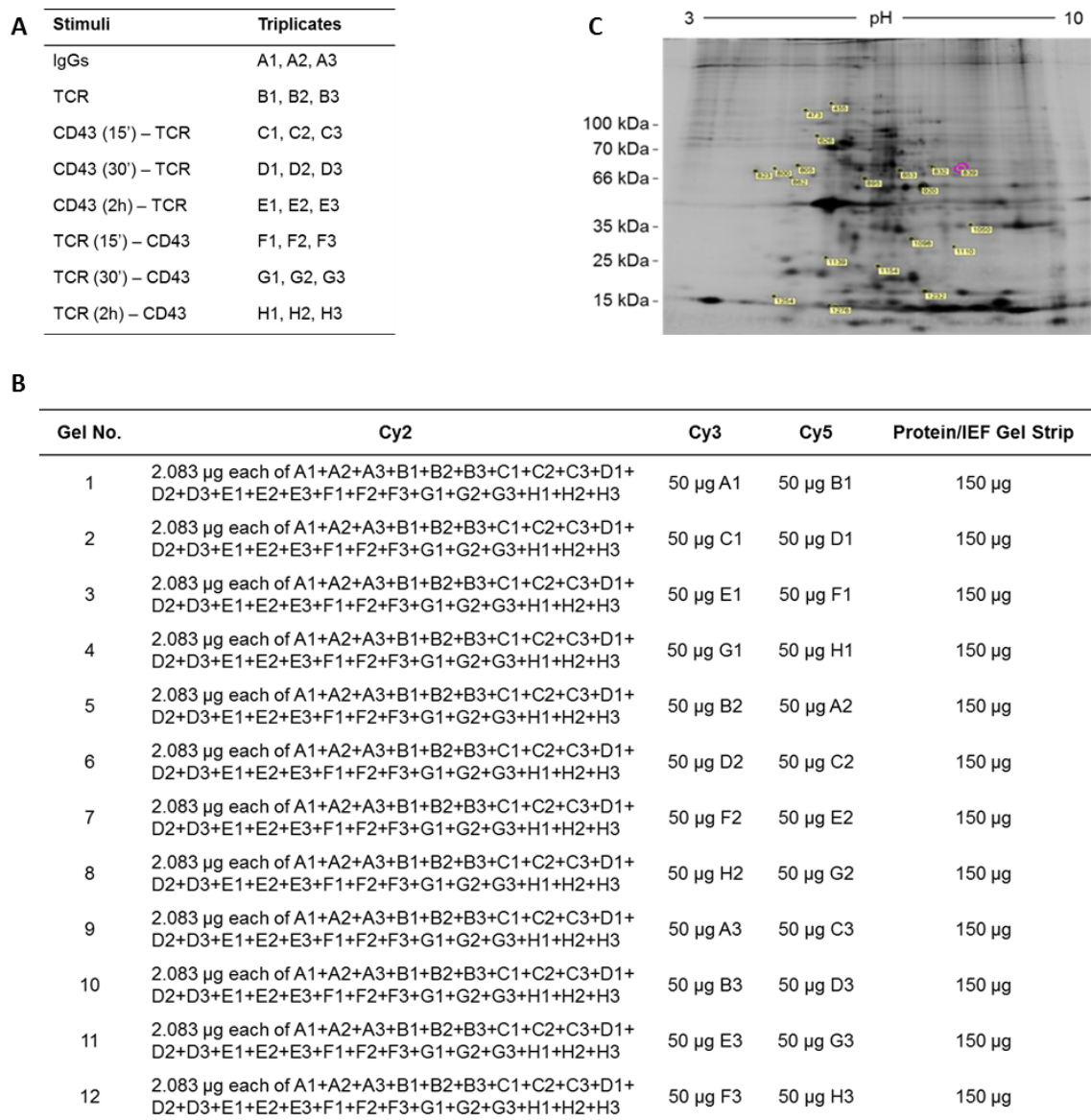


Fig. 14. 2D-DIGE.

A y B, Diseño experimental: en A se muestran los estímulos incluidos en el experimento, cada uno por triplicado; en B se describe el marcaje de las muestras y la distribución de las mismas en los 12 geles. C, Imagen representativa de uno de los geles, indicando los spots que presentaron cambios en la abundancia.

Para definir el significado biológico de la regulación de la abundancia de dichas proteínas, se hizo un análisis bioinformático que permitiera identificar las funciones en las que participan estas proteínas. Para ello se utilizó la herramienta DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), la cual

ayuda a extraer un significado biológico de una lista larga de genes o proteínas. El análisis con DAVID se hizo tomando como criterio de clasificación la información de Gene Ontology para los procesos biológicos en los que participan cada una de las proteínas. De esta manera identificamos ocho procesos biológicos enriquecidos (Fig. 15 A). Resulta interesante el enriquecimiento de procesos relacionados con el metabolismo de glucosa y la regulación de apoptosis (23% y 13%, respectivamente). Estos resultados se confirmaron por medio de un análisis para la identificación de interacciones entre proteínas utilizando la herramienta STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, [http://http://string-db.org/](http://string-db.org/)). En la Fig. 15 B se muestran las asociaciones funcionales entre el conjunto de proteínas y se resalta el grupo de proteínas que participan en procesos metabólicos, el cual representa la vía mayormente enriquecida de acuerdo a la base de datos “Kegg Pathways”, incluida en el análisis con STRING. En conjunto, estos resultados sugieren que, al modular el metabolismo y la apoptosis, las señales de CD43 podrían participar en la regulación de la homeostasis de los linfocitos T.

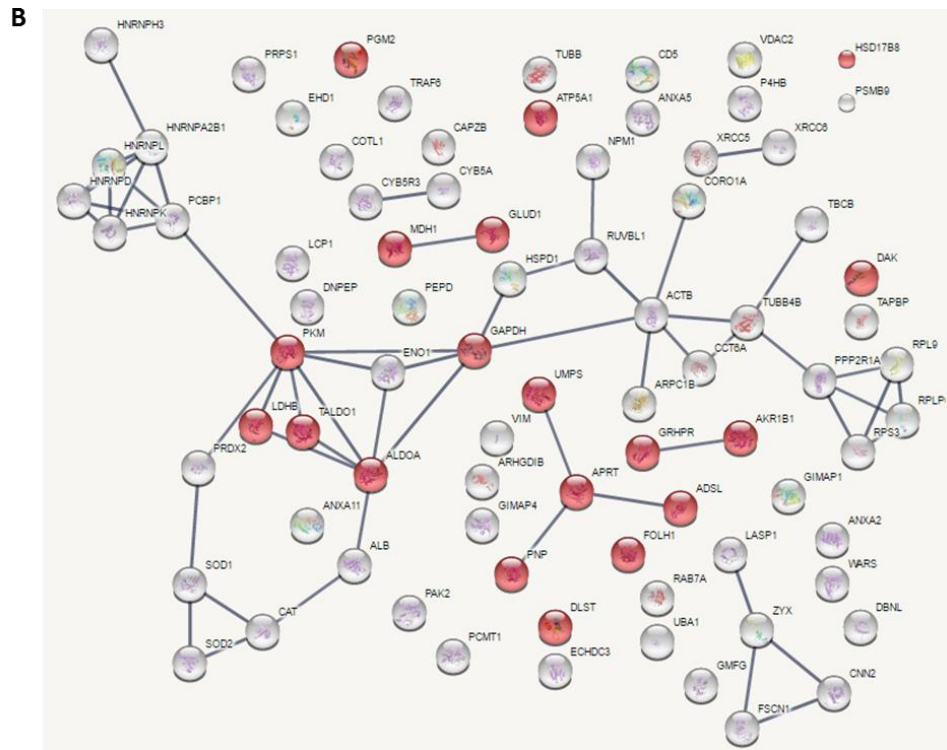
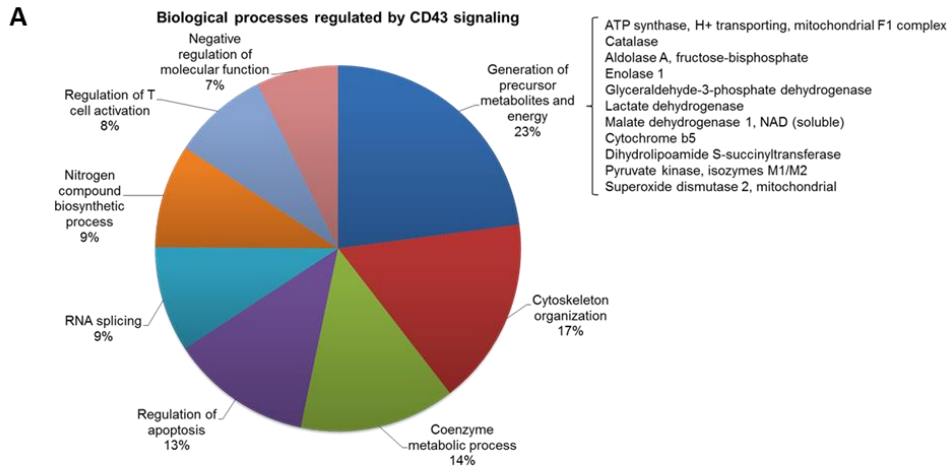


Fig. 15. Procesos biológicos enriquecidos en células co-estimuladas a través del TCR y CD43.

A, Las proteínas identificadas se agruparon de acuerdo a su notación en Gene Ontology (Procesos biológicos) utilizando la herramienta “Functional Annotational Clustering” de la base de datos de DAVID. La gráfica muestra los clusters mayormente enriquecidos, así como una lista de proteínas que integran el conjunto de “Generación de metabolitos precursores y energía”. Sólo se incluyeron clusters con valores de enriquecimiento ≥ 1.3 y valores de $p \leq 0.05$. B, La interacción entre las proteínas identificadas se evaluó utilizando la base de datos STRING. En rojo se muestran las proteínas que componen el nodo correspondiente a vías metabólicas.

5.2 Las señales conjuntas del TCR y de CD43 modulan el metabolismo de glucosa

Como se mencionó anteriormente, la respuesta efectora de los linfocitos T depende de la capacidad de la célula para aumentar su metabolismo. La regulación del metabolismo por las moléculas co-estimuladoras permite a los linfocitos cumplir con las demandas energéticas propias del estado de activación [17, 19]. La regulación del metabolismo es una función que no se ha descrito anteriormente para CD43. Del análisis proteómico y bioinformático resultó interesante la identificación de un papel de CD43 en la modulación de la abundancia de enzimas metabólicas, sugiriendo una relación entre la regulación del metabolismo y la apoptosis. Dado que la “Generación de precursores metabólicos y energía” fue el proceso biológico mayormente enriquecido en respuesta a las señales de CD43, exploramos la participación de CD43 en la regulación del metabolismo de glucosa. El análisis proteómico identificó 11 proteínas agrupadas bajo esta categoría (Fig. 15) entre las cuales la aldolasa, la enolasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y la piruvato cinasa están directamente involucradas en glicólisis.

La piruvato cinasa cataliza la conversión irreversible de fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato al transferir un grupo fosfato del PEP al ADP, liberando una molécula de ATP [196]. Tomando en cuenta que la piruvato cinasa constituye la última reacción de la vía glicolítica, consideramos que su actividad podría reflejar alguna participación de CD43 en la regulación del flujo glicolítico. Los datos mostrados en el artículo “AN ALTERNATIVE MODE OF CD43 SIGNAL TRANSDUCTION ACTIVATES PRO-SURVIVAL PATHWAYS OF T LYMPHOCYTES” demuestran que, si bien CD43 no induce un aumento significativo en la actividad glicolítica de la piruvato cinasa, sí promueve un aumento en una de las funciones alternas de esta enzima al ser fosforilada en la Y¹⁰⁵ y promover así la activación de la vía de Stat3/ERK5 [197]. Como se describe en el artículo, la fosforilación de la piruvato cinasa (PKM2) en la Y¹⁰⁵ disminuye su actividad glicolítica y favorece su función como cinasa de proteínas, lo que finalmente promueve la activación de vías anabólicas.

Más aún, los linfocitos activados metabolizan la glucosa por medio de la glicólisis aeróbica, un fenómeno llamado “Efecto Warburg” [198]. Durante la glicólisis aeróbica, en vez de entrar al Ciclo de Krebs, el piruvato es convertido a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH) con la finalidad de generar precursores para biomasa [199]. Debido a que el análisis proteómico identificó cambios en la abundancia de la LDH en respuesta a las señales de CD43, evaluamos la producción de lactato en linfocitos estimulados. En la Fig. 16 A se observa que la estimulación de las células a través del TCR+CD43 indujo un aumento en la producción de lactato (2.4 veces más que las células no estimuladas). En concordancia con la actividad de la piruvato cinasa, las células estimuladas a través del TCR+CD28 tuvieron

un mayor aumento en la producción de lactato (6 veces más que las células no estimuladas). El entrecruzamiento del TCR o de CD28 solos resultó en un aumento en la producción de lactato de 2.4 y 2.2 veces, respectivamente, mientras que el entrecruzamiento de CD43 solo indujo un aumento de 1.3 veces. Como medida de la ingesta de glucosa, se cuantificó la cantidad de glucosa remanente en el medio de cultivo 48 horas después de iniciada la estimulación de las células. En la Fig. 16 B se muestra que en los linfocitos estimulados a través del TCR+CD43 hay menos glucosa en el medio (30% menos), en comparación con las células no estimuladas, lo que sugiere que han ingerido glucosa tras la activación. De manera mucho más notoria ocurre en las células estimuladas a través del TCR y CD28 (85% menos glucosa en el medio). De forma similar a los datos obtenidos para la producción de lactato, la ingesta de glucosa fue menor en células estimuladas solamente a través de CD43 (8%) en comparación con células estimuladas a través del TCR o CD28 (40% menos glucosa en el medio).

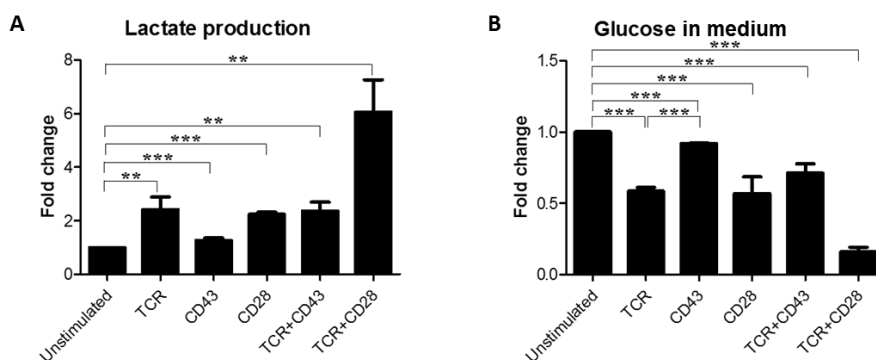


Fig. 16. Las señales de CD43 inducen moderadamente la producción de lactato y el consumo de glucosa.

Los linfocitos (15×10^6) fueron co-estimulados durante 48 h a través del TCR y/o CD43 o CD28. La cantidad de lactato (A) y glucosa (B) en el sobrenadante se cuantificó con un analizador enzimático YSI-2700. Los datos se representan como cambios con respecto a las células no estimuladas y corresponden a siete experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba de T ($p \leq 0.05$).

Los resultados anteriores sugieren que las señales de CD43, pero más aún las del TCR, regulan el metabolismo de glucosa. Los cambios moderados en la actividad glicolítica sugieren que las señales de CD43 podrían promover el desvío de la glucosa hacia vías anabólicas en vez de catabólicas. En conjunto, estos resultados sugieren que CD43 podría proporcionar a las células “señales tónicas” necesarias para mantener una ingesta y un

metabolismo basal de glucosa que permita mantener la homeostasis de los linfocitos en reposo, y a su vez podría regular la activación de las células al dirigir el destino de precursores metabólicos hacia vías de biosíntesis.

5.3 Las señales de CD43 inducen la expresión del transportador de glucosa Glut-1 de manera dependiente de la vía de PI3K/Akt/mTOR

En linfocitos, la ingesta de glucosa en linfocitos ocurre principalmente a través de transportadores específicos [200], en particular, el transportador de glucosa Glut-1 [201, 202]. La función de Glut-1 puede ser regulada por varios mecanismos: transcripción génica, expresión de la proteína y translocación a la membrana plasmática para llevar a cabo el transporte de glucosa.

Para evaluar si las señales de CD43 podían inducir un aumento en la expresión de Glut-1 como consecuencia de la activación, se estimularon linfocitos T a través del TCR y/o CD43, utilizando diferentes anticuerpos anti-CD43 (DFT1 [203], MEM59 [204] y L10 [205]). En la Fig. 17 A y B se observa que las células estimuladas aumentaron la expresión de Glut-1 en la membrana en respuesta al tratamiento con cualquiera de los tres anticuerpos anti-CD43. Interesantemente, se observó que las señales de CD43 por sí solas inducen un aumento en la expresión de Glut-1 en la membrana (Fig. 17 C y D). Estos datos indican que el entrecruzamiento de CD43, por si solo o en conjunto con el TCR, induce un aumento en la expresión de Glut-1 en la membrana, lo que podría preparar a las células para aumentar el metabolismo de glucosa durante la activación. Con la finalidad de mantener una congruencia con los estímulos utilizados para el estudio de proteómica, y dado que el efecto a nivel de la expresión de Glut-1 es equivalente en células estimuladas solo a través de CD43 o en co-estímulo con el TCR (TCR+CD43), en los siguientes experimentos se evaluó la respuesta de las células estimuladas a través del TCR+CD43.

Para estudiar el mecanismo de inducción de Glut-1 en respuesta a las señales de CD43 comenzamos por evaluar la cinética de expresión del transportador en la membrana. En la Fig. 18 A y B se muestra la expresión de Glut-1 en la membrana de linfocitos T después de ser co-estimulados durante diferentes períodos de tiempo a través del TCR+CD43 o TCR+CD28. Ambos receptores inducen un incremento importante en la expresión del transportador de glucosa desde una hora después de haber iniciado la activación. Sin embargo, en el caso de las células estimuladas con CD28, la expresión de Glut-1 en la membrana disminuye a tiempos más largos, mientras que en células estimuladas con CD43, la expresión del transportador se mantiene por encima de la que se observa en respuesta a las señales co-estimuladoras de CD28. Estos datos sugieren que las señales de

CD43 favorecen la translocación a la membrana plasmática de moléculas ya existentes de Glut-1 en la célula para regular la ingesta de glucosa.

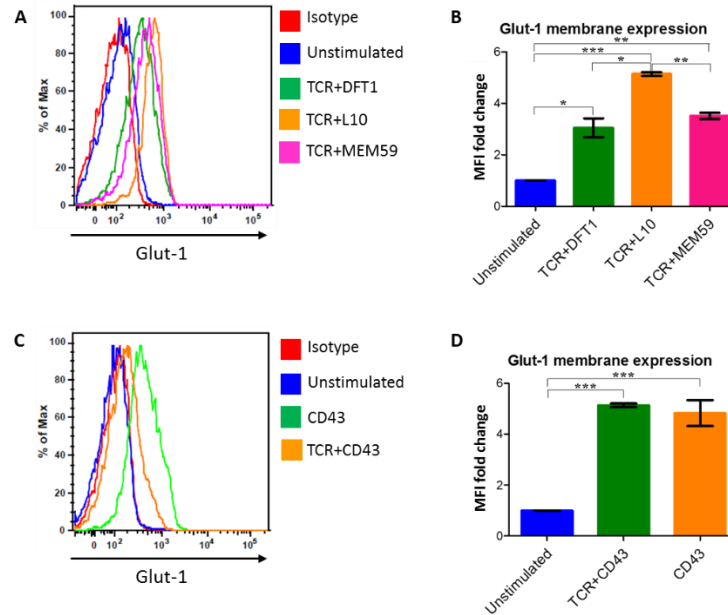


Fig. 17. Las señales de CD43 inducen un aumento en la expresión de Glut-1 en la membrana.

Los linfocitos (2×10^6) se activaron durante 24 horas con los estímulos indicados y se evaluó la expresión de Glut-1 por citometría de flujo. A, La activación a través del TCR y el co-estímulo con diferentes anticuerpos anti-CD43 induce un aumento en la expresión de Glut-1. C, Las señales solas de CD43, por el entrecruzamiento con el anticuerpo L10, inducen un aumento en la expresión de Glut-1 en la membrana. B y D, La gráficas muestran los cambios en la intensidad media de fluorescencia (MFI) de tres experimentos con donadores independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba de T ($p \leq 0.05$).

Con el objetivo de identificar las vías de señalización que participan en la regulación de la translocación de Glut-1 a la membrana, se evaluó la expresión de este transportador en células estimuladas a través de TCR+CD43 en presencia de inhibidores de las vías de PI3K y mTOR, las cuales han sido descritas como vías fundamentales en la regulación del metabolismo de glucosa de los linfocitos T [17, 206]. En la Fig. 19 A y B se muestra que las células estimuladas que fueron pre-incubadas con el inhibidor de PI3K (LY294002) presentan una menor translocación de Glut-1 a la membrana, en comparación con las células estimuladas incubadas sólo con DMSO. Asimismo, las células que fueron incubadas con Rapamicina, un inhibidor de la vía de mTOR, también muestran un impedimento en la

expresión de Glut-1 en la membrana. Estos datos demuestran que la regulación de la expresión de Glut-1 en respuesta a las señales de TCR+CD43 depende de la vía de PI3K/Akt/mTOR y confirman un papel modulador de TCR+CD43 en el metabolismo de glucosa, al preparar a la célula para mantener la ingesta basal de glucosa mediante la modulación de la expresión del transportador Glut-1 en la membrana.

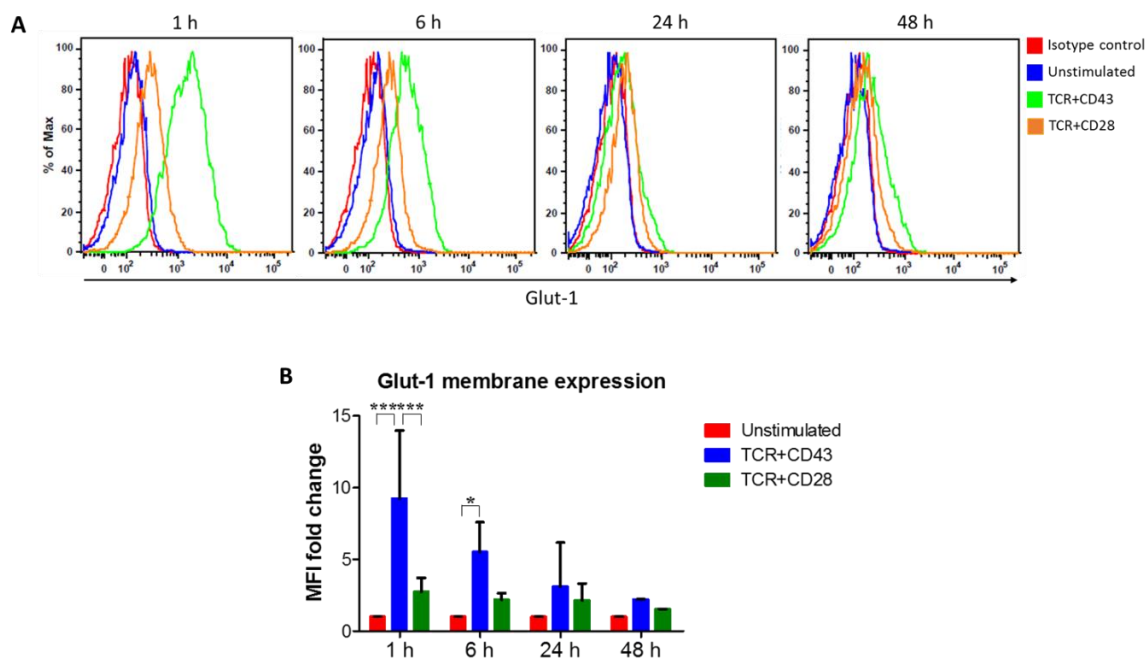


Fig. 18. La expresión de Glut-1 en la membrana de linfocitos estimulados a través del TCR y CD43 o CD28 se induce a partir de 1 hora de activación.

A, Los linfocitos T (2×10^6) se activaron durante diferentes períodos de tiempo y la expresión de Glut-1 en la membrana se evaluó por citometría de flujo. En B se muestran los cambios observados en la intensidad media de fluorescencia (MFI) de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba de T ($p \leq 0.05$).

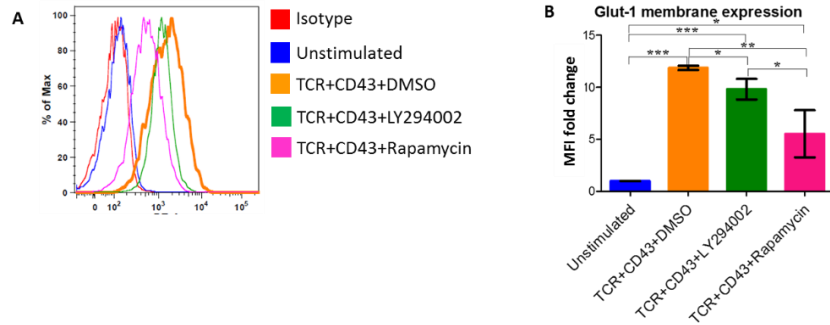


Fig. 19. La translocación de Glut-1 a la membrana en respuesta a las señales del TCR y CD43 depende de la vía de PI3K y mTOR.

A, Los linfocitos T (2×10^6) se pre-incubaron por 30 min con LY294002 (10 μ M) o Rapamicina (50 nM) y se estimularon a través del TCR y CD43 durante 1 hora. La expresión de Glut-1 se midió por citometría de flujo. B, La gráfica muestra los cambios en la intensidad media de fluorescencia (MFI) de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba de T ($p \leq 0.05$).

5.4 La interacción de CD43 con HSA favorece la supervivencia de los linfocitos T

Con el fin de evaluar los efectos de las señales mediadas por CD43 en la supervivencia de los linfocitos T en un contexto similar a las condiciones fisiológicas en las que se encuentran las células, evaluamos la viabilidad de linfocitos T tratados con albúmina sérica humana (HSA), un ligando de CD43 previamente reportado [146] y que se encuentra presente de manera constante en la circulación. Comenzamos por evaluar la interacción de CD43 con HSA en linfocitos T. En la Fig. 20 A se muestra la unión de HSA acoplada al fluoróforo FITC en linfocitos T, así como una reducción en la unión de HSA-FITC cuando las células fueron incubadas simultáneamente con el anticuerpo anti-CD43 L10 (Fig. 20 B), sugiriendo una competencia entre el anticuerpo y la HSA por su unión a CD43.

Para medir la viabilidad de las células, y por lo tanto un reflejo de su metabolismo, los linfocitos tratados con HSA fueron incubados con MTT (Fig. 20 C), o con yoduro de propidio (Fig. 20 D) para evaluar el ciclo celular. Se observó un aumento en la viabilidad de los linfocitos desde tiempos cortos de 24 h, hasta 120 h, en comparación con las células no tratadas. La modulación de la viabilidad de linfocitos T activados con PMA/ionomicina en respuesta a la interacción de CD43 con su ligando se evaluó incubando a las células con PMA/ionomicina y HSA de manera simultánea. La unión de HSA favorece un aumento en la viabilidad de las células, aún después de haber recibido el estímulo con PMA/ionomicina (Fig. 20 E). Estos datos sugieren que la unión de HSA con CD43 podría funcionar como una señal tónica que favorece el metabolismo celular y mantiene así la

viabilidad de las células, lo que podría contribuir a la homeostasis del sistema inmune al promover el mantenimiento del repertorio de los linfocitos T circulantes.

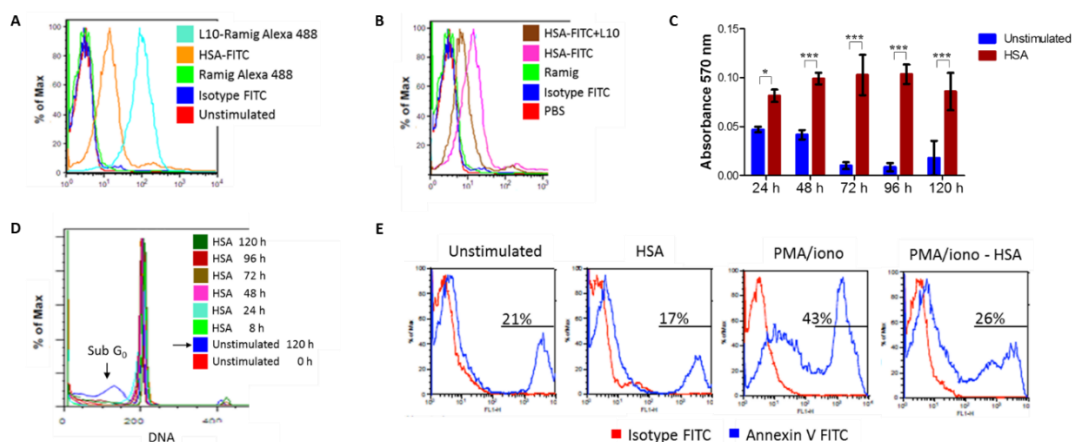


Fig. 20. La unión de HSA a CD43 aumenta la viabilidad de los linfocitos T.

A, La unión de HSA se evaluó en linfocitos T (1×10^6) incubados con HSA-FITC (10 mg/mL) durante 2 horas. B, HSA-FITC compite con el anticuerpo anti-CD43 L10 por sitios de unión en linfocitos T. C, La viabilidad de linfocitos incubados con HSA (10 mg/mL) durante diferentes períodos de tiempo se midió con un ensayo de MTT, donde la viabilidad es proporcional a la absorbancia. D, Se evaluó la cantidad de células en la fase Sub G_0 del ciclo celular en linfocitos tratados con HSA (10 mg/mL) durante diferentes períodos de tiempo. E, Se estimularon 5×10^4 linfocitos con HSA (10 mg/ml) y/o con PMA (250 ng)/ionomicina (2.5 μ M) durante 48 horas y se evaluó la viabilidad por medio de una tinción con Anexina V. Las gráficas de A y C son representativas de tres experimentos y las gráficas de B, D y E son representativas de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se hizo con la prueba de T ($p \leq 0.05$).

Para determinar las vías de señalización responsables del aumento en la viabilidad en respuesta a las señales de CD43, se evaluó la activación de la vía de PI3K/Akt, una vía cuya participación en la regulación del metabolismo y la viabilidad celular ha sido ampliamente descrita [207, 208]. Los linfocitos T se estimularon con el anticuerpo monoclonal anti-CD43 L10 o HSA para evaluar la activación de Akt. Se observó que ambos estímulos indujeron la fosforilación de Akt (Fig. 21 A y B), asimismo, se observó un aumento en la fosforilación de sustratos de Akt en respuesta al tratamiento con HSA (Fig. 21 B). En conjunto, estos resultados, junto con los mostrados en el artículo adjunto, sugieren que las señales de CD43 podrían favorecer la supervivencia de las células al promover la activación de vías de señalización que modulan moléculas pro y anti-apoptóticas.

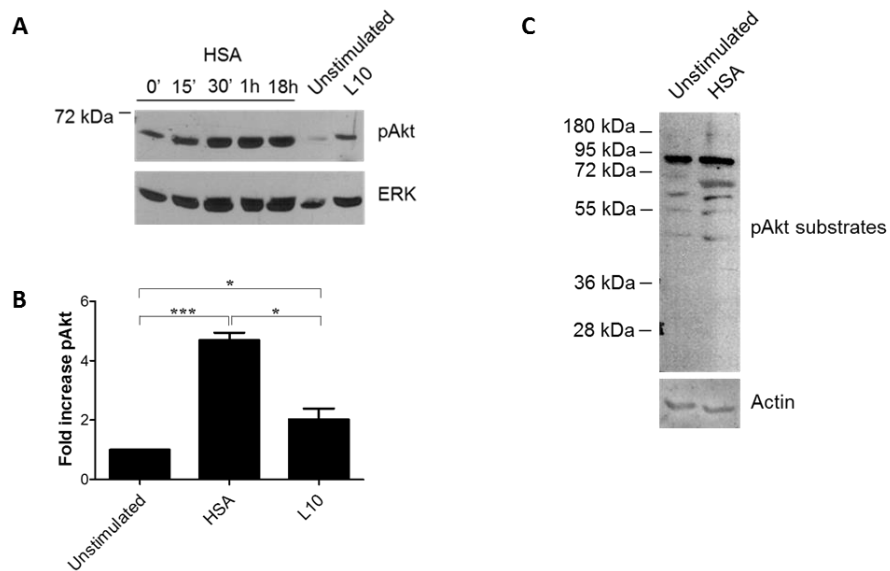


Fig. 21. La estimulación a través de CD43 activa la vía de Akt.

A, La fosforilación de Akt en la S⁴⁷³ se evaluó en linfocitos T (5×10^6) estimulados con HSA (10 mg/mL) durante diferentes períodos de tiempo o con el anticuerpo anti-CD43 L10 durante 15 min. B, La gráfica muestra la fosforilación de Akt a los 15 min de estimulación con HSA o L10 en tres experimentos independientes. C, La fosforilación de sustratos de Akt se observó en linfocitos T (5×10^6) estimulados con HSA (10 mg/mL) durante diferentes períodos de tiempo. Los niveles de Akt y de actina se muestran como control de carga. Las imágenes son representativas de tres (A) y dos (B) experimentos. El análisis estadístico se hizo con la prueba de T ($p \leq 0.05$).

VI. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Estudios proteómicos previos han descrito el fosfoproteoma y los perfiles de expresión de proteínas en linfocitos T estimulados a través del TCR y CD28, así como a través del TCR solamente [209-212]. De forma similar a CD28, CD43 activa múltiples vías de señalización que finalmente regulan el destino celular [213]. Para caracterizar con mayor profundidad la participación de CD43 en la activación celular, llevamos a cabo un estudio proteómico en linfocitos T CD4⁺ humanos de sangre periférica estimulados a través del TCR y de CD43. El análisis por 2D-DIGE reveló cambios significativos en la abundancia de 22 spots de proteínas (Fig. 14). Dentro de dichos spots se identificaron 82 proteínas, confirmando la migración conjunta de más de una proteína hacia el mismo spot, un resultado común en los análisis de 2D-DIGE de muestras complejas de este tipo [214, 215]. La clasificación de las proteínas mostró ocho grupos principales de procesos biológicos enriquecidos, entre los cuales destacan “generación de precursores metabólicos y energía” y “regulación de apoptosis” (Fig. 15), sugiriendo una relación entre estas dos funciones, y en concordancia con el hecho de que ya se ha relacionado a CD43 con la regulación de apoptosis [161-165]. Sin embargo, la regulación metabólica no se ha asociado previamente con las funciones de CD43.

Los datos de la proteómica mostraron que las señales co-estimuladoras de CD43 modulan los niveles de expresión de enzimas que participan en diferentes vías del metabolismo de glucosa. Particularmente, se detectaron cambios en piruvato cinasa (PKM2), lactato deshidrogenasa (LDH), ATP sintasa, malato deshidrogenasa, catalasa, aldolasa, enolasa, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y dihidrolipamida S-succiniltransferasa (Fig. 15). El hecho de que cuatro de las 10 enzimas glicolíticas fueran blanco de las señales co-estimuladoras de CD43, sugirió que las señales de CD43 podrían regular la vía glicolítica.

Al evaluar esta posibilidad, observamos que la co-estimulación a través de CD43 solo aumenta moderadamente la actividad glicolítica de la PKM2 [197] y de la lactato deshidrogenasa (Fig. 16), en cambio reportamos la activación de una función alterna de la PKM2 que le confiere propiedades reguladoras de vías de supervivencia [197]. Esta nueva vía de señalización podría activarse de manera simultánea con las vías antes descritas para la molécula CD43 y presenta varios puntos de convergencia con las mismas. El entrecruzamiento de CD43 induce su asociación con las cinasas de la familia de Src: Lck y Fyn, así como la activación de éstas. A través de la activación de estas cinasas, las señales de CD43 promueven, por un lado, la fosforilación en tirosinas de los ITAMs de la cadena CD3 ζ y el ensamblaje de complejos macromoleculares que inducen la activación de las MAPK [Revisado en [123]]. Como consecuencia de la activación de ERK 1/2, Lck se fosforila

en serinas, lo cual inhibe su asociación con la fosfatasa SHP-1 y se activa un loop de retroalimentación positiva para las señales de Lck [176]. En el artículo adjunto reportamos que la fosforilación de PKM2 en la Y¹⁰⁵ que se induce en respuesta a las señales co-estimuladoras de CD43 es dependiente de Lck, y que podría representar un mecanismo responsable de la formación de dímeros que favorecen el metabolismo anabólico y explica el aumento limitado observado en la vía glicolítica. Asimismo, aunque nosotros aun no lo hemos evaluado, cabe la posibilidad de que ERK 1/2 también fosforile a PKM2 en la S³⁷, lo que promovería la translocación de PKM2 al núcleo, donde podría interactuar con β -catenina para inducir la expresión de Myc y regular la expresión de genes como LDH, hexocinasa, fosfofructocinasa, el transportador de glucosa Glut-1, y las proteínas hnRNP A1/A2, responsables de dirigir el splicing alternativo que favorece la expresión de PKM2 [216-220]. En concordancia con estos reportes, nuestros datos de proteómica muestran que las señales co-estimuladoras de CD43 también regulan la abundancia de hnRNPA2 (Anexo 3). Para determinar si el flujo glicolítico limitado que se observa en las células co-estimuladas a través del TCR y CD43 se debe a que la fosforilación de PKM2 favorece vías anabólicas, será necesario evaluar la posibilidad de que diferentes sustratos de la vía glicolítica sean desviados hacia otras vías como la vía de las pentosas fosfato, la cual puede aumentar por efecto de la activación de Myc, implicando a este factor de transcripción en la producción de NADPH y en la síntesis de biomasa [217].

Una vez fosforilada, PKM2 puede unirse y fosforilar al factor de transcripción Stat3, promoviendo la transcripción de genes como MEK5 [221], lo que favorece un incremento en la actividad de la vía de MEK5/ERK5. Aunque nuestros resultados ponen en evidencia la fosforilación de Stat3 en respuesta a las señales co-estimuladoras de CD43, será necesario estudiar la interacción de PKM2 con Stat3 en nuestras células, así como evaluar la activación de la vía de PKM2/Stat3/ERK5 utilizando mutantes de PKM2 que carecen de actividad de cinasa de proteínas. De esta manera podremos determinar si las señales co-estimuladoras de CD43 que llevan a la activación de la vía de ERK5 dependen de esta función de PKM2. La activación de la vía de ERK5, como la de ERK 1/2, regula múltiples blancos que participan en procesos de supervivencia, proliferación, etc. [Revisado en [222]]. Algunas de las proteínas cuya actividad se modula por ERK5 son ciclina D1, CREB, Bad, c-Myc y NF- κ B [Rev. en [213]], quienes a su vez se regulan por otras vías de señalización. De tal forma que el incremento de c-Myc que observamos en linfocitos T co-estimulados a través de TCR+CD43 podría ser una consecuencia tanto de la fosforilación y translocación al núcleo de PKM2 por ERK1/2, así como el resultado de la activación de ERK5 por la vía de ERK1/2 o PKM2/Stat3 como mostramos en este trabajo, e incluso podría ser inducido a través de la vía de Akt, la cual también se activa en respuesta a las señales de CD43.

Se sabe que la activación de NF- κ B en respuesta al estímulo con CD43 depende de la activación de PKC [173]. En este trabajo demostramos que, adicionalmente, es posible activar a NF- κ B por medio de la vía de ERK5 en respuesta al entrecruzamiento de CD43. Cabe la posibilidad de que la activación de PKC favorezca también la activación de ERK5. Asimismo, la activación de PKC y los flujos de calcio inducidos por las señales de CD43, promueven la activación de la adenilato ciclasa (AC), la cual a su vez activa a PKA. A través de la activación de PKA, las señales de CD43 favorecen la actividad del factor de transcripción CREB, el cual al ser fosforilado en la S¹³³, interactúa con sus co-activadores CBP o p300 para activar la transcripción de genes que regulan procesos como proliferación, diferenciación y supervivencia, por mencionar algunos ejemplos [Revisado en [223]]. Más aún, la vía de PKA puede cooperar con la vía de ERK5 para inducir la fosforilación de Bad, una proteína pro-apoptótica que pertenece a la familia de Bcl-2. Cuando Bad se encuentra fosforilado, es secuestrado en el citosol por la proteína 14-3-3, impidiendo su translocación a la mitocondria, donde ejerce su función pro-apoptótica [224]. Aunque no hemos evaluado si las señales de CD43 inducen la asociación de Bad y 14.3.3, datos publicados de nuestro laboratorio [178] indican que las señales de CD43 activan a la proteína 14.3.3. Asimismo, Bad también puede ser fosforilado por Akt [225, 226], de manera que las señales de CD43 podrían regular la supervivencia de las células mediante la activación de tres vías de señalización que comparten blancos importantes como Bad.

Mediante la activación de PKC, el entrecruzamiento de CD43 también induce la fosforilación en serinas de Cbl y previene su ubiquitinación. La inhibición de las E3 ubiquitin ligasas de Cbl resulta en una fosforilación prolongada de tirosinas y una degradación retardada de ZAP-70 y de la cadena ζ que promueve un aumento en la activación de MAPK y una respuesta robusta de los linfocitos T [227]. Como consecuencia, al inducir flujos de calcio y mantener activas las vías de PKC y MAPK, se activan factores de transcripción como NFAT, AP-1 y NF- κ B, que sumados a los que se activan a través de la vía de PKM2/ERK 5 (Stat3, c-Myc y CREB), inducen la transcripción de genes que promueven la proliferación y supervivencia de las células y de esta manera favorecen la respuesta efectora de los linfocitos T. En conjunto, nuestros resultados sugieren que las señales co-estimuladoras de CD43 promueven la activación de múltiples vías de señalización que favorecen tanto la proliferación como la supervivencia de los linfocitos T, posiblemente contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis (Fig. 22).

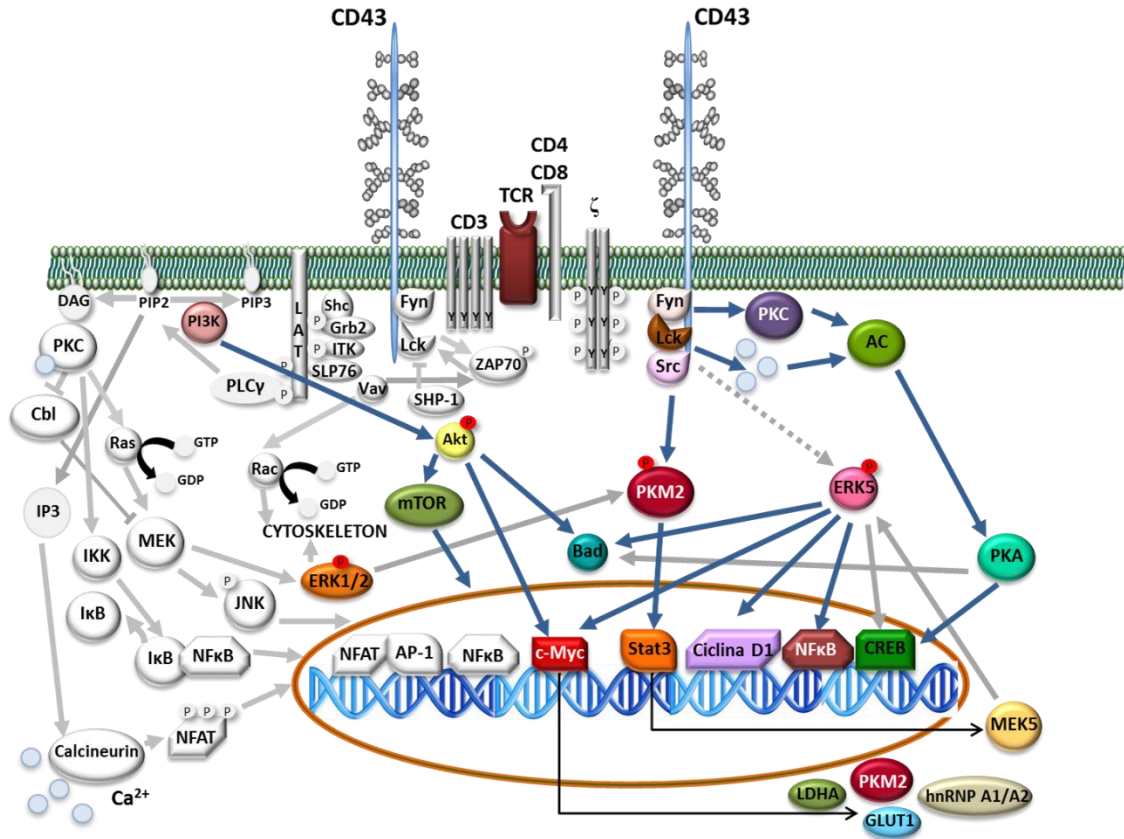


Fig. 22. Vía de señalización de CD43.

En color se muestran las vías de señalización que se describen en este trabajo y su integración con las vías de señalización previamente descritas para CD43 (gris).

La homeostasis de los linfocitos es un proceso biológico complejo: los precursores se producen continuamente y posteriormente pasan por varias etapas de diferenciación hasta lograr su maduración. Durante este proceso son necesarias señales basales que contribuyan a la sobrevivencia de las células y que permitan mantener el repertorio de linfocitos circulantes. Los linfocitos maduros tienen un tiempo de vida relativamente largo, pero la longevidad de cada clona varía de acuerdo a su habilidad para competir por señales que promuevan su viabilidad. Factores extrínsecos que regulan el metabolismo son esenciales para mantener la supervivencia de las células. Cuando las demandas metabólicas no se satisfacen, las funciones celulares se inhiben y la célula puede entrar en apoptosis. Por el contrario, un exceso metabólico puede prevenir la apoptosis, exacerbar la función celular y potencialmente desencadenar enfermedades inflamatorias. Por lo tanto, el control del metabolismo a través de las señales extrínsecas provenientes del TCR, de receptores para citocinas, o de moléculas co-estimuladoras como CD28, por ejemplo,

no sólo promueve la sobrevivencia de los linfocitos T, sino que también garantiza que las células tengan precursores energéticos y biosintéticos apropiados para mantener la homeostasis y la inmunidad [Revisado en [38].

Los linfocitos en reposo dependen de señales extrínsecas para mantener un estado metabólico quiescente. El metabolismo de los linfocitos en reposo está limitado por el microambiente y la disponibilidad de señales tróficas y no por la disponibilidad de nutrientes [Revisado en [38]. La activación de los linfocitos demanda energía y por lo tanto se acompaña de un incremento en el uso de glucosa, el cual es detectable después de una hora de estimulación [27, 31, 228]. En ocasiones, el aumento en el transporte de glucosa se detecta antes de un aumento en la expresión de Glut-1, lo que sugiere que la regulación de la localización intracelular de Glut-1 podría ser responsables de los cambios tempranos en la ingesta de glucosa [22]. De hecho, nuestros resultados muestran que el entrecruzamiento de CD43 induce la translocación del transportador de glucosa Glut-1 hacia la membrana plasmática desde tiempos cortos (una hora), y se mantiene en niveles por encima de los observados en células no estimuladas o activadas a través del TCR y CD28 (Fig. 17 y 18). En linfocitos estimulados a través de CD43, la ingesta de glucosa mostró un incremento del 8% en comparación con las células no estimuladas (Fig. 16), lo que sugiere que, si bien las señales de CD43 inducen cambios moderados en el metabolismo de glucosa, también mantienen niveles de actividad enzimática y consumo de glucosa ligeramente mayores que aquellos de células no estimuladas, que podrían ser suficientes para mantener la viabilidad y la homeostasis de los linfocitos T.

In vivo, los linfocitos T reciben señales extrínsecas que proporcionan a la célula información para la regulación del metabolismo, el estado trófico y la sobrevivencia. Dichas señales extrínsecas provienen del propio TCR, de receptores para citocinas y quimiocinas, así como de moléculas co-estimuladoras que regulan el metabolismo y la sobrevivencia mediante la activación de vías de señalización como la de PI3K/AKT/mTOR [Revisado en [38]]. En este trabajo mostramos que la translocación de Glut-1 en respuesta a las señales de CD43 es dependiente de las vías PI3K/Akt/mTOR (Fig. 19). Asimismo, mostramos que estas cinasas se activan en respuesta a las señales de CD43 (Fig. 21), lo que sugiere que CD43 podría jugar un papel importante en coordinar las señales de activación con las demandas metabólicas de los linfocitos T. Será interesante evaluar si el aumento moderado en la ingesta de glucosa observado en células estimuladas a través de CD43 es dependiente de la vía de PI3K/Akt/mTOR y si esta vía regula también la activación de blancos de la vía de ERK5 como c-Myc y Bad, que favorecen la sobrevivencia.

Cuando la célula no recibe señales extrínsecas suficientes para favorecer el metabolismo, la incapacidad de mantener el metabolismo para cumplir con las demandas celulares

induce la activación de vías de respuesta a estrés, algunas de las cuales llevan a la activación de las proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2. La proteína pro-apoptótica Bim juega un papel esencial en la eliminación de timocitos y linfocitos B autorreactivos, así como durante la contracción de la respuesta y en la muerte inducida por la escasez de factores de crecimiento. Sin embargo, a pesar de la inducción de Bim, la expresión de Glut-1 puede proteger a las células de sufrir apoptosis por privación de factores de crecimiento [Revisado en [38]]. Los datos preliminares que mostramos indican que en presencia de albúmina sérica humana (HSA), uno de los ligandos de CD43, las células tienen mayor viabilidad después de permanecer en cultivo en presencia o ausencia de PMA/ionomicina, comparado con células cultivadas sin HSA (Fig. 20), lo que sugiere que, en la circulación, la estimulación tónica de los linfocitos T a través de la interacción de CD43 con la albúmina de la sangre, podría proveer señales basales de supervivencia para los linfocitos en reposo o activados. En un futuro, será necesario evaluar el balance de proteínas pro y anti-apoptóticas en células estimuladas a través de CD43, ya sea mediante el uso de anticuerpos, o con HSA, en conjunto con un estímulo fuerte como PMA/ionomicina. Ante un estímulo, las señales de CD43 podrían favorecer la viabilidad de las células previniendo la muerte autónoma de células activadas (ACAD, del inglés Activated T Cell Autonomous Death), posiblemente al promover la estabilidad de proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2 como Mcl-1, así como la inactivación de proteínas pro-apoptóticas como Bad [Revisado en [229]].

El incremento en la supervivencia en respuesta a las señales de CD43 cobra importancia no solo durante el desarrollo de una respuesta inmune, donde sería interesante distinguir si las células que sobreviven se diferenciarán en el futuro hacia células de memoria, sino también en el contexto de enfermedades autoinmunes y cáncer. La expresión de CD43 se ha descrito en varios tipos de linfomas [Revisado en [123]], así como en células tumorales de origen no linfóide [Revisado en [150]]. En un linfoma de células B, la expresión de CD43 promovió la supervivencia y la proliferación de las células tumorales [165]. De hecho, dado que la expresión de CD43 en linfocitos B está limitada a etapas tempranas del desarrollo o durante la activación de linfocitos B, la expresión de CD43 en linfomas de células B representa un mal pronóstico para el curso de la enfermedad [230, 231]. Se sabe que la sobreexpresión de CD43 en tumores de origen no hematopoyético que son deficientes de los genes supresores de tumores p53 y ARF protege a las células de muerte inducida por FAS [232]. Resultará interesante evaluar la supervivencia en otras líneas celulares que expresan CD43, así como en líneas en las que esta molécula ha sido silenciada o cuya región intracelular ha sido eliminada. Por lo tanto, comprender los mecanismos de señalización de CD43, y en este caso la activación de funciones alternas de PKM2 en respuesta a las señales de CD43, resultan relevantes para la identificación de blancos terapéuticos en el tratamiento de diferentes tumores. Finalmente, será interesante

evaluar los niveles de expresión de CD43 en linfocitos senescentes (CD28 -) que, entre otros aspectos, se caracterizan por aumentar la producción de citocinas pro-inflamatorias [Revisado en [233]], y por lo tanto se han relacionado con la aparición de padecimientos autoinmunes [234-237] y con una resistencia a sufrir apoptosis [238]. Cabe la posibilidad de que la resistencia a apoptosis y la co-estimulación que llevan a estas células a producir citocinas pro-inflamatorias, responsables de propagar el daño en enfermedades autoinmunes, surja como consecuencia de las señales generadas por CD43, la cual se expresa en niveles elevados en linfocitos senescentes [Revisado en [239]].

VII. CONCLUSIÓN

CONCLUSIÓN

La regulación del metabolismo no sólo modula la activación y la respuesta efectora, sino que también determina el tiempo de vida de los linfocitos. A lo largo de la vida de los linfocitos, la susceptibilidad de estas células para morir por apoptosis varía de acuerdo a su estadio de desarrollo, así como a las señales que reciben a través de receptores en la membrana que funcionan como sensores del medio que las rodea. Entre estas señales destacan las generadas por moléculas co-estimuladoras.

En este trabajo mostramos que las señales co-estimuladoras de CD43, en conjunto con las del TCR, regulan la expresión de múltiples proteínas involucradas en diferentes funciones biológicas. El estudio proteómico señaló cambios en la abundancia de proteínas metabólicas en respuesta al entrecruzamiento del TCR y CD43, una función que hasta el momento era desconocida para CD43. Aunque la regulación del metabolismo de glucosa fue moderada, se detectó un aumento en la translocación hacia la superficie celular del transportador de glucosa Glut-1 de manera dependiente de las vías de Akt y mTOR. En congruencia con estos datos, el tratamiento de los linfocitos con HSA, uno de los ligandos naturales de CD43 que se encuentra en altas concentraciones en la sangre, también indujo la activación de la vía de Akt y mTOR, así como un aumento en la viabilidad celular. Asimismo, la sola expresión de CD43 en células del hibridoma murino BY 155.16 redujo el número de células muertas en respuesta a diferentes estímulos de activación, y para ello requiere de la región intracelular. Estos datos sugieren que las señales de CD43 podrían proveer a los linfocitos de un nivel metabólico basal que les permita mantener su viabilidad durante etapas de quiescencia, así como prepararlos para el aumento en la tasa anabólica que surge como consecuencia de la activación.

Además de la activación de las vías de Akt y mTOR, en este trabajo también describimos la inducción de nuevas vías de señalización en respuesta a las señales del TCR y CD43. La regulación moderada que se observó en la actividad glicolítica de la PKM2 se debe a que las señales de CD43, en conjunto con las del TCR, promueven una función alterna de esta enzima que le confiere propiedades como cinasa de proteínas cuando es fosforilada en la Y¹⁰⁵. En consecuencia, se indujo la activación de Stat3 y de la MAP cinasa ERK5, teniendo como blancos importantes para la regulación de la sobrevivencia a proteínas como CREB y Bad. En conjunto, nuestros resultados recalcan la importancia de las señales co-estimuladoras de CD43 en la regulación de la sobrevivencia por medio de la modulación de la actividad de proteínas metabólicas. Este punto cobra mayor importancia en el desarrollo de enfermedades autoinmunes o cáncer, donde modular la respuesta inmune se vuelve un elemento esencial para la elaboración de nuevas drogas y el diseño de nuevos tratamientos.

VIII. REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Abbas , L.A., Pober JS, *Inmunología Celular y Molecular*. 4a ed. 2002, España: McGraw-Hill.
2. Thaïss, C.A., et al., *Integration of Innate Immune Signaling*. Trends Immunol, 2016. **37**(2): p. 84-101.
3. Kindt TJ, G.R., Osborne BA, *Kuby Immunology*. 7th ed. 2007, USA: W. H. Freeman and Company.
4. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, *Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System*. Science, 2002. **296**(5566): p. 298-300.
5. Netea, M.G., et al., *Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense*. Nat Immunol, 2015. **16**(7): p. 675-679.
6. Valles, P.G., et al., *Acute kidney injury: what part do toll-like receptors play?* Int J Nephrol Renovasc Dis, 2014. **7**: p. 241-51.
7. Janeway CA Jr, T.P., Walport M, et al. , *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. . 5th edition ed. 2001, New York: Garland Science.
8. Weaver, C.T., et al., *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 677-88.
9. Reiner, S.L., *Development in motion: helper T cells at work*. Cell, 2007. **129**(1): p. 33-6.
10. Schmitt, E., M. Klein, and T. Bopp, *Th9 cells, new players in adaptive immunity*. Trends Immunol, 2014. **35**(2): p. 61-8.
11. Dong, C.a.M.G., *T cells: the usual subsets*, in *Nature Reviews Immunology*. 2010, Nature Publishing Group.
12. O'Shea, J.J. and W.E. Paul, *Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells*. Science, 2010. **327**(5969): p. 1098-102.
13. Turner, S.J., et al., *Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(12): p. 883-94.
14. Sharpe, M. and N. Mount, *Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges*. Disease Models and Mechanisms, 2015. **8**(4): p. 337-350.
15. Fox, C.J., P.S. Hammerman, and C.B. Thompson, *Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(11): p. 844-52.
16. Zheng, Y., et al., *Anergic T cells are metabolically anergic*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6095-101.
17. Frauwirth, K.A., et al., *The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 769-77.
18. Rathmell, J.C., et al., *In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 683-92.
19. Harris, T.E. and J.C. Lawrence, Jr., *TOR signaling*. Sci STKE, 2003. **2003**(212): p. re15.
20. Portilla, D. and M.D. Okusa, *T cells and T-cell receptors in acute renal failure*. Kidney Int, 2006. **69**(2): p. 208-10.
21. Wahl, D.R., et al., *Distinct metabolic programs in activated T cells: opportunities for selective immunomodulation*. Immunol Rev, 2012. **249**(1): p. 104-15.
22. Frauwirth, K.A. and C.B. Thompson, *Regulation of T lymphocyte metabolism*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4661-5.
23. Gatenby, R.A. and R.J. Gillies, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(11): p. 891-9.
24. Tamada, M., M. Suematsu, and H. Saya, *Pyruvate kinase M2: multiple faces for conferring benefits on cancer cells*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(20): p. 5554-61.

25. MacIver, N.J., R.D. Michalek, and J.C. Rathmell, *Metabolic regulation of T lymphocytes*. *Annu Rev Immunol*, 2013. **31**: p. 259-83.
26. Yewdell, J.W., *Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing*. *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(7): p. 294-7.
27. Hume, D.A., et al., *Aerobic glycolysis and lymphocyte transformation*. *Biochem J*, 1978. **174**(3): p. 703-9.
28. Tollefsbol, T.O. and H.J. Cohen, *Culture kinetics of glycolytic enzyme induction, glucose utilization, and thymidine incorporation of extended-exposure phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes*. *J Cell Physiol*, 1985. **122**(1): p. 98-104.
29. Rathmell, J.C., et al., *IL-7 enhances the survival and maintains the size of naive T cells*. *J Immunol*, 2001. **167**(12): p. 6869-76.
30. Bauer, D.E., et al., *Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand*. *Faseb j*, 2004. **18**(11): p. 1303-5.
31. Sagone, A.L., Jr., A.F. LoBuglio, and S.P. Balcerzak, *Alterations in hexose monophosphate shunt during lymphoblastic transformation*. *Cell Immunol*, 1974. **14**(3): p. 443-52.
32. Tuosto, L., et al., *Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(2): p. 345-9.
33. Annunziato, F. and S. Romagnani, *Heterogeneity of human effector CD4+ T cells*. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(6): p. 257.
34. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. *Cell*, 2008. **133**(5): p. 775-87.
35. Shi, L.Z., et al., *HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells*. *J Exp Med*, 2011. **208**(7): p. 1367-76.
36. Michalek, R.D., et al., *Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets*. *J Immunol*, 2011. **186**(6): p. 3299-303.
37. Cao, Y., J.C. Rathmell, and A.N. Macintyre, *Metabolic reprogramming towards aerobic glycolysis correlates with greater proliferative ability and resistance to metabolic inhibition in CD8 versus CD4 T cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(8): p. e104104.
38. Michalek, R.D. and J.C. Rathmell, *The metabolic life and times of a T-cell*. *Immunol Rev*, 2010. **236**: p. 190-202.
39. Gerriets, V.A. and J.C. Rathmell, *Metabolic pathways in T cell fate and function*. *Trends Immunol*, 2012. **33**(4): p. 168-73.
40. Wang, Y., et al., *Histone Deacetylase SIRT1 Negatively Regulates the Differentiation of Interleukin-9-Producing CD4(+) T Cells*. *Immunity*, 2016. **44**(6): p. 1337-49.
41. Ray, J.P., et al., *The Interleukin-2-mTORc1 Kinase Axis Defines the Signaling, Differentiation, and Metabolism of T Helper 1 and Follicular B Helper T Cells*. *Immunity*, 2015. **43**(4): p. 690-702.
42. August, A. and B. Dupont, *CD28 of T lymphocytes associates with phosphatidylinositol 3-kinase*. *Int Immunol*, 1994. **6**(5): p. 769-74.
43. Chuang, E., et al., *Regulation of cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 by Src kinases*. *J Immunol*, 1999. **162**(3): p. 1270-7.
44. Pages, F., et al., *Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling*. *Nature*, 1994. **369**(6478): p. 327-9.
45. Prasad, K.V., et al., *T-cell antigen CD28 interacts with the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase by a cytoplasmic Tyr(P)-Met-Xaa-Met motif*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(7): p. 2834-8.

46. Truitt, K.E., C.M. Hicks, and J.B. Imboden, *Stimulation of CD28 triggers an association between CD28 and phosphatidylinositol 3-kinase in Jurkat T cells.* J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 1071-6.
47. Boomer, J.S. and J.M. Green, *An enigmatic tail of CD28 signaling.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(8): p. a002436.
48. Raab, M., et al., *p56Lck and p59Fyn regulate CD28 binding to phosphatidylinositol 3-kinase, growth factor receptor-bound protein GRB-2, and T cell-specific protein-tyrosine kinase ITK: implications for T-cell costimulation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(19): p. 8891-5.
49. Jones, R.G. and C.B. Thompson, *Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation.* Immunity, 2007. **27**(2): p. 173-8.
50. Zheng, Y., et al., *A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy.* J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2163-70.
51. Rathmell, J.C., et al., *Activated Akt promotes increased resting T cell size, CD28-independent T cell growth, and development of autoimmunity and lymphoma.* Eur J Immunol, 2003. **33**(8): p. 2223-32.
52. Kohn, A.D., et al., *Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation.* J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31372-8.
53. Barthel, A., et al., *Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1.* J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20281-6.
54. Rathmell, J.C., et al., *Akt-directed glucose metabolism can prevent Bax conformation change and promote growth factor-independent survival.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(20): p. 7315-28.
55. Taha, C., et al., *Opposite translational control of GLUT1 and GLUT4 glucose transporter mRNAs in response to insulin. Role of mammalian target of rapamycin, protein kinase b, and phosphatidylinositol 3-kinase in GLUT1 mRNA translation.* J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 33085-91.
56. Ueki, K., et al., *Potential role of protein kinase B in insulin-induced glucose transport, glycogen synthesis, and protein synthesis.* J Biol Chem, 1998. **273**(9): p. 5315-22.
57. Deprez, J., et al., *Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades.* J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17269-75.
58. Neary, C.L. and J.G. Pastorino, *Akt inhibition promotes hexokinase 2 redistribution and glucose uptake in cancer cells.* J Cell Physiol, 2013. **228**(9): p. 1943-8.
59. Zhao, Y., et al., *Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(12): p. 4328-39.
60. Macian, F., *NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function.* Nat Rev Immunol, 2005. **5**(6): p. 472-84.
61. Maurer, U., et al., *Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1.* Mol Cell, 2006. **21**(6): p. 749-60.
62. Schmelzle, T. and M.N. Hall, *TOR, a central controller of cell growth.* Cell, 2000. **103**(2): p. 253-62.
63. Edinger, A.L. and C.B. Thompson, *Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake.* Mol Biol Cell, 2002. **13**(7): p. 2276-88.

64. Chen, C., et al., *TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species*. J Exp Med, 2008. **205**(10): p. 2397-408.
65. Plas, D.R. and C.B. Thompson, *Akt activation promotes degradation of tuberin and FOXO3a via the proteasome*. J Biol Chem, 2003. **278**(14): p. 12361-6.
66. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling in growth control and disease*. Cell, 2012. **149**(2): p. 274-93.
67. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *mTOR signaling at a glance*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 20): p. 3589-94.
68. Xu, X., et al., *mTOR, linking metabolism and immunity*. Semin Immunol, 2012. **24**(6): p. 429-35.
69. Pellegrini, M., et al., *Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 14175-80.
70. Hildeman, D.A., et al., *Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 759-67.
71. Kaech, S.M., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(4): p. 251-62.
72. D'Cruz, L.M., M.P. Rubinstein, and A.W. Goldrath, *Surviving the crash: transitioning from effector to memory CD8+ T cell*. Semin Immunol, 2009. **21**(2): p. 92-8.
73. Wherry, E.J. and R. Ahmed, *Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5535-45.
74. Amsen, D., R.A. Backer, and C. Helbig, *Decisions on the road to memory*. Adv Exp Med Biol, 2013. **785**: p. 107-20.
75. Alves, N.L., et al., *The Noxa/Mcl-1 axis regulates susceptibility to apoptosis under glucose limitation in dividing T cells*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 703-16.
76. Chi, M.M., et al., *Decreased glucose transporter expression triggers BAX-dependent apoptosis in the murine blastocyst*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 40252-7.
77. Vander Heiden, M.G., et al., *Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(17): p. 5899-912.
78. Shahinian, A., et al., *Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice*. Science, 1993. **261**(5121): p. 609-12.
79. Remold-O'Donnell, E., et al., *Expression on blood cells of sialophorin, the surface glycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome*. Blood, 1987. **70**(1): p. 104-9.
80. Remold-O'Donnell, E. and F.S. Rosen, *Sialophorin (CD43) and the Wiskott-Aldrich syndrome*. Immunodef Rev, 1990. **2**(2): p. 151-74.
81. Cyster, J.G., D.M. Shotton, and A.F. Williams, *The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation*. Embo j, 1991. **10**(4): p. 893-902.
82. Van den Steen, P., et al., *Cytokine and protease glycosylation as a regulatory mechanism in inflammation and autoimmunity*. Adv Exp Med Biol, 1998. **435**: p. 133-43.
83. Shelley, C.S., et al., *Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(8): p. 2819-23.
84. Pallant, A., et al., *Characterization of cDNAs encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(4): p. 1328-32.

85. Shelley, C.S., et al., *Structure of the human sialophorin (CD43) gene. Identification of features atypical of genes encoding integral membrane proteins.* Biochem J, 1990. **270**(3): p. 569-76.
86. Kudo, S. and M. Fukuda, *A short, novel promoter sequence confers the expression of human leukosialin, a major sialoglycoprotein on leukocytes.* J Biol Chem, 1991. **266**(13): p. 8483-9.
87. Kudo, S. and M. Fukuda, *Tissue-specific transcriptional regulation of human leukosialin (CD43) gene is achieved by DNA methylation.* J Biol Chem, 1995. **270**(22): p. 13298-302.
88. Farokhzad, O.C., et al., *CD43 gene expression is mediated by a nuclear factor which binds pyrimidine-rich single-stranded DNA.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(11): p. 2256-67.
89. Da Silva, N., A. Bharti, and C.S. Shelley, *hnRNP-K and Pur(alpha) act together to repress the transcriptional activity of the CD43 gene promoter.* Blood, 2002. **100**(10): p. 3536-44.
90. Remold-O'Donnell, E., et al., *Purification and chemical composition of gpL115, the human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome.* J Biol Chem, 1986. **261**(16): p. 7526-30.
91. Cyster, J., et al., *Protein sequence and gene structure for mouse leukosialin (CD43), a T lymphocyte mucin without introns in the coding sequence.* Eur J Immunol, 1990. **20**(4): p. 875-81.
92. Fukuda, M., *Leukosialin, a major sialoglycoprotein defining leucocyte differentiation.* Ciba Found Symp, 1989. **145**: p. 257-68; discussion 268-76.
93. Piller, F., et al., *Human T-lymphocyte activation is associated with changes in O-glycan biosynthesis.* J Biol Chem, 1988. **263**(29): p. 15146-50.
94. Onami, T.M., et al., *Dynamic regulation of T cell immunity by CD43.* J Immunol, 2002. **168**(12): p. 6022-31.
95. Jones, A.T., et al., *Characterization of the activation-associated isoform of CD43 on murine T lymphocytes.* J Immunol, 1994. **153**(8): p. 3426-39.
96. Ellies, L.G., et al., *The CD43 130-kD peripheral T-cell activation antigen is downregulated in thymic positive selection.* Blood, 1996. **88**(5): p. 1725-32.
97. Stone, E.L., et al., *Characterization of mice with targeted deletion of the gene encoding core 2 beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase-2.* Methods Enzymol, 2010. **479**: p. 155-72.
98. Kishimoto, H. and J. Sprent, *Several different cell surface molecules control negative selection of medullary thymocytes.* J Exp Med, 1999. **190**(1): p. 65-73.
99. Higgins, E.A., et al., *Aberrant O-linked oligosaccharide biosynthesis in lymphocytes and platelets from patients with the Wiskott-Aldrich syndrome.* J Biol Chem, 1991. **266**(10): p. 6280-90.
100. Ellies, L.G., et al., *Differential regulation of CD43 glycoforms on CD4+ and CD8+ T lymphocytes in graft-versus-host disease.* Glycobiology, 1994. **4**(6): p. 885-93.
101. Tsuboi, S. and M. Fukuda, *Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses.* Bioessays, 2001. **23**(1): p. 46-53.
102. Mukasa, R., et al., *Core 2-containing O-glycans on CD43 are preferentially expressed in the memory subset of human CD4 T cells.* Int Immunol, 1999. **11**(2): p. 259-68.
103. Hernandez, J.D., et al., *Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death.* J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5328-36.
104. Remold-O'Donnell, E. and D. Parent, *Downregulation of neutrophil CD43 by opsonized zymosan.* Blood, 1995. **85**(2): p. 337-42.

105. Bazil, V. and J.L. Strominger, *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, 1993. **90**(9): p. 3792-6.
106. Amano, J., C. Morimoto, and T. Irimura, *Intestinal epithelial cells express and secrete the CD43 glycoform that contains core 2 O-glycans*. Microbes Infect, 2001. **3**(9): p. 723-8.
107. Allenspach, E.J., et al., *ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse*. Immunity, 2001. **15**(5): p. 739-50.
108. Delon, J., K. Kaibuchi, and R.N. Germain, *Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin*. Immunity, 2001. **15**(5): p. 691-701.
109. Lopez, S., et al., *CD43 (sialophorin, leukosialin) shedding is an initial event during neutrophil migration, which could be closely related to the spreading of adherent cells*. Cell Adhes Commun, 1998. **5**(2): p. 151-60.
110. Seo, W. and H.J. Ziltener, *CD43 processing and nuclear translocation of CD43 cytoplasmic tail are required for cell homeostasis*. Blood, 2009. **114**(17): p. 3567-77.
111. Andersson, C.X., et al., *CD43 has a functional NLS, interacts with beta-catenin, and affects gene expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **316**(1): p. 12-7.
112. Campanero, M.R., et al., *Down-regulation by tumor necrosis factor-alpha of neutrophil cell surface expression of the sialophorin CD43 and the hyaluronate receptor CD44 through a proteolytic mechanism*. Eur J Immunol, 1991. **21**(12): p. 3045-8.
113. Remold-O'Donnell, E. and D. Parent, *Two proteolytic pathways for down-regulation of the barrier molecule CD43 of human neutrophils*. J Immunol, 1994. **152**(7): p. 3595-605.
114. Kuijpers, T.W., et al., *Cross-linking of sialophorin (CD43) induces neutrophil aggregation in a CD18-dependent and a CD18-independent way*. J Immunol, 1992. **149**(3): p. 998-1003.
115. Rieu, P., et al., *Human neutrophils release their major membrane sialoprotein, leukosialin (CD43), during cell activation*. Eur J Immunol, 1992. **22**(11): p. 3021-6.
116. Remold-O'Donnell, E. and D. Parent, *Specific sensitivity of CD43 to neutrophil elastase*. Blood, 1995. **86**(6): p. 2395-402.
117. Andersson, C.X., et al., *Shedding and gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis of the mucin-type molecule CD43*. Biochem J, 2005. **387**(Pt 2): p. 377-84.
118. Schmid, K., et al., *Amino acid sequence of human plasma galactoglycoprotein: identity with the extracellular region of CD43 (sialophorin)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(2): p. 663-7.
119. Roumier, A., et al., *The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation*. Immunity, 2001. **15**(5): p. 715-28.
120. del Pozo, M.A., et al., *Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway*. J Cell Biol, 1995. **131**(2): p. 495-508.
121. Sanchez-Mateos, P., et al., *Regulatory role of CD43 leukosialin on integrin-mediated T-cell adhesion to endothelial and extracellular matrix ligands and its polar redistribution to a cellular uropod*. Blood, 1995. **86**(6): p. 2228-39.
122. Nieto, M., M.A. del Pozo, and F. Sanchez-Madrid, *Interleukin-15 induces adhesion receptor redistribution in T lymphocytes*. Eur J Immunol, 1996. **26**(6): p. 1302-7.
123. Bravo-Adame, M., et al., *CD43*, in *Encyclopedia of Signaling Molecules*, S. Choi, Editor. 2012, Springer New York. p. 320-328.
124. Fratazzi, C., et al., *A macrophage invasion mechanism for mycobacteria implicating the extracellular domain of CD43*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 183-92.

125. Hickey, T.B., et al., *Mycobacterium tuberculosis employs Cpn60.2 as an adhesin that binds CD43 on the macrophage surface*. Cell Microbiol, 2010. **12**(11): p. 1634-47.
126. Abramson, J.S. and H.R. Hudnор, *Role of the sialophorin (CD43) receptor in mediating influenza A virus-induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction*. Blood, 1995. **85**(6): p. 1615-9.
127. Rothwell, S.W. and D.G. Wright, *Characterization of influenza A virus binding sites on human neutrophils*. J Immunol, 1994. **152**(5): p. 2358-67.
128. Todeschini, A.R., et al., *Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal trans-sialidase: involvement of CD43 signaling*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 5192-8.
129. Ruhl, S., J.O. Cisar, and A.L. Sandberg, *Identification of polymorphonuclear leukocyte and HL-60 cell receptors for adhesins of Streptococcus gordonii and Actinomyces naeslundii*. Infect Immun, 2000. **68**(11): p. 6346-54.
130. Szabady, R.L., et al., *Modulation of neutrophil function by a secreted mucinase of Escherichia coli O157:H7*. PLoS Pathog, 2009. **5**(2): p. e1000320.
131. Springer, T.A., et al., *The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2, and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system*. Annu Rev Immunol, 1987. **5**: p. 223-52.
132. Diamond, M.S., et al., *ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18)*. J Cell Biol, 1990. **111**(6 Pt 2): p. 3129-39.
133. Larson, R.S. and T.A. Springer, *Structure and function of leukocyte integrins*. Immunol Rev, 1990. **114**: p. 181-217.
134. Rosenstein, Y., et al., *CD43, a molecule defective in Wiskott-Aldrich syndrome, binds ICAM-1*. Nature, 1991. **354**(6350): p. 233-5.
135. Perillo, N.L., et al., *Apoptosis of T cells mediated by galectin-1*. Nature, 1995. **378**(6558): p. 736-9.
136. Perillo, N.L., et al., *Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes*. J Exp Med, 1997. **185**(10): p. 1851-8.
137. Rabinovich, G.A., et al., *Specific inhibition of lymphocyte proliferation and induction of apoptosis by CLL-1, a beta-galactoside-binding lectin*. J Biochem, 1997. **122**(2): p. 365-73.
138. Stillman, B.N., et al., *Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death*. J Immunol, 2006. **176**(2): p. 778-89.
139. Baum, L.G., et al., *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, 1995. **181**(3): p. 877-87.
140. Chung, C.D., et al., *Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 3722-9.
141. Ford, M.L., et al., *CD43 modulates severity and onset of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6527-33.
142. Fulcher, J.A., et al., *Galectin-1 co-clusters CD43/CD45 on dendritic cells and induces cell activation and migration through Syk and protein kinase C signaling*. J Biol Chem, 2009. **284**(39): p. 26860-70.
143. Thiemann, S., et al., *Galectin-1 regulates tissue exit of specific dendritic cell populations*. J Biol Chem, 2015. **290**(37): p. 22662-77.
144. Auvynet, C., et al., *Galectin-1 promotes human neutrophil migration*. Glycobiology, 2013. **23**(1): p. 32-42.
145. Stockl, J., et al., *Leukosialin (CD43)-major histocompatibility class I molecule interactions involved in spontaneous T cell conjugate formation*. J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 1769-79.
146. Nathan, C., et al., *Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43 (sialophorin, leukosialin)*. J Cell Biol, 1993. **122**(1): p. 243-56.

147. Matsumoto, M., et al., *CD43 functions as a ligand for E-Selectin on activated T cells*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8042-50.
148. van den Berg, T.K., et al., *Cutting edge: CD43 functions as a T cell counterreceptor for the macrophage adhesion receptor sialoadhesin (Siglec-1)*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3637-40.
149. Hirano, K., et al., *A multifunctional shuttling protein nucleolin is a macrophage receptor for apoptotic cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(47): p. 39284-93.
150. Aguilar-Delfin I, F.N., Rosenstein Y *CD43*. 2006.
151. Ardman, B., et al., *Human immunodeficiency virus type 1-infected individuals make autoantibodies that bind to CD43 on normal thymic lymphocytes*. J Exp Med, 1990. **172**(4): p. 1151-8.
152. Cyster, J.G. and A.F. Williams, *The importance of cross-linking in the homotypic aggregation of lymphocytes induced by anti-leukosialin (CD43) antibodies*. Eur J Immunol, 1992. **22**(10): p. 2565-72.
153. de Smet, W., H. Walter, and L. van Hove, *A new CD43 monoclonal antibody induces homotypic aggregation of human leucocytes through a CD11a/CD18-dependent and -independent mechanism*. Immunology, 1993. **79**(1): p. 46-54.
154. Layseca-Espinosa, E., et al., *T cell aggregation induced through CD43: intracellular signals and inhibition by the immunomodulatory drug leflunomide*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(6): p. 1083-93.
155. Woodman, R.C., et al., *The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice*. J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 2181-6.
156. Stockton, B.M., et al., *Negative regulation of T cell homing by CD43*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 373-81.
157. Ford, M.L. and B.D. Evavold, *Modulation of MOG 37-50-specific CD8+ T cell activation and expansion by CD43*. Cell Immunol, 2006. **240**(1): p. 53-61.
158. McEvoy, L.M., et al., *Anti-CD43 inhibition of T cell homing*. J Exp Med, 1997. **185**(8): p. 1493-8.
159. Bazil, V., et al., *A monoclonal antibody recognizing CD43 (leukosialin) initiates apoptosis of human hematopoietic progenitor cells but not stem cells*. Blood, 1996. **87**(4): p. 1272-81.
160. Moore, T., et al., *Expression of CD43 on murine and human pluripotent hematopoietic stem cells*. J Immunol, 1994. **153**(11): p. 4978-87.
161. Bazil, V., et al., *Apoptosis of human hematopoietic progenitor cells induced by crosslinking of surface CD43, the major sialoglycoprotein of leukocytes*. Blood, 1995. **86**(2): p. 502-11.
162. Brown, T.J., et al., *Characterization of a CD43/leukosialin-mediated pathway for inducing apoptosis in human T-lymphoblastoid cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27686-95.
163. Dragone, L.L., et al., *Disregulation of leukosialin (CD43, Ly48, sialophorin) expression in the B-cell lineage of transgenic mice increases splenic B-cell number and survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(2): p. 626-30.
164. Ostberg, J.R., et al., *Disregulated expression of CD43 (leukosialin, sialophorin) in the B cell lineage leads to immunodeficiency*. J Immunol, 1996. **157**(11): p. 4876-84.
165. Misawa, Y., et al., *CD43 expression in a B cell lymphoma, WEHI 231, reduces susceptibility to G1 arrest and extends survival in culture upon serum depletion*. Eur J Immunol, 1996. **26**(11): p. 2573-81.
166. Galindo-Albarran, A.O., et al., *CD43 signals prepare human T cells to receive cytokine differentiation signals*. J Cell Physiol, 2014. **229**(2): p. 172-80.
167. Park, J.K., et al., *Enhancement of T-cell activation by the CD43 molecule whose expression is defective in Wiskott-Aldrich syndrome*. Nature, 1991. **350**(6320): p. 706-9.

168. Thurman, E.C., et al., *Regulation of in vitro and in vivo T cell activation by CD43*. Int Immunol, 1998. **10**(5): p. 691-701.
169. Sperling, A.I., et al., *CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28*. J Exp Med, 1995. **182**(1): p. 139-46.
170. Pedraza-Alva, G., et al., *CD43-specific activation of T cells induces association of CD43 to Fyn kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27564-8.
171. Yonemura, S., et al., *Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2*. J Cell Biol, 1998. **140**(4): p. 885-95.
172. Silverman, L.B., et al., *Mechanism of mononuclear cell activation by an anti-CD43 (sialophorin) agonistic antibody*. J Immunol, 1989. **142**(12): p. 4194-200.
173. del Rio, R., et al., *PKCtheta is required for the activation of human T lymphocytes induced by CD43 engagement*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **325**(1): p. 133-43.
174. Cruz-Munoz, M.E., et al., *The CD43 coreceptor molecule recruits the zeta-chain as part of its signaling pathway*. J Immunol, 2003. **171**(4): p. 1901-8.
175. Pedraza-Alva, G., et al., *T cell activation through the CD43 molecule leads to Vav tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase pathway activation*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14218-24.
176. Fierro, N.A., G. Pedraza-Alva, and Y. Rosenstein, *TCR-dependent cell response is modulated by the timing of CD43 engagement*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7346-53.
177. Santana, M.A., et al., *CD43-mediated signals induce DNA binding activity of AP-1, NF-AT, and NFkappa B transcription factors in human T lymphocytes*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 31460-8.
178. Pedraza-Alva, G., et al., *Regulation of Cbl molecular interactions by the co-receptor molecule CD43 in human T cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(1): p. 729-37.
179. Mattioli, I., et al., *Comparative analysis of T-cell costimulation and CD43 activation reveals novel signaling pathways and target genes*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3302-4.
180. Cooper, M.D., et al., *Wiskott-Aldrich syndrome. An immunologic deficiency disease involving the afferent limb of immunity*. Am J Med, 1968. **44**(4): p. 499-513.
181. Kenney, D., et al., *Morphological abnormalities in the lymphocytes of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome*. Blood, 1986. **68**(6): p. 1329-32.
182. Lum, L.G., et al., *Splenectomy in the management of the thrombocytopenia of the Wiskott-Aldrich syndrome*. N Engl J Med, 1980. **302**(16): p. 892-6.
183. Jin, Y., et al., *Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation*. Blood, 2004. **104**(13): p. 4010-9.
184. Barat, C. and M.J. Tremblay, *Engagement of CD43 enhances human immunodeficiency virus type 1 transcriptional activity and virus production that is induced upon TCR/CD3 stimulation*. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 28714-24.
185. Hartshorn, K.L. and M.R. White, *Influenza A virus up-regulates neutrophil adhesion molecules and adhesion to biological surfaces*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(5): p. 614-22.
186. Campo, M., et al., *Common polymorphisms in the CD43 gene region are associated with tuberculosis disease and mortality*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2015. **52**(3): p. 342-8.
187. Humbria, A., et al., *Expression of L-selectin, CD43, and CD44 in synovial fluid neutrophils from patients with inflammatory joint diseases. Evidence for a soluble form of L-selectin in synovial fluid*. Arthritis Rheum, 1994. **37**(3): p. 342-8.
188. Sakkas, L.I., et al., *T cells and T-cell cytokine transcripts in the synovial membrane in patients with osteoarthritis*. Clin Diagn Lab Immunol, 1998. **5**(4): p. 430-7.

189. Montiel, J.L., et al., *Anti-CD43 and anti-galectin-1 autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus*. Scand J Rheumatol, 2010. **39**(1): p. 50-7.
190. Ma, X.B., et al., *CD43 expression in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: CD43 is a marker of adverse prognosis*. Hum Pathol, 2015. **46**(4): p. 593-9.
191. Murakami, Y.I., et al., *c-Maf expression in angioimmunoblastic T-cell lymphoma*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(11): p. 1695-702.
192. Kadaja, L., S. Laos, and T. Maimets, *Overexpression of leukocyte marker CD43 causes activation of the tumor suppressor proteins p53 and ARF*. Oncogene, 2004. **23**(14): p. 2523-30.
193. Fu, Q., et al., *Intracellular patterns of sialophorin expression define a new molecular classification of breast cancer and represent new targets for therapy*. Br J Cancer, 2014. **110**(1): p. 146-55.
194. Fu, Q., et al., *CD43 in the nucleus and cytoplasm of lung cancer is a potential therapeutic target*. Int J Cancer, 2013. **132**(8): p. 1761-70.
195. Hasegawa, K., et al., *Glycosylation Status of CD43 Protein Is Associated with Resistance of Leukemia Cells to CTL-Mediated Cytolysis*. PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0152326.
196. Voet, D., Judith G. Voet, and Charlotte W. Pratt, *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*. 3rd ed. ed. 2008, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.
197. Bravo-Adame, M.E., et al., *An alternative mode of CD43 signal transduction activates pro-survival pathways of T lymphocytes*. Immunology, 2016.
198. Maciolek, J.A., J. Alex Pasternak, and H.L. Wilson, *Metabolism of activated T lymphocytes*. Curr Opin Immunol, 2014. **27c**: p. 60-74.
199. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. Science, 2009. **324**(5930): p. 1029-33.
200. Gould, G.W. and G.D. Holman, *The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression*. Biochem J, 1993. **295** (Pt 2): p. 329-41.
201. Fu, Y., et al., *Facilitative glucose transporter gene expression in human lymphocytes, monocytes, and macrophages: a role for GLUT isoforms 1, 3, and 5 in the immune response and foam cell formation*. Blood Cells Mol Dis, 2004. **32**(1): p. 182-90.
202. Chakrabarti, R., et al., *Changes in glucose transport and transporter isoforms during the activation of human peripheral blood lymphocytes by phytohemagglutinin*. J Immunol, 1994. **152**(6): p. 2660-8.
203. Stross, W.P., et al., *Molecule detected in formalin fixed tissue by antibodies MT1, DF-T1, and L60 (Leu-22) corresponds to CD43 antigen*. J Clin Pathol, 1989. **42**(9): p. 953-61.
204. Stefanova, I., et al., *Characterization of a 95 kDa human leucocyte sialoglycoprotein: its identity with CD43, gpL115, leukosialin and sialophorin*. Folia Biol (Praha), 1988. **34**(4): p. 255-65.
205. Remold-O'Donnell, E., et al., *Characterization of a human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome*. J Exp Med, 1984. **159**(6): p. 1705-23.
206. Zeng, H. and H. Chi, *mTOR and lymphocyte metabolism*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(3): p. 347-55.
207. Finlay, D.K., *Regulation of glucose metabolism in T cells: new insight into the role of Phosphoinositide 3-kinases*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 247.
208. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Akts*. Genes Dev, 1999. **13**(22): p. 2905-27.

209. Matsumoto, M., et al., *Large-scale proteomic analysis of tyrosine-phosphorylation induced by T-cell receptor or B-cell receptor activation reveals new signaling pathways*. *Proteomics*, 2009. **9**(13): p. 3549-63.
210. Mayya, V., et al., *Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions*. *Sci Signal*, 2009. **2**(84): p. ra46.
211. Lichtenfels, R., et al., *A proteomic view at T cell costimulation*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e32994.
212. Kronfeld, K., et al., *B7/CD28 costimulation of T cells induces a distinct proteome pattern*. *Mol Cell Proteomics*, 2005. **4**(12): p. 1876-87.
213. Drew, B.A., M.E. Burow, and B.S. Beckman, *MEK5/ERK5 pathway: the first fifteen years*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1825**(1): p. 37-48.
214. Yang, Y., et al., *Development of an integrated approach for evaluation of 2-D gel image analysis: impact of multiple proteins in single spots on comparative proteomics in conventional 2-D gel/MALDI workflow*. *Electrophoresis*, 2007. **28**(12): p. 2080-94.
215. Kikuta K, T.Y., Yoshida A, Tochigi N, Hirohahsi S, Kawai A, Kondo T *Proteome Expression Database of Ewing Sarcoma: a Segment of the Genome Medicine Database of Japan Proteomics*. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 2009. **2**(12): p. 500-504.
216. Yang, W., et al., *ERK1/2-dependent phosphorylation and nuclear translocation of PKM2 promotes the Warburg effect*. *Nat Cell Biol*, 2012. **14**(12): p. 1295-304.
217. Wang, R., et al., *The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation*. *Immunity*, 2011. **35**(6): p. 871-82.
218. Huang, C.Y., et al., *Dynamic regulation of c-Myc proto-oncogene expression during lymphocyte development revealed by a GFP-c-Myc knock-in mouse*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(2): p. 342-9.
219. David, C.J., et al., *HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer*. *Nature*, 2010. **463**(7279): p. 364-8.
220. Clower, C.V., et al., *The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(5): p. 1894-9.
221. Gao, X., et al., *Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase*. *Mol Cell*, 2012. **45**(5): p. 598-609.
222. Mebratu, Y. and Y. Tesfaigzi, *How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?* *Cell Cycle*, 2009. **8**(8): p. 1168-75.
223. Wen, A.Y., K.M. Sakamoto, and L.S. Miller, *The role of the transcription factor CREB in immune function*. *J Immunol*, 2010. **185**(11): p. 6413-9.
224. Zha, J., et al., *Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)*. *Cell*, 1996. **87**(4): p. 619-28.
225. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. *Cell*, 1997. **91**(2): p. 231-41.
226. del Peso, L., et al., *Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt*. *Science*, 1997. **278**(5338): p. 687-9.
227. Pedraza-Alva, G., et al., *CD43 regulates the threshold for T cell activation by targeting Cbl functions*. *IUBMB Life*, 2011. **63**(10): p. 940-8.
228. Roos, D. and J.A. Loos, *Changes in the carbohydrate metabolism of mitogenically stimulated human peripheral lymphocytes. II. Relative importance of glycolysis and oxidative phosphorylation on phytohaemagglutinin stimulation*. *Exp Cell Res*, 1973. **77**(1): p. 127-35.

229. Hildeman, D.A., et al., *Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(3): p. 354-9.
230. Mitrovic, Z., et al., *CD43 expression is an adverse prognostic factor in diffuse large B-Cell lymphoma*. *Clin Lymphoma Myeloma*, 2009. **9**(2): p. 133-7.
231. Lai, R., et al., *Frequency of CD43 expression in non-Hodgkin lymphoma. A survey of 742 cases and further characterization of rare CD43+ follicular lymphomas*. *Am J Clin Pathol*, 1999. **111**(4): p. 488-94.
232. Kadaja-Saarepuu, L., et al., *CD43 promotes cell growth and helps to evade FAS-mediated apoptosis in non-hematopoietic cancer cells lacking the tumor suppressors p53 or ARF*. *Oncogene*, 2008. **27**(12): p. 1705-15.
233. Dock, J.N. and R.B. Effros, *Role of CD8 T Cell Replicative Senescence in Human Aging and in HIV-mediated Immunosenescence*. *Aging Dis*, 2011. **2**(5): p. 382-397.
234. Saurwein-Teissl, M., et al., *Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8(+)/CD28(-) T cell clonal expansions and an imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines*. *J Immunol*, 2002. **168**(11): p. 5893-9.
235. Schirmer, M., et al., *Circulating cytotoxic CD8(+)/CD28(-) T cells in ankylosing spondylitis*. *Arthritis Res*, 2002. **4**(1): p. 71-6.
236. Sun, Z., et al., *Association of Graves' disease and prevalence of circulating IFN-gamma-producing CD28(-) T cells*. *J Clin Immunol*, 2008. **28**(5): p. 464-72.
237. Schmidt, D., J.J. Goronzy, and C.M. Weyand, *CD4+ CD7- CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(9): p. 2027-37.
238. Posnett, D.N., et al., *Differentiation of human CD8 T cells: implications for in vivo persistence of CD8+ CD28- cytotoxic effector clones*. *Int Immunol*, 1999. **11**(2): p. 229-41.
239. Fülöp, T., et al., *Immunosupportive therapies in aging*. *Clin Interv Aging*, 2007. **2**(1): p. 33-54.
240. Kung, P., et al., *Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens*. *Science*, 1979. **206**(4416): p. 347-9.
241. Staerz, U.D., et al., *Characterization of a murine monoclonal antibody specific for an allotypic determinant on T cell antigen receptor*. *J Immunol*, 1985. **134**(6): p. 3994-4000.
242. Nunes, J., et al., *CD28 mAbs with distinct binding properties differ in their ability to induce T cell activation: analysis of early and late activation events*. *Int Immunol*, 1993. **5**(3): p. 311-5.
243. Alban, A., et al., *A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard*. *Proteomics*, 2003. **3**(1): p. 36-44.
244. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. *J Immunol Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
245. Koopman, G., et al., *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*. *Blood*, 1994. **84**(5): p. 1415-20.

IX. ANEXOS

En esta sección se incluyen documentos que complementan la información referida en esta tesis:

Anexo 1. Materiales y Métodos utilizados para los experimentos mostrados en el Capítulo V de Resultados No Publicados.

Anexo 2. Revisión de CD43 que fue publicada en 2012 en Encyclopedia of Signaling Molecules [123].

Anexo 3. Lista de proteínas identificadas por spot en el análisis proteómico.

Anexo 4. Lista total de proteínas identificadas y número de acceso de Uniprot.

Anexo 5. Resultados del análisis bioinformático utilizando la herramienta DAVID para identificar procesos biológicos enriquecidos.

Anexo 6. Resultados del análisis bioinformático utilizando la herramienta STRING para identificar procesos biológicos enriquecidos.

Anexo 7. Resultados del análisis bioinformático utilizando la herramienta STRING para identificar vías enriquecidas.

Anexo 1. Materiales y Métodos

Reactivos

El Ficoll (Lymphoprep) para la separación de células mononucleares se obtuvo de Axis-Shield PoC AS. El kit “Human Pan T Cell Isolation Kit” para la purificación de linfocitos T fue de Miltenyi Biotec. El anticuerpo anti-ratón acoplado a partículas magnéticas fue de Polyosciences, Inc. Los medios de cultivo RPMI (HyClone) o Advanced RPMI (Gibco) se suplementaron con la cantidad indicada de suero fetal bovino (FBS) (Gibco), penicilina (Sigma) 50 U/mL, estreptomina (Sigma) 50 µg/mL, glutamina (Gibco) 2 mM y beta-mercaptoethanol (Sigma) 50 µM. Los anticuerpos anti-CD3 humano (OKT3) [240], anti-CD3 murino (F23.1) [241] y anti-CD8 humano (OKT8) se purificaron en el laboratorio. El anticuerpo anti-CD43 (L10) [205] se purificó en el laboratorio o se compró de Caltag. El anticuerpo anti-CD28 (CD28.2) [242] fue de Biolegend. Los anticuerpos primarios anti-pERK1/2, -Akt, -ERK2, -Glut1 (H-43), -actina fueron de Santa Cruz Biotechnology; anti-Mcl1, -pAkt, -fosfo sustratos de Akt fueron de Cell Signaling Technology. El anticuerpo biotinilado anti-conejo fue de Southern Biotech y la estreptavidina conjugada con ficoeritrina (PE) fue de Molecular Probes. Los anticuerpos secundarios acoplados a HRP fueron de Santa Cruz Biotechnology. Los inhibidores LY294004 y Rapamicina fueron de Calbiochem. La albúmina sérica humana delipidada (HSA) fue de Sigma.

Para el análisis proteómico se utilizaron el kit “ReadyPrep 2D Cleanup Kit”, “Bio-Lyte 3-10 ampholytes”, y las tiras “Ready Strip IPG strips” (17 cm, linear pH 3-10) de BioRad. El Kit “CyDye DIGE Fluor Minimal Labelling Kit” fue de GE Healthcare.

Para el análisis metabólico se utilizaron membranas con glucosa oxidasa o L-lactato oxidasa inmovilizadas (YSI Incorporated). Para evaluar el metabolismo/viabilidad celular se utilizó MTT (Sigma). La viabilidad se midió con el “Fixable Viability Dye eFluor 780” de eBioscience, yoduro de propidio (Sigma) o Annexina V acoplada a FITC (Caltag).

Células

Los linfocitos T humanos de sangre periférica se purificaron a partir de concentrados leucocitarios que fueron donados por el Banco de Sangre del Hospital Regional del IMSS y el Centro Regional para la Transfusión Sanguínea en Cuernavaca, Morelos, México. Las células mononucleares se separaron mediante un gradiente de Ficoll. Posteriormente, los linfocitos T se purificaron por selección negativa utilizando el kit “Human Pan T Cell Isolation Kit”. Finalmente, los linfocitos CD4⁺ se obtuvieron por selección negativa incubando a las células con un anticuerpo anti-CD8 (OKT8), seguida de una incubación con

un anticuerpo anti-ratón unido a partículas magnéticas para capturar las células CD8+. La pureza de las células se determinó por citometría de flujo ($\geq 90\%$). Antes de ser estimuladas, las células se arrestaron durante una noche con RPMI suplementado con 2% de suero fetal bovino (FBS), glutamina 2 mM, penicilina 50 U/mL, estreptomicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y beta-mercaptoetanol 50 μM . Los procedimientos fueron aprobados por el comité de Bioética local.

Activación celular

Las células se activaron con anticuerpos anti-TCR (OKT3), anti-CD43 (L10 [205], MEM59 [204] o DFT1 [203]) o anti-CD28 (CD28.2), y se entrecruzaron con anticuerpos secundarios clase específicos (anti-IgG₁ para anti-CD43 y anti-CD28, y anti-IgG₂ para anti-TCR). Todos los anticuerpos se usaron a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para los ensayos de viabilidad se usó como control positivo la estimulación con PMA/ionomicina en altas concentraciones (250 ng/mL/2.5 μM) para inducir muerte celular. Se utilizó albúmina sérica humana (HSA) delipidada a 10 mg/mL disuelta en PBS. Las activaciones se realizaron durante diferentes períodos de tiempo a 37°C y en los casos indicados, las células se pre-incubaron con inhibidores específicos de PI3K (LY294002, 10 μM) o mTOR (rapamicina, 50 nM) 30 minutos antes de la estimulación con anticuerpos.

2D-DIGE y análisis proteómico

Los linfocitos T CD4+ (15×10^6) de sangre periférica se estimularon como se describe en “Activación celular” y se lisaron en Hepes 25 mM pH 7.5, Triton X-100 0.5%, MgCl₂ 1.5 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.2 mM, con inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, BGP 10 mM, NaF 10 mM, NaVO₄ 200 μM , leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, antipaina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aprotinina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, DTT 0.5 mM). Los lisados se centrifugaron a 18,000 *g* por 15 min a 4°C y el sobrenadante se congeló a -70°C. Se eliminaron las sales en 75 μg de proteína de cada muestra con el “ReadyPrep 2D Cleanup kit” (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante y el pellet de proteína se resuspendió en buffer de marcaje (Tris-HCl 30 mM pH 8.5, urea 7M, thiourea 2M, CHAPS 2%, ASB-14 2%) para la preparación de las muestras para 2D-DIGE. Esta técnica permite la comparación de dos muestras diferentes dentro de un mismo gel; mas aún, con el uso de un control interno en cada gel, el cual está formado por cantidades iguales de proteína de todas las muestras que se incluyen en los geles, es posible comparar los mismos spots en geles diferentes [243].

Las muestras de tres experimentos independientes se marcaron con los fluoróforos CyDye (Cy2, Cy3, or Cy5) siguiendo el protocolo para marcaje mínimo proporcionado por el fabricante (GE Healthcare Life Sciences). Posteriormente, a cada reacción se agregaron volúmenes iguales de buffer de rehidratación con DTT 2X y anfolitos (urea 7 M, thiourea 2 M, ASB-14 2%, CHAPS 2%, DTT 100 mM, anfolitos 1% Bio-Lyte 3-10). Las muestras destinadas a cada gel y marcadas con los tres fluoróforos se mezclaron y se llevaron a un volumen final de 300 μ L con buffer de rehidratación 1X.

Las muestras de proteínas marcadas se colocaron en una celda para isoelectroenfoque Protean IEF (BioRad), las tiras Ready Strip IPG (17 cm, pH linear 3-10) se colocaron sobre las muestras y se cubrieron con 2 ml de aceite mineral para una rehidratación activa a 50V y 20°C durante toda la noche. Al finalizar la rehidratación, el isoelectroenfoque (IEF) se llevó a cabo con un protocolo de rampas en tres pasos para un total de 40,000 volt h a 20°C y una corriente máxima de 50 μ A por tira. Después del IEF, las tiras se equilibraron por 15 min en buffer de equilibrio con DTT (urea 6 M, Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 2%, glicerol 20% y DTT 2%), seguido de 15 minutos de incubación en buffer de equilibrio con iodoacetamida (urea 6 M, Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 2%, glicerol 20% y iodoacetamida 2.5%). Las tiras se colocaron sobre geles de poliacrilamida al 10% montados entre placas de cristal de baja fluorescencia. Para la electrophoresis (SDS-PAGE) se utilizó el Sistema Ettan Daltsix (GE Healthcare Life Sciences) a 10 mA/gel por 1 h, seguido de 12 mA/gel para un total de 17-20 h a 25°C. Los geles individuales se escanearon con un Typhoon Variable Mode TM 9410 Imager (GE Healthcare Life Sciences) para obtener las imágenes de cada uno de los fluoróforos. El análisis de las imágenes se realizó con el software DeCyder 2D Software V6.5, siguiendo las instrucciones del fabricante (GE Healthcare Life Sciences). Las proteínas de interés se extrajeron con un robot Ettan Spot Picker (GE Healthcare Life Sciences). La identificación de proteínas se llevó a cabo en la “Proteomics Discovery Platform”, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, IRCM, Montréal, Canadá.

El software Scaffold 4.2.1 se usó para validar las proteínas identificadas por MS/MS. Se consideraron correctas aquellas identificaciones que cumplieron con los siguientes criterios: 1) tener una probabilidad mayor a 99.0%, 2) contener al menos dos péptidos únicos, y 3) el peso molecular esperado coincide con el peso molecular observado en los geles. Se hizo una base de datos con los números de acceso de UniProt de las proteínas identificadas (Anexo 4). Se hizo un análisis funcional en el sitio NIAID DAVID (david.abcc.ncifcrf.gov) utilizando la herramienta “Functional Annotational Clustering Tool” para agrupar a las proteínas de acuerdo a los términos asignados por Gene Ontology (GO) para proceso biológico. Sólo se consideraron los grupos con un valor de enriquecimiento ≥ 1.3 (Anexo 5). El análisis de interacción entre proteínas se hizo con la base de datos STRING (<http://string-db.org/>) utilizando el valor máximo de confianza

para el puntaje de interacción requerido (0.900). Los resultados de los procesos biológicos enriquecidos y las vías enriquecidas (Kegg pathways) se muestran en los Anexos 6 y 7, respectivamente.

Evaluación del metabolismo de glucosa

Linfocitos T CD4+ de sangre periférica se estimularon durante 48 h en RPMI suplementado con 10% FBS como se describe en “Activación celular”. La concentración de glucosa y lactato en el sobrenadante de las células estimuladas se midió con un analizador enzimático (YSI Lifesciences). El sobrenadante de cultivo pasa a través de una membrana con glucosa oxidasa o L-lactato oxidasa (YSI Incorporated) inmovilizadas entre dos capas, una de policarbonato y la otra de acetato de celulosa. La muestra pasa primero por la capa de policarbonato, la cual limita la difusión del sustrato hacia la membrana con la enzima inmovilizada, donde se oxida y como consecuencia se produce peróxido de hidrógeno. El peróxido atraviesa la capa de acetato de celulosa, la cual sólo permite el paso de moléculas pequeñas y por lo tanto elimina compuestos electroquímicos activos, hacia un electrodo de platino, donde es oxidado. La corriente resultante es proporcional a la concentración del sustrato.

Expresión de Glut-1

Linfocitos T CD4+ (2×10^6) se activaron como se describe en “Activación celular”. La expresión de Glut-1 en la membrana se evaluó por citometría de flujo con un anticuerpo anti-Glut-1 (H-43), y un anticuerpo secundario biotinilado y agregando estreptavidina acoplada a ficoeritrina (PE). La intensidad de fluorescencia se evaluó utilizando un citómetro FACSCanto II, la adquisición y el análisis de los datos se hizo con el software FACS Diva o FlowJo.

Viabilidad

La muerte celular se cuantificó con diferentes métodos que permiten medir los cambios que sufren las células al entrar en procesos de muerte. Para los ensayos de citometría, se utilizó un citómetro FACSCanto II para la adquisición y los datos se analizaron con el software FlowJo.

- a) El tetrazolio amarillo MTT (bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolio) es reducido por las células metabólicamente activas, debido a la acción de deshidrogenasas, generando equivalentes como el NADH y el NADPH. Como resultado se obtiene formazan de color morado que puede ser solubilizado y cuantificado midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro. De esta manera se considera que la intensidad del color obtenido es proporcional al número de células vivas [244]. Para realizar los ensayos, se utilizaron 5×10^4 células por condición en 200 μL de RPMI con 10% FBS, por triplicado. Se agregó el estímulo (HSA 10 mg/mL) y se incubaron las células a 37°C durante diferentes períodos de tiempo. Al finalizar el período de incubación se agregaron 20 μL de MTT (5 mg/mL) a los pozos, manteniendo las células a 37°C durante 4 h. Posteriormente, se agregaron 20 μL de SDS al 20% en HCl 0.001 N para solubilizar los cristales de formazan y se incubó 4 horas con agitación, en la oscuridad. Finalmente, se midió la absorbancia utilizando un filtro de 570 nm.
- b) Se evaluó la integridad del DNA celular al finalizar la activación incubando a las células con 100 μL de una solución hipotónica (30 mg/mL Polietilenglicol 8000, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI, 18,000 U RNase, 10% Tritón X-100, 4 mM citrato de sodio) durante 30 minutos, a 4°C en la oscuridad. Posteriormente se agregaron 100 μL de una solución hipertónica (30 mg/mL Polietilenglicol 8000, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI, 10% Tritón X-100, 400 mM NaCl) para restablecer la isotonicidad a la solución. Finalmente, las células se analizaron por citometría de flujo para evaluar la cantidad de DNA celular como reflejo de la etapa del ciclo celular. Particularmente, se cuantificó la cantidad de células que se encontraron en fase Sub G_0 , la cual indica que las células han sufrido fragmentación de DNA y sugiere que podría tratarse de células apoptóticas.
- c) Otro método para evaluar la viabilidad celular es la tinción con Anexina V, la cual se une a la fosfatidilserina que es traslocada de la cara intracelular de la membrana a la cara extracelular cuando las células entran en apoptosis [245]. Para estos ensayos, las células activadas (1×10^6 células/mL) se lavaron con PBS pH 7.4 y se resuspendieron en 100 μL de buffer para unión de Anexina (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl_2 2.5 mM). Cada muestra se incubó con 5 μL de Anexina V-FITC durante 15 min. Finalmente se agregaron 400 μL de buffer para unión de Anexina y las muestras se analizaron inmediatamente en un citómetro de flujo.

Inmunoblot

Las células se lisaron como se describe en “2D-DIGE y análisis proteómico”. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0.22 μm (Whatman). Las membranas se bloquearon con una solución de 3% BSA en buffer TBS-T (20 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 0.05% Tween-20). Los anticuerpos primarios se diluyeron en 3% BSA y los anticuerpos secundarios acoplados a HRP se diluyeron en una solución al 5% de leche baja en grasa en buffer TBS-T. Las proteínas se visualizaron con el sustrato Western Lighting Plus-ECL (Perkin Elmer) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Studies in both mouse and human cells from many laboratories have established that CD40 signaling pathways play a key role in mediating adaptive immune responses and are implicated in the pathogenesis and progression of many inflammatory and autoimmune diseases, as well as malignancies. A more accurate and detailed understanding of CD40-mediated molecular signaling may offer many new molecular targets for the development of new vaccines and new molecular therapies for the treatment of immune-mediated disorders. However, much remains to be learned, including how CD40 regulates transcriptional activation of a variety of genes. Other questions include the specific contributions of each of the known TRAFs and the specific mechanisms mediating their regulatory interactions with CD40. TRAFs can initiate signaling cascade via directly interacting with receptors, or alternatively, with intracellular signaling proteins to regulate downstream pathways. The activities of the TRAF proteins involved in CD40 signaling are, as yet, only partially defined. It is also quite likely that additional signaling molecules both directly and indirectly associate with the CY domain of CD40; CD40-mediated signaling cascades can also interact with other receptors' signaling pathways. Addressing these questions will elucidate CD40 functions and also provide important principles governing the regulation of signaling by other TRAF-utilizing receptors.

- Bishop GA, Moore CR, Xie P, Stunz LL, Kraus ZJ. TRAF proteins in CD40 signaling. *Adv Exp Med Biol*. 2007;597:131–51.
- Graham JP, Moore CR, Bishop GA. Roles of the TRAF2/3 binding site in differential B cell signaling by CD40 and its viral oncogenic mimic, LMP1. *J Immunol*. 2009;183:2966–73.
- Graham JP, Arcipowski KM, Bishop GA. Differential B lymphocyte regulation by CD40 and its viral mimic, latent membrane protein 1. *Immunol Rev*. 2010;237:1–22.
- Hostager BS. Roles of TRAF6 in CD40 signaling. *Immunol Res*. 2007;39:105–14.
- Hostager BS, Fox DK, Whitten D, Wilkerson CG, Eipper BA, Francone VP, et al. HOIL-1L interacting protein (HOIP) as an NF-kappaB regulating component of the CD40 signaling complex. *PLoS ONE*. 2010;5:e11380.
- Karin M, Gallagher E. TNFR signaling: ubiquitin-conjugated traffic signals control stop-and-go for MAPK signaling complexes. *Immunol Rev*. 2009;228:225–40.
- Koho H, Paulie S, Ben-Aissa H, Jónsdóttir I, Hansson Y, Lundblad ML, et al. Monoclonal antibodies to antigens associated with transitional cell carcinoma of the human urinary bladder. I. Determination of the selectivity of six antibodies by cell ELISA and immunofluorescence. *Cancer Immunol Immunother*. 1984;17:165–72.
- Peters AL, Stunz LL, Bishop GA. CD40 and autoimmunity: the dark side of a great activator. *Semin Immunol*. 2009;21:293–300.
- Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58:4–43.
- Uckun FM, Schieven GL, Dibirdik I, Chandan-Langlie M, Tuel-Ahlgren L, Ledbetter JA. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation, phosphoinositide turnover, and multiple previously unidentified ser/thr-specific protein kinases by the pan-BCR CD40/Bp50 at discrete developmental stages of human B-cell ontogeny. *J Biol Chem*. 1991;266:17478–85.

References

- Baccam M, Woo SY, Vinson C, Bishop GA. CD40-mediated transcriptional regulation of the IL-6 gene in B lymphocytes: involvement of NF-kappa B, AP-1, and C/EBP. *J Immunol*. 2003;170:3099–108.
- Bishop GA. The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:775–86.
- Bishop GA, editor. The many faces of CD40: multiple roles in normal immunity and disease. *Semin Immunol*. 2009;21:255–312.
- Bishop GA, Hostager BS. Molecular mechanisms of CD40 signaling. *Arch Immunol Ther Exp*. 2001a;49:129–37.
- Bishop GA, Hostager BS. Signaling by CD40 and its mimics in B cell activation. *Immunol Res*. 2001b;24:97–109.
- Bishop GA, Hostager BS. The CD40-CD154 interaction in B cell-T cell liaisons. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14:297–309.
- Bishop GA, Hostager BS, Brown KD. Mechanisms of TNF receptor-associated factor (TRAF) regulation in B lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 2002;72:19–23.
- Bishop GA, Haxhinasto SA, Stunz LL, Hostager BS. Antigen-specific B-lymphocyte activation. *Crit Rev Immunol*. 2003;23:149–97.

CD43

Maria Elena Bravo-Adame, Monserrat Alba Sandoval-Hernandez, Oscar Arturo Migueles-Lozano and Yvonne Rosenstein
 Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

Synonyms

[Leukosialin](#); [Sialophorin](#), [galactoglycoprotein](#)

Historical Background

CD43, also called sialophorin or leukosialin was first identified as a defective molecule of leukocytes and

platelets of patients affected with the Wiskott-Aldrich syndrome. It was thought that expression of this heavily glycosylated, mucin-type membrane protein was restricted to hematopoietic cells. However, recent advances in the field, evidence that CD43 is present in non-lymphoid tissues, particularly tumor cells. Here we reviewed the most important features about this molecule, highlighting the recent advances that have contributed to our understanding of the roles of CD43.

Gene Expression and Protein Structure

CD43 is a type I cell surface glycoprotein abundantly expressed on almost all hematopoietic cells, except for erythrocytes and resting B cells. Although initially considered an immune cell molecule, recent reports evidence a much broader distribution, as epithelial cells, and a range of tumors of epithelial origin are CD43 positive. Expression of CD43 has also been documented in the normal brain and in the uterus. The gene encoding human CD43 is located in chromosome 16; it has two transcription initiation sites and it is composed of two exons and a single intron within the untranslated 5' region, although the entire protein is encoded only by the second exon. Alternative polyadenylation signals generate two mRNAs that differ from each other in the length of the 3' untranslated region (Pallant et al. 1989).

CD43 is a bulky and extended cell surface mucin that protrudes 45 nm from the cell surface. Its 239 amino acids long extracellular domain comprises five tandem repeats of 18 amino acids each (¹¹⁶Ile–²⁰⁵Ser), rich in serines and threonines modified by O-GalNAc glycosylation. As a result of the timely controlled activity of core 2 β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase (C2GnT), two isoforms of CD43 that define cell interaction affinities and functional cell states have been characterized. A 115 kDa isoform is expressed preferentially in thymocytes, resting CD4 T lymphocytes and monocytes, and a 130 kDa isoform is detected in resting CD8, CD4 activated T lymphocytes, neutrophils, platelets, B lymphocytes and macrophages, as well as tumor cells. The low molecular isoform contains almost exclusively the tetrasaccharide NeuAc(α 2-3)-Gal(β 1-3)[(NeuAc(α 2-6)]GalNAc (Core1) and the high molecular isoform exhibits mainly the branched

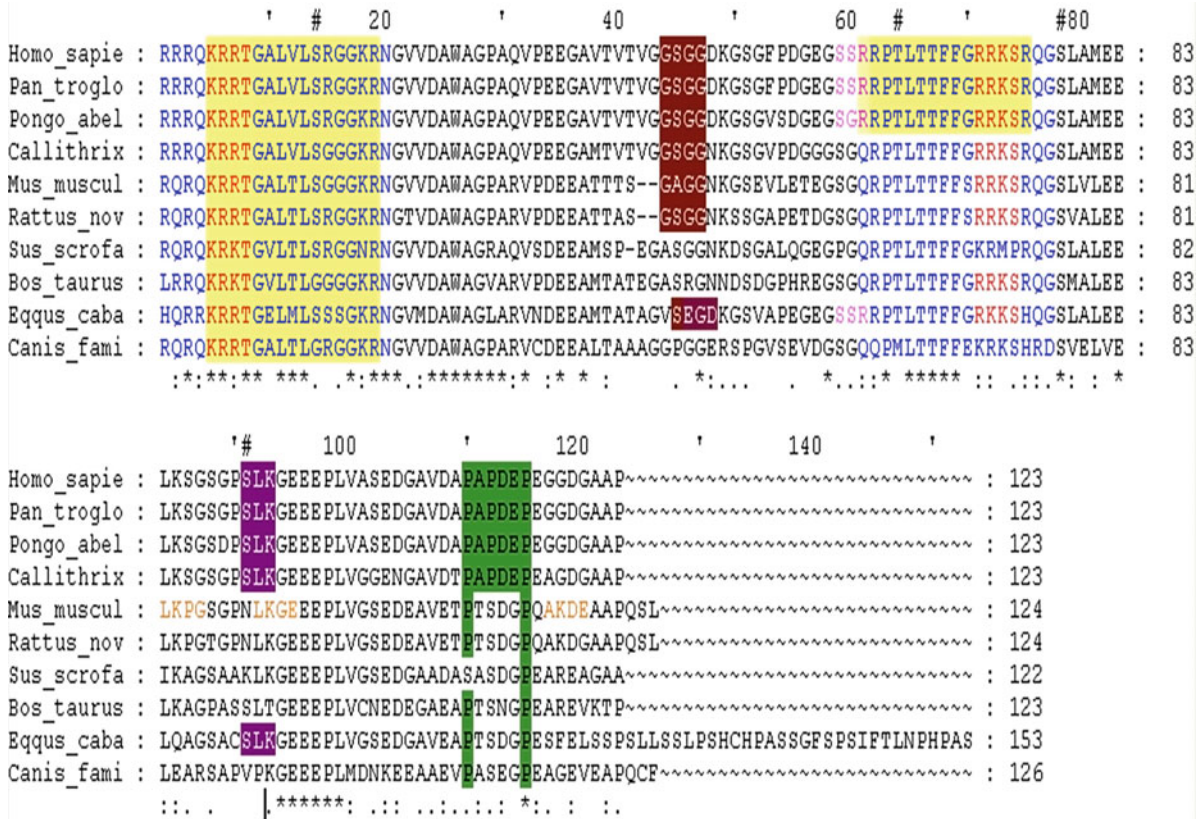
hexasaccharide NeuAc(α 2-3)-Gal(β 1-3[NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)]GalNAc (Core2) (Fukuda 2002). The intracellular domain has 123 amino acids with a highly conserved sequence among primates, mouse, and rat; it includes different motifs (Fig. 1) that allow CD43 to participate in different signaling pathways, supporting a functional role for this molecule.

CD43 Expression is Tightly Controlled

The levels and relative abundance of CD43 on the cell surface are controlled through several mechanisms: expression regulation, molecular density, or processing, evidencing a regulatory role for CD43 in cell function.

Aside from a tissue-specific gene transcription regulation, the relative abundance of CD43 at a specific location of the cell membrane is tightly controlled. As T lymphocytes and neutrophils migrate to inflammatory lesions, CD43, together with PSGL-1, ICAM-3 and CD44, moves from the leading edge to the rear end (uropod) of the cell through its association with members of the ERM family of molecules, while chemokine receptors relocate at the leading edge. Likewise, and through a similar mechanism, during the encounter of an antigen-specific T cell with the appropriate antigen-presenting cell, CD43 is excluded from the immunological synapse (intimate contact zone between the two cells), and relocates partially to the distal pole, where it plays a yet to define role. Interestingly, it is excluded from the inhibitor natural killer (NK) cell synapse, but not from the activating one (Reviewed in Ostberg et al. 1998; Aguilar-Delfin et al. 2006).

In addition, CD43 expression can be regulated by proteolysis and shedding. Processing of CD43 has been described in human neutrophils, murine T lymphocytes, as well as in human carcinoma cell lines (Lopez et al. 1998; Seo and Ziltener 2009; Andersson et al. 2004). The enzymatic cleavage of CD43 by a γ secretase-dependent intramembrane processing mechanism leads to the shedding of the extracellular domain, known as galactoglycoprotein and present in high concentrations in normal serum, and to the translocation of the intracytoplasmic domain to the nucleus, where it has been found to protect cells from apoptotic signals, promoting cell survival (Andersson et al. 2004; Seo and Ziltener 2009). Lastly,



CD43, Fig. 1 Multiple alignment of the intracellular region of CD43. Sequences are the reported on NCBI or were obtained by a BLAST analysis and picking the hits with at least 80% identity. The *Pan troglodytes*, *Pongo abelii*, *Rattus norvegicus*, *Canis familiaris*, *Callithrix jacchus* and *Equus caballus* sequences are computational predictions. Two binding sites for ERM family proteins (ezrin, radixin, moesin) are highly conserved between species (blue letters, aminoacids 1–20 and 61–77). Two nuclear localization signals (NLS, yellow-shaded residues), comprising residues 5–19 and 61–75 of the intracellular domain respectively, overlap with the ERM binding domains. Potential phosphorylation sites are also located within the NLS and ERM binding regions. Serine/threonine residues experimentally confirmed to be phosphorylated in human, and well conserved, are marked with a “#” symbol. Red colored letters represent

predicted cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites (residues 5–8 and 71–74). Pink letters and purple shaded letters tag predicted Protein kinase C phosphorylation pattern sites (residues 59–61 and 91–93). Between the two ERM binding domains, potential casein kinase II phosphorylation sites are predicted (brown shaded letters, residues 44–47, and 45–48 in *Equus caballus*). In addition, three potential SUMO modification consensus sequence sites (ψ KXE) located close to the C terminus (orange letters) have been identified in the murine CD43 protein (residues 84–87, 92–95, 117–120, as you can see the middle one is well conserved across species). Finally, a proline rich region (green shaded letters, residues 110–115) at the C-terminus allows SH3-domain containing proteins to bind and participate in CD43 signaling pathways (Reviewed in Aguilar-Delfin et al. 2006; Seo and Ziltener 2009)

secretion of intracellularly stored CD43 is yet another mechanism through which CD43 expression levels are regulated: following LPS exposure, the intracellular levels CD43 present in intestinal epithelial cells have been found to augment, and correlate with an important secretion of CD43 to the intestinal lumen, underscoring a role for this mucin as a defense mechanism against infection in the intestinal epithelium (Amano et al. 2001).

A Multifunctional Protein

The abundance of CD43, its elongated structure, and the sequence homology of its intracytoplasmic domain between species indicate that this molecule transduces information from the cell surface to the intracellular milieu in order to modulate the decisions of the cell. In line with the fact that CD43 has been found to partner with a seemingly ever-growing list of membrane

molecules, multiple, but often opposing functions have been described for CD43. The capacity of CD43 to transduce activation signals that regulate these multiple functions relies on its intracytoplasmic domain. Depending on the cell, and most probably on the ligand it encounters, CD43 must activate different signaling pathways that ultimately fine-tune the decision-making process of the cell, although little is known about this.

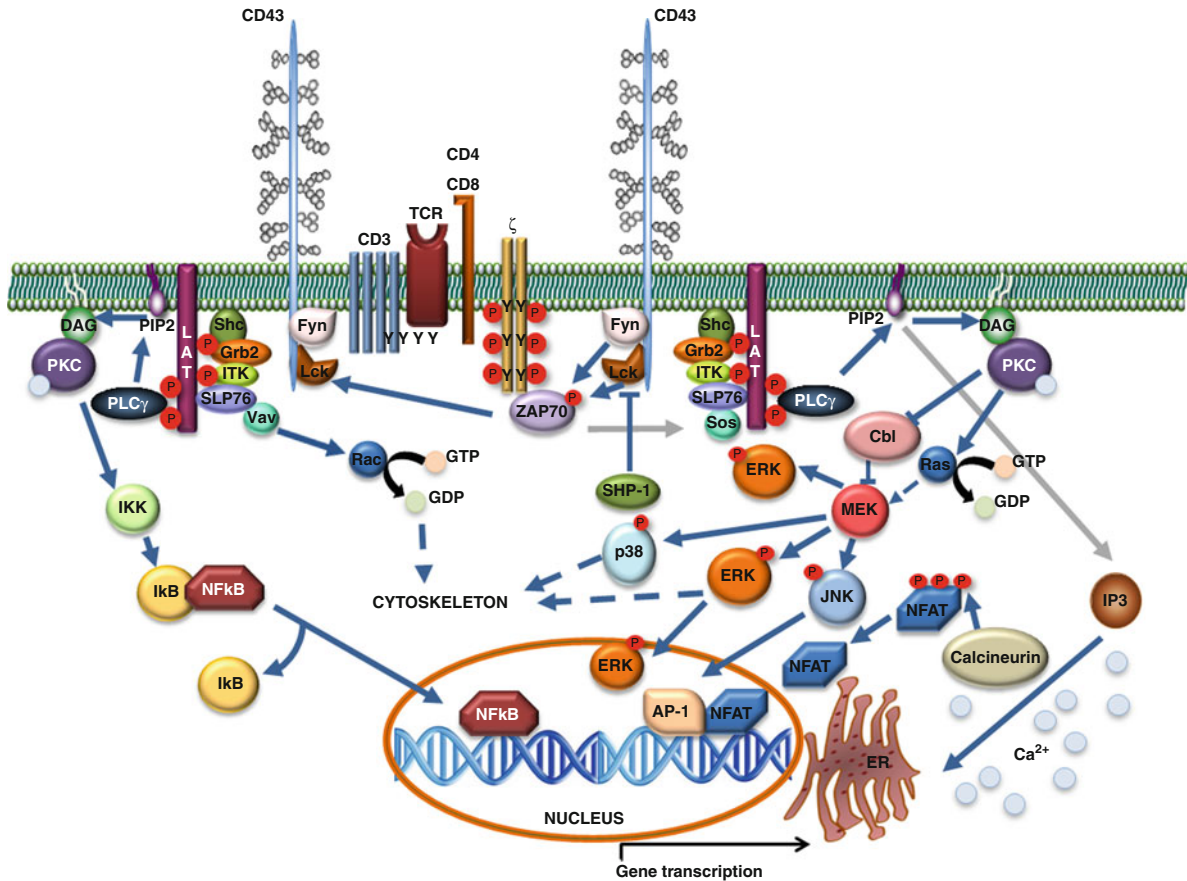
The net negative charge of CD43, resulting from the elevated glycosylation and sialic acid content, led to first propose that the role of this abundantly expressed cell surface mucin was to provide the cells with a repulsive force to limit cell contacts. Further attempts to understand the role of CD43 have been undertaken *in vivo*, with the CD43^{-/-} mice, in different disease models where T lymphocytes are pivotal. In a model of vaccinia virus infection, despite the fact that CD8-dependent cytotoxic response is more robust in the knockout mice, viral clearance is less efficient in these mice as compared to wild-type animals (Manjunath et al. 1995). Likewise, infiltration of naïve CD8+ T cells to the brain following intracranial infection with Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) is impaired in CD43^{-/-} mice, resulting in prolonged survival of the animals. In an experimental model of autoimmune encephalomyelitis (EAE), CD43^{-/-} mice have a lower incidence rate of the disease and milder symptoms due to a defective migratory capacity of antigen-specific CD4 T cells to the central nervous system. In addition, and consistent with a reduced inflammation, these animals have higher levels of IL-4 rather than of IFN γ . The LCMV model also provides evidence that, in addition to regulate the migration of T lymphocytes, CD43 participates in the contraction phase of the response, as antigen-specific CD8+ T cells numbers remain higher in the knockout mice, due to enhanced levels of \blacktriangleright Bcl-2 and hence decreased apoptosis (Onami et al. 2002; Ford et al. 2003). Altogether, these results highlight a positive role of CD43 in regulating the migration of naïve T cells to inflammation sites, and in regulating cell number and homeostasis. This in turn determines the development and the outcome of the disease and correlates with the fact that anti-CD43 antibodies prevent the migration of T cells to pancreatic islets, and the development of diabetes (Johnson et al. 1999). However, all these studies were done in the mixed background BL6.129, and care should be taken in the interpretation of the data, as a mixed genetic background can influence the outcome of the experiments. Also, it should be taken

into account that these animals are completely deficient for CD43. It will be interesting to evaluate the function of this mucin in mice where CD43 deficiency is limited to a specific cell type.

In addition to interact with cytoskeletal elements and to participate in directing cell migration, CD43 regulates cell–cell interactions and activation (Fig. 2). *In vitro*, CD43 engagement has been shown to induce homotypic cell adhesion, dendritic cell maturation, monocyte respiratory burst, increased T and B cell proliferation, and cytokine and chemokine secretion in NK cells, mast cells, dendritic cells, and T cells. CD43 engagement can induce apoptosis of Jurkat T cells and bone marrow cells; however, constitutive expression of CD43 in B cells promotes cell survival. Only expressed on a small proportion of naïve B cells, CD43 expression is upregulated upon stimulation through the BCR or pokeweed mitogen and it contributes to cell proliferation; moreover, forced expression of CD43 was shown to inhibit B cell G1 arrest, extending B cell survival. Consistent with the fact that expression of CD43 on B cell lymphomas correlates with a bad prognosis, uncontrolled proliferation and enhanced survival capacity, two hallmarks of cancer cells, are positively regulated by CD43 in B cells (Reviewed in Aguilar-Delfín et al. 2006 and Pedraza-Alva and Rosenstein 2007).

Multiple Ligands for a Multifunctional Protein

The diversity of the physiological ligands identified for CD43 evidences a dynamic role for this cell-surface mucin in regulating intercellular interactions. The fact that ICAM-1 and MHC-1 molecules have been found to act as receptors for CD43 (Reviewed in Pedraza-Alva and Rosenstein 2007), together with the recent finding that CD43 interacts with LFA-1 and CD147 in two distinct complexes (Khunkaewla et al. 2008), indicates that CD43 plays a role in cell–cell adhesion, in concert with, and probably regulating, other adhesion molecules. Consistent with this possibility, splenocytes and thymocytes from CD43-deficient mice exhibit enhanced homotypic adhesion to ICAM-1 and fibronectin (Manjunath et al. 1995). Paradoxically, in contrast with this anti-adhesive function, a number of anti-CD43 mAbs block homotypic cell–cell interactions or lymphoid cell binding to lymph



CD43, Fig. 2 The signaling pathway of CD43 has been best characterized in T cells, where it functions as a co-receptor of the TCR and its co-stimulatory function is independent of CD28 (Sperling et al. 1995). Additional to its role as a costimulatory molecule, CD43 also signals by itself. CD43 engagement in human T cells induces its association to the Src family kinases Lck and Fyn, through the interaction of their SH3 domains and the proline-rich region of CD43. This then leads to the phosphorylation of the CD3 ζ chain and the assembly of macromolecular complexes that include adaptor proteins such as Shc, Grb2, SLP-76, and the guanine exchange factor Vav. These signaling complexes promote ERK MAPK activation, leading to regulation of actin cytoskeleton and a positive feedback loop for Lck signaling as a result of an ERK-dependent serine phosphorylation of Lck, which inhibits its association to

the phosphatase SHP-1. CD43 engagement also induces calcium fluxes and Protein kinase C activation, necessary for Cbl serine phosphorylation and its interaction with 14-3-3. Moreover, T cell pre-stimulation by the CD43 co-receptor molecule before TCR engagement inhibits the TCR-dependent c-Cbl tyrosine phosphorylation and interaction with the adapter molecule Crk-L and promotes Cbl-b ubiquitination and degradation in a Protein kinase C θ dependent manner. The inhibition of these E3 ubiquitin ligases results in prolonged tyrosine phosphorylation and delayed degradation of ZAP-70 and of the CD3 ζ chain, leading to enhanced MAPK activation and robust T cell response. These data indicate that CD43-mediated signals lower the threshold for T cell activation by restricting the c-Cbl and Cbl-b inhibitory effects on TCR signaling (Reviewed in Pedraza-Alva and Rosenstein 2007)

nodes and high endothelial venules (Reviewed in Ostberg et al. 1998, and in Aguilar-Delfín et al. 2006). Moreover, E-selectin has been found to interact with CD43, favoring neutrophil and B cell leukemia cell lines rolling, further evidencing the participation of CD43 as a pro-adhesive molecule that regulates the infiltrating ability of cells (Matsumoto et al. 2008;

Nonomura et al. 2008). CD43 also interacts with Siglec-1 (sialoadhesin), a regulator of lymphoid and myeloid cell adhesion, probably consolidating physical contacts between cells. On the contrary, the putative association of CD43 to human serum albumin inhibits neutrophil function by limiting cell spreading as well as CD43 proteolysis by elastase (Reviewed

in Aguilar-Delfín et al. 2006). Altogether, these data support the idea that CD43 triggers signaling pathways that modulate other conventional adhesion mechanisms.

In human dendritic cells, galectin-1-CD43 interaction primes the cells and results in cytokine production, upregulation of metalloproteases, and increased migration, through signaling pathways that depend on calcium fluxes as well as on Syk and Protein kinase C activation. However, through its interaction with galectin-1, CD43 promotes T cell apoptosis, possibly by recruiting galectin-1 molecules to the cell surface and making them accessible to CD7, which is directly responsible for galectin-1-induced cell death (Hernandez et al. 2006; Fulcher et al. 2009). Interestingly, through the interaction of membrane nucleolin with capped CD43, macrophages recognize apoptotic cells (Miki et al. 2009).

The myriad of ligands underscores a regulatory role for CD43, ultimately favoring homeostasis of the immune system. It is clear that, since most of these molecules are also ligands for other receptors, and different functions have been associated to each of them, CD43 participates in the fine-tuning of cell fate. However, information about the cellular responses and the intracellular signals that result from the interaction of CD43 with each of its ligands is very fragmentary, and this is undoubtedly a question that needs to be addressed.

CD43 is a Pathogen Recognition Receptor

The complex glycosylation pattern of CD43 functions as bait for multiple pathogens. During HIV infection, as a result of increased Core2 enzyme activity, more O-Core2 glycans and lactosamine residues decorate CD43, ultimately leading infected cells to apoptosis, presumably as a result of the interaction of galectin-1 with CD43 and CD45. Moreover, it was suggested that this pathway can contribute to the death of infected as well as noninfected cells, and thus to a decrease in T cell counts (Lanteri et al. 2003). What is more, the combination of CD43 and TCR-► CD3 complex signals lowers the signaling threshold for HIV LTR-driven gene activity, promoting the activation of NFκB and ► NFAT, ultimately favoring viral replication (Reviewed in Pedraza-Alva and Rosenstein 2007). In addition, the alternative glycosylation of CD43

promotes the production of autoantibodies against hyposialylated isoforms, although their role in HIV pathogenesis is not understood.

Influenza A virus (IAV) was also found to interact with polymorphonuclear leukocytes through the specific interaction of CD43 with the IAV hemagglutinin. In addition to lessen the oxidative burst of these cells, IAV modifies the expression level of adhesion-related molecules: while it reduces that of CD43 and L- and P-selectins, it augments that of integrins CD11b and CD11c, subtly modulating the adhesive interactions of polymorphonuclear cells (Hartshorn and White 1999). It is presently not known if this is the result of the signals transduced by the CD43-hemagglutinin A interaction or if it reflects the activation of additional, CD43-independent pathways.

Several pathogenic bacteria also use CD43 as a docking molecule. Recent reports have defined Cpn60.2 (Hsp65, GroEL), a molecular chaperone and an adhesin of the capsule of *Mycobacterium tuberculosis* as a ligand for CD43 (Hickey et al. 2010). This is consistent with the fact that, on macrophages, CD43 was previously identified as a receptor for *M. tuberculosis*, taking part in bacillus uptake and limiting its intracellular growth through the production of TNF α (Fratazzi et al. 2000). *Streptococcus gordonii*, the causative agent of infective endocarditis, has also been found to specifically interact with CD43 through Has, another adhesin (Ruhl et al. 2000). More recently, CD43 was reported to be the substrate of SteE, a metalloprotease that cleaves mucin-like glycoproteins, and is secreted by enterohemorrhagic *Escherichia coli*, the enteric pathogen that causes hemorrhagic colitis. The net balance of this proteolytic activity is the cleavage of the extracellular domain of CD43 from neutrophils, increased oxidative burst, but impaired neutrophil motility (Szabady et al. 2009).

In addition, CD43 is a counter-receptor for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas disease. This enzyme transfers sialic acid from β-galactopyranosil donors to β-galactopyranosil acceptors with α2-3-linkages providing the parasite with a disguise to avoid recognition by the host immune system. Furthermore, it restores the glycosylation status of CD43 to a Core1 glycans expression pattern, similar to that of resting T cells, thus compromising the T cell-dependent response, ensuring parasite replication. Interestingly, *T. cruzi* produces large amounts of an inactive and soluble form of the trans-sialidase that is also

recognized by CD43, although the biological significance of this is not understood presently (Freire-de-Lima et al. 2010).

On non-lymphoid cells, CD43 retains the capacity to function as a pathogen recognition receptor (PRR). Together with the glycolipid GM1, CD43 has been described as a receptor for the heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *E. coli* in the microvilli of enterocytes (Zemelman et al. 1989). Interestingly, in CaCo2 cells differentiated into enterocytes, CD43 is not exposed on the cell surface, but stored in intracellular granules from where it is released and secreted to the extracellular compartment upon exposure of the cells to bacterial lipopolysaccharides (Amano et al. 2001).

Altogether, these data suggest that through the pathogen receptor function of CD43, PAMPS initiate signal transduction pathways that modulate the activation of target cells and the onset of an inflammatory response and inflammation-related diseases. A better knowledge of the specific role of CD43 in the pathogen recognition and the cell-surface association processes will provide a clue to identify key target molecules both on the pathogen and on the host's cells.

CD43 and Noninfectious Diseases: A Poorly Understood Function

In addition to function as a PRR, CD43 has been associated to diverse diseases. CD43 was first described as the molecule responsible for the Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS), an immunodeficiency characterized by frequent infections, skin eczema, decreased platelet numbers, and defective T-cell function (Remold-O'Donnell et al. 1984). However, it was later demonstrated that this X-linked disease was caused by mutations in the gene encoding WASP, a protein involved in signal transduction from cell receptors to the actin cytoskeleton. Yet, the link between WASP and CD43 is still unclear.

Although the participation of CD43 in several autoimmune diseases is documented, we are still lacking the full picture regarding the mechanisms of pathogenesis associated to this. Decreased expression of CD43 on the cell surface of synovial fluid polymorphonuclear cells of rheumatoid arthritis patients (Humbria et al. 1994) while an enhanced expression on the T cells infiltrating the synovium of osteoarthritis patients (Sakkas et al. 1998) have been reported. In

systemic lupus erythematosus (SLE) patients, anti-CD43 and anti-galectin-1 autoantibodies, together with high levels of soluble galectin-1 were found to correlate with the time of disease evolution and low levels of complement (Montiel et al. 2010). A role for CD43 in Type I diabetes has been suggested, as preventing T cell migration and possibly that of other CD43+ cells such as monocytes and dendritic cells from bloodstream to inflammation sites (lymph nodes, pancreas, and salivary glands) with exogenous anti-CD43 antibodies, inhibits the progression of the disease (Johnson et al. 1999). Thus, reflecting the dual nature of CD43, anti-CD43 antibodies could function in two ways: favoring the inflammatory response, exacerbating the disease (SLE and arthritis), or preventing the establishment of the disease (diabetes).

CD43: A New “Kid on the Block” in Tumor Development

CD43 function has been mostly studied in hematopoietic cells and hence in an immunological context. However as mentioned, this molecule is no longer considered solely as an immune protein. It has been detected in normal and transformed tissues. In addition to hematopoietic tumors, non-hematopoietic tumor-derived cells from breast, lung, colon, bladder, cervix, and prostate express CD43 (Reviewed in Aguilar-Delfin et al. 2006) pointing to a role for this molecule in cell transformation, raising the question as to whether CD43 could be used as a marker for malignancy and prognosis.

The contribution of CD43 to tumor development is slowly emerging. CD43 is expressed in approximately 30% of low-grade B-cell lymphomas and 90% of T-cell lymphomas, B-cell lymphoblastic lymphomas, and of T-cell lymphoblastic lymphomas (Leong et al. 2003). Since CD43 expression in B cells is restricted to early B-cell ontogeny and activation of peripheral B cells, expression of CD43 suggests a state of malignancy. In fact, when expressed in a CD43⁻ murine B-cell lymphoma, CD43 was found to provide the cells with increased viability and proliferation when cultured under serum deprivation conditions. Interestingly, expression of a CD8/CD43 chimera did not result in cell proliferation, indicating that the intracellular domain of CD43 is not sufficient to protect the cells from apoptosis and to promote cell cycle entry and, that the interaction of the extracellular domain of the

molecule with its ligands generates intracellular signals necessary for cell survival and proliferation (Misawa et al. 1996). Accordingly, T-cell lymphomas that test positive for the expression of the c-Maf protooncogene, also express CD43 together with high levels of cyclins D1 and D2 (Murakami et al. 2007). Moreover and consistent with these findings, in the absence of the tumor suppressors ► p53 and/or ARF, overexpression of CD43 in a human carcinoma cell line protects the cells from FAS-mediated apoptosis, ultimately favoring cell proliferation (Kadaja et al. 2004). In addition, it is now clear that the proteolytic cleavage of the CD43 cytoplasmic domain through a regulated intramembrane proteolysis (RIP) process exposes a nuclear localization signal that promotes the translocation of the truncated protein to the nucleus, where it interacts with ► beta-catenin, resulting in increased expression of the c-Myc and cyclin D1 genes (Andersson et al. 2004). Furthermore, CD43 was recently shown to participate in tumor cell-peritoneum interaction, through a metalloprotease-dependent mechanism activated by the interaction with ICAM-1, one of its putative ligands (Alkhamesi et al. 2007). Altogether, these data demonstrate that CD43 participates in the coordinated regulation of cell adhesion and cell motility as well as in the control of cell cycle entry, ultimately favoring cell transformation, tumor formation, and invasiveness. A deeper understanding of the CD43-mediated signals involved in tumor cell proliferation or survival will be critical for the rational development of drugs aimed to reduce malignancy.

Summary

CD43 is a mucin that modulates the response of all cells of the immune system as well as that of other cells. Because of its elongated structure and its abundance on the cell surface, it serves as an antenna that senses the environment, and prepares the cells for future actions. CD43 signals help the cell progress toward differentiation and maturation, as it regulates cell migration and cell contact. In addition, through the interaction with its numerous physiological and pathological ligands, CD43 actively participates in the onset of an inflammatory response and of inflammation-related diseases, underscoring the possibility to consider this molecule as a potential therapeutic target. An effort should be undertaken to identify those regions of the

extracellular domain that are important for ligand recognition as well as to understand the rules that dictate selectivity of the different isoforms of CD43 for a given ligand. Unraveling the signals that follow interaction with a given ligand will help to untangle the multiple intracellular signals generated through this molecule. Understanding the role soluble CD43 is also a challenge. A better comprehension of the functions regulated by the interaction of CD43 with each of its multiple ligands in different cells in diverse contexts of activation will provide a sharper picture of the roles this molecule plays in cell physiology in different organs, under normal and pathological scenarios.

References

- Aguilar-Delfin I, Fierro NA, Rosenstein Y. CD43. In: UCSD-nature molecule pages. 2006. doi:0.1038/mp.a000001.01.
- Alkhamesi NA, Roberts G, Ziprin P, Peck DH. Induction of proteases in peritoneal carcinomatosis, the role of ICAM-1/CD43 interaction. *Biomark Insights*. 2007;2:377–84.
- Amano J, Morimoto C, Irimura T. Intestinal epithelial cells express and secrete the CD43 glycoform that contains core 2 O-glycans. *Microbes Infect*. 2001;3(9):723–8.
- Andersson CX, Fernandez-Rodriguez J, Laos S, Sikut R, Sikut A, Baeckstrom D, Hansson GC. CD43 has a functional NLS, interacts with beta-catenin, and affects gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316(1):12–7.
- Ford ML, Onami TM, Sperling AI, Ahmed R, Evavold BD. CD43 modulates severity and onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2003;171(12):6527–33.
- Fratazzi C, Manjunath N, Arbeit RD, Carini C, Gerken TA, Ardman B, et al. A macrophage invasion mechanism for mycobacteria implicating the extracellular domain of CD43. *J Exp Med*. 2000;192(2):183–92.
- Freire-de-Lima L, Alisson-Silva F, Carvalho ST, Takiya CM, Rodrigues MM, DosReis GA, et al. Trypanosoma cruzi subverts host cell sialylation and may compromise antigen-specific CD8+ T cell responses. *J Biol Chem*. 2010;285(18):13388–96.
- Fukuda M. Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1573(3):394–405.
- Fulcher JA, Chang MH, Wang S, Almazan T, Hashimi ST, Eriksson AU, et al. Galectin-1 co-clusters CD43/CD45 on dendritic cells and induces cell activation and migration through Syk and protein kinase C signaling. *J Biol Chem*. 2009;284(39):26860–70.
- Hartshorn KL, White MR. Influenza A virus up-regulates neutrophil adhesion molecules and adhesion to biological surfaces. *J Leukoc Biol*. 1999;65(5):614–22.
- Hernandez JD, Nguyen JT, He J, Wang W, Ardman B, Green JM, Fukuda M, Baum LG. Galectin-1 binds different CD43 glycoforms to cluster CD43 and regulate T cell death. *J Immunol*. 2006;177(8):5328–36.
- Hickey TB, Ziltener HJ, Speert DP, Stokes RW. Mycobacterium tuberculosis employs Cpn60.2 as an adhesin that binds

- CD43 on the macrophage surface. *Cell Microbiol.* 2010;12(11):1634–47.
- Humbria A, Diaz-Gonzalez F, Campanero MR, Arroyo AG, Laffon A, Gonzalez-Amaro R, et al. Expression of L-selectin, CD43, and CD44 in synovial fluid neutrophils from patients with inflammatory joint diseases. Evid soluble form L selectin synovial fluid *Arthritis Rheum.* 1994;37(3):342–8.
- Johnson GG, Mikulowska A, Butcher EC, McEvoy LM, Michie SA. 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.* 1999;163(10):5678–85.
- Kadaja L, Laos S, Maimets T. Overexpression of leukocyte marker CD43 causes activation of the tumor suppressor proteins p53 and ARF. *Oncogene.* 2004;23(14):2523–30.
- Khunkaewla P, Schiller HB, Paster W, Leksa V, Cermak L, Andera L, Horejsi V, Stockinger H. LFA-1-mediated leukocyte adhesion regulated by interaction of CD43 with LFA-1 and CD147. *Mol Immunol.* 2008;45(6):1703–11.
- Lanteri M, Giordanengo V, Hiraoka N, Fuzibet JG, Auberger P, Fukuda M, et al. Altered T cell surface glycosylation in HIV-1 infection results in increased susceptibility to galectin-1-induced cell death. *Glycobiology.* 2003;13(12):909–18.
- Leong AS, Cooper K, Leong FJ. *Manual for diagnostic antibodies for immunohistology.* 2nd ed. London: Greenwich Medical Media Ltd; 2003.
- Lopez S, Seveau S, Lesavre P, Robinson MK, Halbwachs-Mecarelli L. CD43 (sialophorin, leukosialin) shedding is an initial event during neutrophil migration, which could be closely related to the spreading of adherent cells. *Cell Adhes Commun.* 1998;5(2):151–60.
- Manjunath N, Correa M, Ardman M, Ardman B. Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43. *Nature.* 1995;377(6549):535–8.
- Matsumoto M, Shigeta A, Miyasaka M, Hirata T. CD43 plays both antiadhesive and proadhesive roles in neutrophil rolling in a context-dependent manner. *J Immunol.* 2008;181(5):3628–35.
- Miki Y, Itoh T, Hirano K, Eda S, Hayashi A, Yamanaka M, Beppu M. Clearance of oxidatively damaged cells by macrophages: recognition of glycoprotein clusters by macrophage-surface nucleolin as early apoptotic cells. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(4):564–72.
- Misawa Y, Nagaoka H, Kimoto H, Ishii Y, Kitamura K, Tsunetsugu-Yokota Y, Shibuya M, Takemori T. CD43 expression in a B cell lymphoma, WEHI 231, reduces susceptibility to G1 arrest and extends survival in culture upon serum depletion. *Eur J Immunol.* 1996;26(11):2573–81.
- Montiel JL, Monsivais-Urenda A, Figueroa-Vega N, Moctezuma JF, Burgos-Vargas R, Gonzalez-Amaro R, Rosenstein Y. Anti-CD43 and anti-galectin-1 autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol.* 2010;39(1):50–7.
- Murakami YI, Yatabe Y, Sakaguchi T, Sasaki E, Yamashita Y, Morito N, et al. c-Maf expression in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(11):1695–702.
- Nonomura C, Kikuchi J, Kiyokawa N, Ozaki H, Mitsunaga K, Ando H, et al. CD43, but not P-selectin glycoprotein ligand-1, functions as an E-selectin counter-receptor in human pre-B-cell leukemia NALL-1. *Cancer Res.* 2008;68(3):790–9.
- Onami TM, Harrington LE, Williams MA, Galvan M, Larsen CP, Pearson TC, et al. Dynamic regulation of T cell immunity by CD43. *J Immunol.* 2002;168(12):6022–31.
- Ostberg JR, Barth RK, Frelinger JG. The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43. *Immunol Today.* 1998;19(12):546–50.
- Pallant A, Eskenazi A, Mattei MG, Fournier RE, Carlsson SR, Fukuda M, Frelinger JG. Characterization of cDNAs encoding human leukosialin and localization of the leukosialin gene to chromosome 16. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(4):1328–32.
- Pedraza-Alva G, Rosenstein Y. CD43: One molecule, many tales to recount. *Signal Transduction.* 2007;7:372–85.
- Remold-O'Donnell E, Kenney DM, Parkman R, Cairns L, Savage B, Rosen FS. Characterization of a human lymphocyte surface sialoglycoprotein that is defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *J Exp Med.* 1984;159(6):1705–23.
- Ruhl S, Cisar JO, Sandberg AL. Identification of polymorphonuclear leukocyte and HL-60 cell receptors for adhesins of *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces naeslundii*. *Infect Immun.* 2000;68(11):6346–54.
- Sakkas LI, Scanzello C, Johanson N, Burkholder J, Mitra A, Salgame P, et al. T cells and T-cell cytokine transcripts in the synovial membrane in patients with osteoarthritis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5(4):430–7.
- Seo W, Ziltener HJ. CD43 processing and nuclear translocation of CD43 cytoplasmic tail are required for cell homeostasis. *Blood.* 2009;114(17):3567–77.
- Sperling AI, Green JM, Mosley RL, Smith PL, DiPaolo RJ, Klein JR, Bluestone JA, Thompson CB. CD43 is a murine T cell costimulatory receptor that functions independently of CD28. *J Exp Med.* 1995;182(1):139–46.
- Szabady RL, Lokuta MA, Walters KB, Huttenlocher A, Welch RA. Modulation of neutrophil function by a secreted mucinase of *Escherichia coli* O157:H7. *PLoS Pathog.* 2009;5(2):e1000320.
- Zelman BV, Chu SH, Walker WA. Host response to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin via two microvillus membrane receptors in the rat intestine. *Infect Immun.* 1989;57(10):2947–52.

CD45 (PTPRC)

Pauline Johnson, Asanga Samarakoon,
Amy E. Saunders and Kenneth W. Harder
Department of Microbiology and Immunology,
Life Sciences Institute, University of British
Columbia, Vancouver, BC, Canada

Synonyms

B220; CD45R; Ly 5.2; Ly5.1; protein tyrosine phosphatase receptor type C; T200; The leukocyte common antigen (LCA)

Anexo 3. Lista de proteínas identificadas por spot en el análisis proteómico

Spot #	GI #	Protein name	MW (kDa)	# Unique Peptides	# Unique Spectra	Total Spectra	% Coverage	Identified Peptides
455	gi 23510338	ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	118	14	15	23	17	(R)LQTSSVLVSGLR(G) (R)LQTSSVLVSGLR(G) (K)LVVADTR(G) (K)DNPGVVTcLDEAR(H) (R)GGIVSQVK(V) (R)GGIVSQVK(V) (K)SLVASLAEPDFVVTDFAK(F) (K)SLVASLAEPDFVVTDFAK(F) (K)SLVASLAEPDFVVTDFAK(F) (R)NEEDAAELVALAQAVNAR(A) (R)NEEDAAELVALAQAVNAR(A) (R)KLAYVAAGDLAPINAFIGGLAAQEVmK(A) (K)LAYVAAGDLAPINAFIGGLAAQEVmK(A) (R)YDGGQVAVFGSDLQEK(L) (K)LKSDTAAAVR(Q) (R)LAGTQPLEVLEAVQR(S) (R)LAGTQPLEVLEAVQR(S) (R)AAVATFLQSVQVPEFTP(K)(S) (R)AAVATFLQSVQVPEFTP(K)(S) (R)AENYDIPSADR(H) (R)AENYDIPSADR(H) (R)LDQPMTEIVSR(V) (R)LDQPMTEIVSR(V)
626	gi 10863945	X-ray repair cross-complementing protein 5	83	7	7	7	12	(K)VITMFVQR(Q) (R)QVFAENKDEIALVFGTDGTDNPLSGGDQYQNTVHR(H) (R)HIEIFDLSSR(F) (R)YGSDIVPFSK(V) (K)SQIPLSK(I) (K)TLFPLIEAK(K) (K)ALQEKVEIK(Q)
740	gi 14603253	Phosphoglucomutase 2	68	7	8	11	16	(R)LDQETAQWLR(W) (R)LIAEGNKEELRK(C) (R)LIAEGNKEELRK(C) (K)GIVISFDAR(A) (K)GIVISFDAR(A) (R)LAATTFISQGIPVYLFSITPTPFVPTVSHL(L) (R)LAATTFISQGIPVYLFSITPTPFVPTVSHL(L) (K)FVHTSVHGVGHSFVQSAFK(A) (K)NLSLSQQLK(A) (K)NLSLSQQLK(A) (K)YNLQPK(A)
740	gi 167614506	plastin -2	70	5	5	8	13	(K)IGNFSTDIKDSK(A) (K)IGNFSTDIKDSK(A)

								(R)QFVTATDVVR(G) (R)QFVTATDVVR(G) (K)LNLAFIANLFNR(Y) (R)VNHLYSDLSDALVIFQLYEK(I) (K)ISTSLPVLDLIDAIQPGSINYDLLK(T) (K)ISTSLPVLDLIDAIQPGSINYDLLK(T)
740	gil_119580852	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 (Ku autoantigen, 70kDa)	65	5	5	7	14	(R)DSLIFLVDASK(A) (R)DSLIFLVDASK(A) (R)ILELDQFKGQQGQK(R) (R)TFNTSTGGLLPSDKR(S) (R)SDSFENPVLQQHFR(N) (R)SDSFENPVLQQHFR(N) (R)LGSLVDEFKELVYPPDYNPEGK(V)
800	gil_11493459	serum albumin	57	3	4	7	6.2	(K)YLYEIAR(R) (K)YLYEIAR(R) (K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)ccTESLVNR(R)
805	gil_189502784	mitochondrial heat shock 60kD protein 1	61	6	6	9	14	(R)TVIIIEQSWGSPK(V) (R)GYISPYFINTSK(G) (K)ISSIQSIVPALEIANHR(K) (K)ISSIQSIVPALEIANHR(K) (K)VGEVIVTKDDAMLLK(G) (R)VTDALNATR(A) (R)VTDALNATR(A) (R)VTDALNATR(A) (K)NAGVEGSLIVEK(I)
805	gil_11493459	serum albumin	57	5	5	8	10	(K)YLYEIAR(R) (K)YLYEIAR(R) (K)LVTDLT(K)(V) (K)YIcENQDSISSK(L) (K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)ccTESLVNR(R) (K)ccTESLVNR(R)
805	gil_189428	phosphatase 2A regulatory subunit	64	4	4	4	11	(R)AISHEHSPDLEAHFVPLVK(R) (R)LAGGDWFTSR(T) (K)VLAMSGDPNYLHR(M) (K)IGPILDNSTLQSEVKPILEK(L)
823	gil_119598292	pyruvate kinase, muscle	60	17	17	26	43	(R)LDIDSPITAR(N) (R)LDIDSPITAR(N) (R)LDIDSPITAR(N) (R)NTGIcTIGPASR(S) (R)NTGIcTIGPASR(S)

								(R)SVETLKEMIK(S) (R)LNFSHGTHEYHAETIK(N) (R)TATESFASDPILYRPVAVALDTK(G) (R)TATESFASDPILYRPVAVALDTK(G) (R)TATESFASDPILYRPVAVALDTKGPEIR(T) (K)GSGTAEVELKK(G) (K)GSGTAEVELKK(G) (K)GSGTAEVELKK(G) (K)ITLDNAYMEK(C) (K)IYVDDGLISLQVK(Q) (K)IYVDDGLISLQVK(Q) (K)KGVNLPAAVDLPVSEKDIQDLK(F) (K)FGVEQDmVFASFIR(K) (K)IISKIENHEGVR(R) (R)RFDEILEASDGIMVAR(G) (R)GDLGIEIPAEK(V) (R)GDLGIEIPAEK(V) (K)GDYPLEAVR(M) (K)GDYPLEAVR(M) (R)EAEAAIYHLQLFEELRR(L) (R)LAPITSDPTEATAVGAVEASF(C)
823	gil_11493459	serum albumin	57	4	4	7	8.6	(K)YLVEIAR(R) (K)YIcENQDSISSK(L) (K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)ccTESLVNR(R) (K)ccTESLVNR(R)
832	gil_119598292	pyruvate kinase, muscle	60	29	37	74	64	(R)LDIDSPITAR(N) (R)LDIDSPITAR(N) (R)LDIDSPITAR(N) (R)NTGIicTIGPASR(S) (R)NTGIicTIGPASR(S) (R)NTGIicTIGPASR(S) (R)SVETLKEMIK(S) (R)SVETLKEMIK(S) (R)SVETLKEMIK(S) (R)SVETLKEmIK(S) (R)LNFSHGTHEYHAETIK(N) (R)TATESFASDPILYRPVAVALDTK(G) (R)TATESFASDPILYRPVAVALDTK(G) (R)TATESFASDPILYRPVAVALDTK(G) (R)TATESFASDPILYRPVAVALDTKGPEIR(T) (R)TATESFASDPILYRPVAVALDTKGPEIR(T) (R)TATESFASDPILYRPVAVALDTKGPEIR(T) (R)TGLIKGSGTAEVELKK(G)

(K)GSGTAEVELK(K)
(K)GSGTAEVELK(K)
(K)GSGTAEVELK(K)
(K)GSGTAEVELK(K)
(K)GSGTAEVELK(K)
(K)GSGTAEVELK(K)
(K)GSGTAEVELK(K)
(K)ITLDNAYMEK(C)
(K)ITLDNAYMEK(C)
(K)IYVDDGLISLQVK(Q)
(K)IYVDDGLISLQVK(Q)
(K)IYVDDGLISLQVK(Q)
(K)KGVNLPGAAVDLPVSEK(D)
(K)KGVNLPGAAVDLPVSEKDIQDLK(F)
(K)KGVNLPGAAVDLPVSEKDIQDLK(F)
(K)KGVNLPGAAVDLPVSEKDIQDLK(F)
(K)KGVNLPGAAVDLPVSEKDIQDLK(F)
(K)KGVNLPGAAVDLPVSEK(D)
(K)GVNLPGAAVDLPVSEKDIQDLK(F)
(K)GVNLPGAAVDLPVSEKDIQDLK(F)
(K)GVNLPGAAVDLPVSEKDIQDLK(F)
(K)FGVEQDQDmVFASFIR(K)
(K)FGVEQDQDmVFASFIR(K)
(K)FGVEQDQDmVFASFIR(K)
(K)FGVEQDQDmVFASFIR(K)
(K)FGVEQDQDmVFASFIR(K)
(K)FGVEQDQDmVFASFIR(K)
(K)IISKIENHEGVR(R)
(K)IISKIENHEGVR(R)
(R)RFDEILEASDGIMVAR(G)
(R)RFDEILEASDGIMVAR(G)
(R)GDLGIEIPA EK(V)
(R)GDLGIEIPA EK(V)
(R)GDLGIEIPA EK(V)
(R)GDLGIEIPA EK(VFLAQK(M)
(R)GDLGIEIPA EK(VFLAQK(M)
(R)AGKPVicATQMLESMIK(K)
(R)AGKPVicATQMLESMIK(K)
(R)AGKPVicATQMLESMIK(K)
(R)AGKPVicATQmLESmIK(K)
(R)AGKPVicATQmLESmIK(K)
(R)AEGSDVANAVLDGADcIMLSGETAKGDYPLEAVR(M)
(K)GDYPLEAVR(M)
(K)GDYPLEAVR(M)
(K)GDYPLEAVR(M)
(R)EAEAAIYHLQLFEELRR(L)
(R)EAEAAIYHLQLFEELRR(L)

								(R)LAPITSDPTEATAVGAVEASFK(C) (R)LAPITSDPTEATAVGAVEASFK(C) (R)LAPITSDPTEATAVGAVEASFK(C) (K)ccSGAIIVLTK(S) (K)ccSGAIIVLTK(S) (K)ccSGAIIVLTK(S) (R)GIFPVLcKDPVQEAWAEDVDLR(V) (R)VNFAMNVGK(A) (R)VNFAMNVGK(A) (K)KGDVVIVLTGWRPGSGFTNTmR(V)
832	gi 4557014	catalase	60	20	21	36	50	(K)ADVLTGAGNPVGDKLNIVTVGPR(G) (K)ADVLTGAGNPVGDKLNIVTVGPR(G) (K)ADVLTGAGNPVGDKLNIVTVGPR(G) (R)GPLLVQDVVFTDEMAHFDR(E) (R)GPLLVQDVVFTDEMAHFDR(E) (R)GPLLVQDVVFTDEMAHFDR(E) (R)GPLLVQDVVFTDEMAHFDRER(I) (R)GPLLVQDVVFTDEMAHFDRER(I) (K)GAGAFGYFEVTHDITK(Y) (K)GAGAFGYFEVTHDITK(Y) (R)FSTVAGESGSADTVR(D) (R)FSTVAGESGSADTVRDP(R)(G) (R)FSTVAGESGSADTVRDP(R)(G) (K)FHYKTDQGIK(N) (K)NLSVEDAAR(L) (K)NLSVEDAAR(L) (R)LSQEDPDYGIK(D) (R)LSQEDPDYGIK(D) (K)VWPHKDYPLIPVGK(L) (K)VWPHKDYPLIPVGK(L) (R)NPVNYFAEVEQIAFDPSNmPPGIEASPK(M) (R)LFAYPDTHR(H) (R)LGPNYLHIPVNCpYR(A) (R)LGPNYLHIPVNCpYR(A) (R)RFNTANDDNVTQVR(A) (R)FNTANDDNVTQVR(A) (R)FNTANDDNVTQVR(A) (R)AFYVNVLNREEQR(K) (R)AFYVNVLNREEQR(K) (R)AFYVNVLNREEQR(K) (R)LcENIAGHLK(D) (R)LcENIAGHLKDAQIFIQK(A) (K)NFTEVHPDYGSHIQALLDKYNAEKPK(N) (K)NAIHTFVQSGSHLAAR(E) (K)NAIHTFVQSGSHLAAR(E) (K)NAIHTFVQSGSHLAAR(E)

832	gil_119594345	dihydroxyacetone kinase 2	64	10	10	13	22	(R)VALLSGGGSGHEPAHAGFIGK(G) (K)VAGALAEAGVGLLEEIAK(Q) (R)VAPAEPQEAPDSTAAGGSASK(R) (R)VAPAEPQEAPDSTAAGGSASK(R) (R)VAPAEPQEAPDSTAAGGSASKR(M) (K)EGPPPASPAQLLSK(L) (K)LSVLLLEK(M) (K)LSVLLLEK(M) (K)SPGADLLQVLTk(A) (K)SAEAAAeATKNmEAGAGR(A) (R)ASYISSAR(L) (R)LEQPDPGAVAAAAAILR(A) (R)LEQPDPGAVAAAAAILR(A)
832	gil_20151189	Glutamate Dehydrogenase	56	5	5	8	12	(-)SEAVADREDDPNFFK(M) (R)YSTDVSVDEVK(A) (R)YSTDVSVDEVK(A) (K)HGGTIPIVPTAEFQDR(I) (K)HGGTIPIVPTAEFQDR(I) (K)YNLGLDLR(T) (K)YNLGLDLR(T) (R)TAAYVNAIEK(V)
832	gil_11493459	serum albumin	57	3	3	5	6.2	(K)YLIEIAR(R) (K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)ccTESLVNR(R) (K)ccTESLVNR(R)
832	gil_119594330	CD5 antigen	55	3	3	5	7.5	(R)VLLALLcSGFQPK(V) (R)LVGGSSicEGTVEVR(Q) (R)LVGGSSicEGTVEVR(Q) (R)VLDAGDPTSR(G) (R)VLDAGDPTSR(G)
832	gil_11527777	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	64	2	2	3	3.9	(R)VFNVFcLYGNVEK(V) (R)VFNVFcLYGNVEK(V) (K)LcFSTAQHAS(-)
839	gil_119598292	pyruvate kinase, muscle	60	30	44	93	61	(R)LDIDSPPIAR(N) (R)LDIDSPPIAR(N) (R)LDIDSPPIAR(N) (R)NTGIICtIGPASR(S) (R)NTGIICtIGPASR(S) (R)NTGIICtIGPASR(S) (R)NTGIICtIGPASR(S) (R)SVETLKEMIK(S) (R)SVETLKEMIK(S) (R)SVETLKEMIK(S) (R)SVETLKEmIK(S) (R)SVETLKEmIK(S) (R)LNFSHGTHEYHAETIK(N)

								(R)RFDEILEASDGIMVAR(G) (R)RFDEILEASDGImVAR(G) (R)RFDEILEASDGIMVAR(G) (R)GDLGIEIPAEK(V) (R)GDLGIEIPAEKVFLAQK(M) (R)GDLGIEIPAEKVFLAQK(M) (R)AGKPVicATQMLESMIK(K) (R)AGKPVicATQmLESmIK(K) (R)AGKPVicATQMLESMIK(K) (R)AGKPVicATQmLESMIK(K) (R)AGKPVicATQMLESMIK(K) (R)AGKPVicATQMLESMIK(K) (R)AEGSDVANAVLDGADcIMLSGETAKGDYPLEAVR(M) (R)AEGSDVANAVLDGADcIMLSGETAKGDYPLEAVR(M) (K)GDYPLEAVR(M) (K)GDYPLEAVR(M) (K)GDYPLEAVR(M) (R)MQHLIAR(E) (R)EAEAAIYHLQLFEELR(R) (R)EAEAAIYHLQLFEELRR(L) (R)EAEAAIYHLQLFEELRR(L) (R)LAPITSDPTEATAVGAVEASFK(C) (R)LAPITSDPTEATAVGAVEASFK(C) (R)LAPITSDPTEATAVGAVEASFK(C) (R)LAPITSDPTEATAVGAVEASFK(C) (R)LAPITSDPTEATAVGAVEASFK(C) (K)ccSGAIIVLTK(S) (K)ccSGAIIVLTK(S) (K)ccSGAIIVLTK(S) (R)VNFAMNVGK(A) (R)VNFAMNVGK(A) (R)VNFAmNVGK(A) (R)VNFAmNVGK(A) (R)VNFAMNVGK(A) (K)KGDVVIVLTGWRPGSGFTNTmR(V)
839	gi 4757810	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	60	15	15	20	32	(R)ILGADTSVDLEETGR(V) (R)ILGADTSVDLEETGR(V) (R)VLSIGDGIAR(V) (R)VLSIGDGIAR(V) (R)TGAIVDVPVGEELLGR(V) (R)VVDALGNAIDGK(G) (R)VVDALGNAIDGKGPISK(T) (K)AVDSLVPIGR(G) (K)AVDSLVPIGR(G) (K)TSIAIDTIINQK(R) (K)TSIAIDTIINQK(R)

								(R)STVAQLVK(R) (K)HALIIYDDLK(Q) (K)HALIIYDDLK(Q) (R)QMSLLLR(R) (K)GIRPAINVGLSVSR(V) (R)EVAFAQFGSDLAATQQLSR(G) (K)FENAFSHVVSQHQALLGTIR(A) (K)LKEIVTNFLAGFEA(-) (K)LKEIVTNFLAGFEA(-)
839	gil_11493459	serum albumin	57	4	4	7	8.6	(K)YLYEIAR(R) (K)YicENQDSISSK(L) (K)YicENQDSISSK(L) (K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)ccTESLVNR(R) (K)ccTESLVNR(R)
853	gil_4502643	T-complex protein 1 subunit zeta	58	12	12	17	30	(R)AQAALAVNISAAR(G) (R)AQAALAVNISAAR(G) (K)DGNVLLHEMQIQHTASLIK(V) (K)QADLYISEGLHPR(I) (K)QADLYISEGLHPR(I) (R)IITEGFEEAKEK(A) (R)EMDRETLDIVAR(T) (K)HKSETDTSLIR(G) (R)GLVLDHGAR(H) (R)GLVLDHGAR(H) (R)KVCGSDKGFVVINQK(G) (K)GIDPFSLDALS(E) (R)SVTLLIK(G) (R)AQLGVQAFADALLIIPK(V) (R)AQLGVQAFADALLIIPK(V) (K)VLAQNSGFDLQETLVK(I) (K)VLAQNSGFDLQETLVK(I)
853	gil_119598292	pyruvate kinase, muscle	60	8	8	9	22	(R)LDIDSPITAR(N) (R)NTGIcTIGPASR(S) (R)NTGIcTIGPASR(S) (R)TATESFASDPILYRPVAVALDTK(G) (R)RFDEILEASDGIMVAR(G) (R)GDLGIEIPAEK(V) (R)EAEAAIYHLQLFEELRR(L) (R)LAPITSDPTEATAVGAVEASF(C) (K)ccSGAIIVLTK(S)
853	gil_119594330	CD5 antigen	55	3	3	5	7.5	(R)VLLALLcSGFQPK(V) (R)LVGGSSicEGTVEVR(Q) (R)LVGGSSicEGTVEVR(Q) (R)VLDAGDPTSR(G)

								(R)VLDAGDPTSR(G)
853	gi 11493459	serum albumin	57	2	2	3	4.8	(K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)ccTESLVNR(R)
853	gi 119594723	EH-domain containing 1	62	2	2	3	3.6	(R)HLIEQDFPGMR(I) (R)HLIEQDFPGMR(I) (K)IINTPEVVR(V)
853	gi 32483399	serine/threonine-protein kinase PAK 2	58	2	2	2	5.5	(R)LLQTSNITK(L) (R)SVIDPVPAPVGDShVDGAAK(S)
853	gi 189502784	mitochondrial heat shock 60kD protein 1	61	2	2	2	7	(K)ISSIQSIVPALEIANHR(K) (R)KPLVIIAEDVDGEALSTLVLNR(L)
862	gi 20070125	protein disulfide-isomerase precursor	57	17	20	32	39	(R)KSNFAEALAAHK(Y) (K)LKAESEIR(L) (R)LAKVDATEESDLAQQYGVR(G) (K)VDATEESDLAQQYGVR(G) (K)VDATEESDLAQQYGVR(G) (R)EADDIVNWLK(K) (R)TGPAATLTPDGAAAESLVESSEVAVIGFFK(D) (R)TGPAATLTPDGAAAESLVESSEVAVIGFFKDVESDSAK(Q) (K)YQLDKDGVVLFK(K) (K)YQLDKDGVVLFK(K) (K)YQLDKDGVVLFK(F) (K)YQLDKDGVVLFK(F) (K)HNQLPLVIEFTEQTAPK(I) (K)HNQLPLVIEFTEQTAPK(I) (K)HNQLPLVIEFTEQTAPK(I) (K)THILLFLPK(S) (K)THILLFLPK(S) (K)ILFIFIDSDHTDNQR(I) (K)ILFIFIDSDHTDNQR(I) (K)ILFIFIDSDHTDNQR(I) (R)LITLLEEEMTK(Y) (R)LITLLEEEMTK(Y) (R)LITLLEEEMTK(Y) (K)YKPESEELTAER(I) (K)YKPESEELTAER(I) (K)YKPESEELTAER(I) (K)YKPESEELTAER(I) (R)ITEFCHR(F) (R)ITEFCHR(F) (K)IKPHLMSQELPEDWDKQPVK(V) (K)IKPHLmSQELPEDWDKQPVK(V) (R)TVIDYNGER(T)
862	gi 220702506	TapasinERP57 HETERODIMER	54	6	6	7	15	(-)SDVLELTDDNFESR(I) (-)SDVLELTDDNFESR(I) (R)LAPEYEAATR(L)

								(K)YGVSGYPTLK(I) (K)IFRDGEEAGAYDGPR(T) (R)TADGIVSHLKK(Q) (R)ELSDFISYLQR(E)
862	gil5902134	coronin-1A	51	4	4	5	10	(K)ADQcYEDVR(V) (K)ADQcYEDVR(V) (K)RGLEVNKcEIAR(F) (R)DAGPLLISLK(D) (R)AAPEASGTPSSDAVSR(L)
862	gil11493459	serum albumin	57	2	2	4	4.8	(K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)KVPQVSTPTLVEVSR(N) (K)ccTESLVNR(R) (K)ccTESLVNR(R)
893	gil119608775	tubulin, beta 2C	49	20	27	57	47	(R)INVYYNEATGGK(Y) (R)INVYYNEATGGK(Y) (R)INVYYNEATGGK(Y) (R)AVLVDLEPGTMDSVR(S) (R)AVLVDLEPGTMDSVR(S) (R)AVLVDLEPGTMDSVR(S) (R)SGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAK(G) (K)GHYTEGAELVDSVLDVVR(K) (K)GHYTEGAELVDSVLDVVR(K) (K)GHYTEGAELVDSVLDVVR(K) (K)GHYTEGAELVDSVLDVVRK(E) (K)GHYTEGAELVDSVLDVVRK(E) (K)IREEYPDR(I) (R)IMNTFSVVPSPK(V) (R)IMNTFSVVPSPK(V) (R)IMNTFSVVPSPK(V) (R)ImNTFSVVPSPK(V) (R)ImNTFSVVPSPK(V) (R)FPGQLNADLR(K) (R)FPGQLNADLR(K) (R)FPGQLNADLR(K) (R)FPGQLNADLRK(L) (R)FPGQLNADLRK(L) (K)LAVNMVPFPR(L) (K)LAVNMVPFPR(L) (K)LAVNmVPFPR(L) (K)LAVNMVPFPR(L) (K)LAVNmVPFPR(L) (K)LAVNmVPFPR(L) (R)LHFFmPGFAPLTSR(G) (R)LHFFmPGFAPLTSR(G) (R)LHFFmPGFAPLTSR(G) (R)LHFFmPGFAPLTSR(G)

								(R)LHFFMPGFAPLTSR(G) (R)LHFFmPGFAPLTSR(G) (R)LHFFMPGFAPLTSR(G) (R)YLTVAAVFR(G) (R)YLTVAAVFR(G) (R)YLTVAAVFR(G) (R)MSMKEVDEQMLNVQNK(N) (R)MSMKEVDEQMLNVQNK(N) (K)EVDEQMLNVQNK(N) (K)EVDEQMLNVQNK(N) (K)EVDEQmLNVQNK(N) (K)NSSYFVEWIPNNVK(T) (K)NSSYFVEWIPNNVK(T) (K)TAVcDIPPR(G) (K)TAVcDIPPR(G) (K)TAVcDIPPR(G) (K)TAVcDIPPRGLK(M) (K)MSATFIGNSTAIQELFKR(I) (K)mSATFIGNSTAIQELFKR(I) (R)ISEQFTAMFR(R) (R)ISEQFTAMFR(R) (R)ISEQFTAMFR(R) (R)ISEQFTAmFRR(K) (R)ISEQFTAMFRR(K)
893	gil18088719	Tubulin, beta	50	3	4	56	43	(R)INVYYNEATGGK(Y) (R)INVYYNEATGGK(Y) (R)INVYYNEATGGK(Y) (R)AVLVDLEPGTMDSVR(S) (R)AVLVDLEPGTMDSVR(S) (R)AVLVDLEPGTMDSVR(S) (R)SGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAK(G) (K)GHYTEGAELVDSVLDVVR(K) (K)GHYTEGAELVDSVLDVVR(K) (K)GHYTEGAELVDSVLDVVR(K) (K)GHYTEGAELVDSVLDVVRK(E) (K)GHYTEGAELVDSVLDVVRK(E) (K)IREEYPDR(I) (R)IMNTFSVVPSPK(V) (R)IMNTFSVVPSPK(V) (R)IMNTFSVVPSPK(V) (R)ImNTFSVVPSPK(V) (R)ImNTFSVVPSPK(V) (R)FPGQLNADLR(K) (R)FPGQLNADLR(K) (R)FPGQLNADLR(K) (R)FPGQLNADLRK(L)

								(R)FPGQLNADLRK(L) (K)LAVNMVVPFPR(L) (K)LAVNMVVPFPR(L) (K)LAVNmVVPFPR(L) (K)LAVNMVVPFPR(L) (K)LAVNmVVPFPR(L) (K)LAVNmVVPFPR(L) (R)LHFFmPGFAPLTSR(G) (R)LHFFmPGFAPLTSR(G) (R)LHFFmPGFAPLTSR(G) (R)LHFFMPGFAPLTSR(G) (R)LHFFMPGFAPLTSR(G) (R)LHFFmPGFAPLTSR(G) (R)LHFFMPGFAPLTSR(G) (R)YLTVAAVFR(G) (R)YLTVAAVFR(G) (R)YLTVAAVFR(G) (R)MSMKEVDEQMLNVQNK(N) (R)MSMKEVDEQMLNVQNK(N) (K)EVDEQMLNVQNK(N) (K)EVDEQMLNVQNK(N) (K)EVDEQmLNVQNK(N) (K)NSSYFVEWIPNNVK(T) (K)NSSYFVEWIPNNVK(T) (K)TAVcDIPPR(G) (K)TAVcDIPPR(G) (K)TAVcDIPPR(G) (K)TAVcDIPPRGLK(M) (K)MSATFIGNSTAIQELFKR(I) (K)mSATFIGNSTAIQELFKR(I) (R)ISEQFTAMFR(R) (R)ISEQFTAMFR(R) (R)ISEQFTAMFR(R) (R)ISEQFTAmFRR(K) (R)ISEQFTAMFRR(K)
893	gil119581533	drebrin-like	55	6	6	9	13	(R)NGPALQEAYVR(V) (K)FVLINWTGEGVNDVR(K) (K)FVLINWTGEGVNDVRK(G) (R)FQDVGPQAPVGSVYQK(T) (R)FQDVGPQAPVGSVYQK(T) (K)TNAVSEIKR(V) (K)TNAVSEIKR(V) (R)TWEQQQEVVSR(N) (R)TWEQQQEVVSR(N)
893	gil167887751	vimentin	50	5	5	5	14	(R)TYSLGSALRPSTSR(S) (R)SLYASSPGGVYATR(S)

								(R)QDVDNASLAR(L) (K)FADLSEAANR(N) (R)HLREYQDLLNVK(M)
893	gi 220702506	TapasinERP57 HETERODIMER	54	4	4	4	10	(-)SDVLELTDDNFESR(I) (R)LAPEYAAAATR(L) (K)YGVSGYPTLK(I) (K)IFRDGEEAGAYDGPR(T)
895	gi 220702506	TapasinERP57 HETERODIMER	54	37	46	96	69	(-)SDVLELTDDNFESR(I) (-)SDVLELTDDNFESR(I) (-)SDVLELTDDNFESR(I) (R)LAPEYAAAATR(L) (R)LAPEYAAAATR(L) (R)LAPEYAAAATR(L) (R)LKGIVPLAK(V) (R)LKGIVPLAK(V) (R)LKGIVPLAK(V) (K)YGVSGYPTLK(I) (K)YGVSGYPTLK(I) (K)YGVSGYPTLK(I) (K)IFRDGEEAGAYDGPR(T) (K)IFRDGEEAGAYDGPR(T) (K)IFRDGEEAGAYDGPR(T) (R)DGEEAGAYDGPR(T) (R)DGEEAGAYDGPR(T) (R)TADGIVSHLK(K) (R)TADGIVSHLK(K) (R)TADGIVSHLKK(Q) (R)TADGIVSHLKK(Q) (R)TADGIVSHLKK(Q) (R)TADGIVSHLKK(Q) (K)QAGPASVPLR(T) (K)QAGPASVPLRTEEEFKK(F) (K)QAGPASVPLRTEEEFKK(F) (K)KFISDKDASIVGFFDDSFSEAHSEFLK(A) (K)KFISDKDASIVGFFDDSFSEAHSEFLK(A) (K)KFISDKDASIVGFFDDSFSEAHSEFLK(A) (K)KFISDKDASIVGFFDDSFSEAHSEFLK(A) (K)KFISDKDASIVGFFDDSFSEAHSEFLK(A) (K)KFISDKDASIVGFFDDSFSEAHSEFLK(A) (K)KFISDKDASIVGFFDDSFSEAHSEFLK(A) (K)AASNLRDNYR(F) (K)FEDKTVAYTEQK(M) (K)FEDKTVAYTEQK(M) (K)KFIQENIFGIcPHMTEDNKDLIQGK(D) (K)FIQENIFGIcPHMTEDNKDLIQGK(D) (K)DLIIAYDVVDEK(N)

(K)DLLIAYYDVVYEK(N)
(K)DLLIAYYDVVYEK(N)
(R)NRVMMVAK(K)
(R)NRVMMVAK(K)
(K)KFLDAGHKLNFASR(K)
(K)KFLDAGHKLNFASR(K)
(K)KFLDAGHKLNFASR(K)
(K)FLDAGHKLNFASR(K)
(K)FLDAGHKLNFASR(K)
(K)FLDAGHKLNFASR(K)
(K)FLDAGHKLNFASR(K)
(K)FLDAGHKLNFASR(K)
(K)FLDAGHKLNFASR(K)
(K)LNFASR(K)
(R)KTFSELDFLESTAGEIPVVAIR(T)
(R)KTFSELDFLESTAGEIPVVAIR(T)
(R)KTFSELDFLESTAGEIPVVAIR(T)
(R)KTFSELDFLESTAGEIPVVAIR(T)
(R)KTFSELDFLESTAGEIPVVAIR(T)
(K)TFSELDFLESTAGEIPVVAIR(T)
(K)TFSELDFLESTAGEIPVVAIR(T)
(K)TFSELDFLESTAGEIPVVAIR(T)
(K)FVMQEEFSR(D)
(K)FVMQEEFSR(D)
(K)FVmQEEFSR(D)
(K)FVmQEEFSR(D)
(K)FVmQEEFSR(D)
(K)FVMQEEFSRDGK(A)
(K)FVMQEEFSRDGK(A)
(R)FLQDYFDGNL(R)
(R)FLQDYFDGNL(R)
(R)FLQDYFDGNLKR(Y)
(R)FLQDYFDGNLKR(Y)
(R)FLQDYFDGNLKR(Y)
(R)FLQDYFDGNLKR(Y)
(R)FLQDYFDGNLKR(Y)
(R)FLQDYFDGNLKR(Y)
(R)YLKSEPIPESNDGPVK(V)
(R)YLKSEPIPESNDGPVK(V)
(K)SEPIPESNDGPVK(V)
(K)SEPIPESNDGPVK(V)
(K)LSKDPNIVIAK(M)
(K)LSKDPNIVIAK(M)
(K)LSKDPNIVIAK(M)
(K)LSKDPNIVIAK(M)
(K)DPNIVIAK(M)
(K)DPNIVIAK(M)

								(K)MDATANDVPSPEYR(G) (K)MDATANDVPSPEYR(G) (R)GFPTIYFSPANK(K) (R)GFPTIYFSPANK(K) (R)GFPTIYFSPANK(K) (R)GFPTIYFSPANK(K) (R)GFPTIYFSPANK(L) (K)KYEGRRELSDFISYLQR(E) (R)ELSDFISYLQR(E) (R)ELSDFISYLQR(E) (R)ELSDFISYLQR(E) (R)EATNPPVIQEEKPK(K)
895	gil112491419	Prolidase	55	9	9	16	24	(K)VPLALFALNR(Q) (K)VPLALFALNR(Q) (R)KNPAVQAGSIVVLQGGEEQQR(Y) (R)KNPAVQAGSIVVLQGGEEQQR(Y) (R)YcTDTGVLFQR(Q) (R)YcTDTGVLFQR(Q) (K)YAVDDVQYVDEIASVLTSQKPSVLLTLR(G) (K)YAVDDVQYVDEIASVLTSQKPSVLLTLR(G) (K)YAVDDVQYVDEIASVLTSQKPSVLLTLR(G) (R)GVNTDSGSVcR(E) (R)VFKTDMELEVLQR(Y) (R)YTNKISSEAHR(E) (R)YTNKISSEAHR(E) (K)AVYEAVLR(S) (K)AVYEAVLR(S) (R)IDEPGLR(S)
895	gil5902134	coronin-1A	51	8	9	12	25	(K)ADQcYEDVR(V) (K)ADQcYEDVR(V) (K)ILTTGFSR(M) (K)ILTTGFSR(M) (R)YFEITSEAPFLHYLSMFSSK(E) (R)YFEITSEAPFLHYLSMFSSK(E) (K)RGLEVNKcEIAR(F) (R)KSDLFQEDLYPPTAGPDPALTAEEWLGGRR(D) (R)DAGPLLISLK(D) (R)DAGPLLISLK(D) (R)AAPEASGTPSSDAVSR(L) (K)RLDRLEETVQAK(-)
895	gil32709	IFP53	53	6	6	7	18	(K)GIDYDKLIVR(F) (R)ATGQRPHHFLR(R) (K)DLTLDQAYSYAVENAK(D) (R)GYPKPALLHSTFFPALQGAQTK(M) (K)ALIEVLQPLIAEHQAR(R) (K)ALIEVLQPLIAEHQAR(R) (R)KLSDFQ(-)

895	gi 119583082	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	51	2	2	2	6.9	(R)ILSADIETIGEILKK(I) (R)LLIHQSLAGGIIGVK(G)
895	gi 15620780	glutamate carboxypeptidase	53	2	2	2	4.4	(K)TGQEIPVNVNR(F) (K)TVFGVEPDLTR(E)
920	gi 2134709	adenylosuccinate lyase	52	10	10	19	31	(K)SNLENIDFK(M) (K)SNLENIDFK(M) (K)SNLENIDFK(M) (R)NALDLLLLPK(L) (R)NALDLLLLPK(L) (R)ASLPTLGFTHFQPAQLTTVGK(R) (R)ASLPTLGFTHFQPAQLTTVGK(R) (R)AFIITGQTYTR(K) (R)AFIITGQTYTR(K) (R)AFIITGQTYTR(K) (R)LLANLKEMEEPFEK(Q) (R)IcLAEAFLTADTILNTLQNISEGLVVYPK(V) (R)VLSQQAASVVK(Q) (R)VLSQQAASVVK(Q) (R)VLSQQAASVVK(Q) (K)QEGGDNDLIER(I) (R)FLEEEVYPLLKPYESVmK(V) (K)VKAELcL(-) (K)VKAELcL(-)
920	gi 4557317	annexin A11	51	11	11	14	27	(R)GTITDAPGFDPLRDAEVLK(K) (R)GTITDAPGFDPLRDAEVLK(A) (K)TILALMK(T) (K)TPVLFDIYEIK(E) (R)LLISLSQGNRDESTNVDSLQQR(D) (R)DAQELYAAGENR(L) (R)DAQELYAAGENR(L) (R)DAQELYAAGENR(L) (R)LGTDESKFNAVLcSR(S) (R)LGTDESKFNAVLcSR(S) (R)SRAHLVAVFNEYQR(M) (R)AHLVAVFNEYQR(M) (R)SETDLLDIR(S) (K)SLYHDISGDTSGDYRK(I)
920	gi 203282367	Enolase 1	47	8	9	14	25	(K)KLVTEQEKIDK(L) (R)IGAENVYHNLK(N) (R)IGAENVYHNLK(N) (R)IGAENVYHNLK(N) (K)AGYTDKVVIGMDVAASEFFR(S) (R)YISPDQLADLYK(S) (R)YISPDQLADLYK(S) (K)ScNcLLLK(V) (K)ScNcLLLK(V)

								(K)VNQIGSVTESLQAcK(L) (K)VNQIGSVTESLQAcK(L) (R)SGETEDTFIADLVVGLcTGQIK(T) (R)IEEELGSK(A) (R)IEEELGSK(A)
920	gi 119607750	fascin homolog 1, actin-bundling protein	49	4	4	6	15	(R)YLAADKDGNVtCeR(E) (R)YLAADKDGNVtCeR(E) (R)LVARPEPATGYTLEFR(S) (R)LVARPEPATGYTLEFR(S) (R)YLAPSGPSGTLK(A) (K)VGKDELFALEQScAQVVLQAANER(N)
920	gi 197692395	RuvB-like 1	50	4	4	6	11	(K)GLGLDESLAK(Q) (K)GLGLDESLAK(Q) (K)QAASGLVGQENAR(E) (R)AVLLAGPPGTGK(T) (R)AVLLAGPPGTGK(T) (R)YSVQLLTPANLLAK(I)
920	gi 119591135	aspartyl aminopeptidase	52	3	3	5	7.2	(R)SPSPFHAVAeCr(N) (R)SPSPFHAVAeCr(N) (R)IPHLAIHLQR(N) (R)YASNAVSEALIR(E) (R)YASNAVSEALIR(E)
920	gi 425518	anti-colorectal carcinoma heavy chain	51	3	3	5	8.3	(K)DVLTTITLTPK(V) (K)DVLTTITLTPK(V) (R)VNSAAFPAPIEK(T) (R)VNSAAFPAPIEK(T) (K)APQVYTIPPPKEQmAK(D)
920	gi 197210452	uridine monophosphate synthetase	52	4	4	4	12	(R)AALGPLVTGLYDVQAFK(F) (K)SGLSSPIYIDLR(G) (K)IASWADLVNAHVVPVPGSGVVK(G) (R)GSDIIIVGR(G)
920	gi 5902134	coronin-1A	51	4	4	4	10	(R)QVALWDTK(H) (K)RGLEVNkcEIAR(F) (R)AAPEASGTPSSDAVSR(L) (K)RLDRLEETVQAK(-)
920	gi 19923748	dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial isoform 1 precursor	49	2	2	2	4.6	(K)AKPAEAPAAAAPK(A) (R)GLVVPVIR(N)
1050	gi 119574488	GTPase, IMAP family member 4	39	14	17	37	50	(K)SATGNSILGR(K) (K)SATGNSILGR(K) (K)SATGNSILGR(K) (R)SSSWKETELVVVDTPGIFDTEVPNAETSKEIIR(C)

								(K)ETELVVVDTPGIFDTEVPNAETSKEIR(C) (R)cILLTSPGPHALLLVVPLGR(Y) (R)cILLTSPGPHALLLVVPLGR(Y) (R)cILLTSPGPHALLLVVPLGR(Y) (R)SFMILIFTR(K) (R)SFMILIFTR(K) (R)SFmILIFTR(K) (R)SFmILIFTR(K) (R)SFmILIFTR(K) (R)SFmILIFTR(K) (R)SFmILIFTR(K) (R)KDDLGDNLHDYLR(E) (R)KDDLGDNLHDYLR(E) (R)KDDLGDNLHDYLR(E) (R)EAPEDIQDLMDIFGDRCALNNK(A) (R)EAPEDIQDLMDIFGDRCALNNK(A) (K)ATGAEQEAQR(A) (R)AQLGLIQR(V) (R)AQLGLIQR(V) (R)AQLGLIQR(V) (K)QTQAMQELHR(V) (R)IREEYEEKIR(K) (R)IREEYEEKIR(K) (R)KLEDKVEQEK(R) (R)KLEDKVEQEK(R) (R)KLEDKVEQEK(R) (R)KLEDKVEQEK(R) (K)KLAEQEAHYAVR(Q) (K)KLAEQEAHYAVR(Q) (K)KLAEQEAHYAVR(Q) (K)LAEQEAHYAVR(Q) (K)LAEQEAHYAVR(Q) (K)LAEQEAHYAVR(Q) (K)LAEQEAHYAVR(Q)
1050	gi 119609192	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35	4	5	9	23	(K)LVINGNPITIFQERDPSK(I) (K)IISNAScTTNcLAPLAK(V) (K)IISNAScTTNcLAPLAK(V) (K)VIHDNFGIVEGLmTTVHAITATQK(T) (K)VIHDNFGIVEGLmTTVHAITATQK(T) (K)VIHDNFGIVEGLmTTVHAITATQK(T) (R)GALQNIIPASTGAAK(A) (R)GALQNIIPASTGAAK(A) (R)GALQNIIPASTGAAK(A)
1050	gi 5031601	actin related protein 2/3 complex subunit 1B	41	5	5	8	18	(R)NAYVWTLK(G) (R)TWKPTLVILR(I) (R)TWKPTLVILR(I) (R)VAVVSHDSTVcLADADKK(M)

								(K)ASSEGGAAGAGLDSLHK(N) (K)ASSEGGAAGAGLDSLHK(N) (K)NSVQISVLSSGGK(A) (K)NSVQISVLSSGGK(A)
1050	gil119600342	aldolase A, fructose-bisphosphate	40	6	6	7	20	(K)GILAADESTGSIK(R) (R)LQSIGTENTEENRR(F) (K)IGEHTPSALAIMENANVLAR(Y) (K)VLAAYK(A) (K)VLAAYK(A) (R)ALQASALK(A) (R)ALANSLAcQGK(Y)
1050	gil119626277	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	41	2	2	5	8.2	(K)FGEVVDcTLK(L) (K)FGEVVDcTLKLDIPITGR(S) (K)FGEVVDcTLKLDIPITGR(S) (K)IFVGGSPDTPEEK(I) (K)IFVGGSPDTPEEK(I)
1050	gil119572233	zyxin	45	3	3	4	10	(R)GPPASSPAPAPK(F) (K)FSPGAPGGSGSQPNQK(L) (K)QHPVPPPAQNQNQVR(S) (K)QHPVPPPAQNQNQVR(S)
1050	gil18645167	annexin A2	39	4	4	4	16	(K)SALSGHLETVILGLL(T) (K)TPAQYDASELK(A) (R)TNQELQEINR(V) (K)TDLEKDIISDTSGDFRK(L)
1050	gil14250401	actin, beta	41	3	3	4	10	(K)AGFAGDDAPR(A) (R)VAPEEHPVLLTEAPLNPK(A) (R)VAPEEHPVLLTEAPLNPK(A) (R)GYSFTTTAER(E)
1050	gil460771	hnRNP-E1	38	3	3	4	10	(R)INISEGNcPER(I) (R)LVVPATQcGSLIGK(G) (K)IANPVEGSSGR(Q) (K)IANPVEGSSGR(Q)
1050	gil13786849	L-Lactate Dehydrogenase	37	2	2	2	6.6	(R)VIGSGcNLDSAR(F) (K)VTLTSEEEAR(L)
1098	gil5453710	LIM and SH3 domain protein 1	30	16	21	44	64	(K)VNcLDKFWHK(A) (K)VNcLDKFWHK(A) (K)AcFHcETcK(M) (K)KPYcNAHYPK(Q) (K)KPYcNAHYPK(Q) (K)QSFTmVADTPENLR(L) (K)QSFTmVADTPENLR(L) (K)QSFTmVADTPENLR(L) (K)QSFTmVADTPENLR(L) (K)QSFTmVADTPENLR(L) (K)QSFTmVADTPENLR(L) (R)LKQQSELSQVR(Y)

								(R)LKQQSELSQVR(Y) (R)LKQQSELSQVR(Y) (R)LKQQSELSQVR(Y) (K)QQSELSQVR(Y) (K)QQSELSQVR(Y) (K)QQSELSQVR(Y) (R)YKEEFEK(N) (R)YKEEFEK(N) (K)GKGFVSVVADTPELQR(I) (K)GKGFVSVVADTPELQR(I) (K)GKGFVSVVADTPELQR(I) (K)GKGFVSVVADTPELQR(I) (K)GFSVVADTPELQR(I) (K)GFSVVADTPELQR(I) (K)GFSVVADTPELQR(I) (K)TQDQISNIK(Y) (K)TQDQISNIK(Y) (K)TQDQISNIK(Y) (K)TQDQISNIKYHEEFEK(S) (K)YHEEFEK(S) (R)mGPSGGEGMEPERR(D) (R)MGPSGGEGMEPERR(D) (R)mGPSGGEGMEPERR(D) (R)mGPSGGEGMEPERR(D) (R)MGPSGGEGmEPERR(D) (R)MGPSGGEGmEPERR(D) (R)RPLEQQQPHHIPTSAVVYQQPQQQPVAQSYGGYKEPAAPVSIQR(S) (R)RPLEQQQPHHIPTSAVVYQQPQQQPVAQSYGGYKEPAAPVSIQR(S) (K)EPAAPVSIQR(S) (R)TGDTGmLPANYVEAI(-) (R)TGDTGmLPANYVEAI(-) (R)TGDTGmLPANYVEAI(-)
1098	gil_13529257	Aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	36	14	15	26	56	(K)mPILGLGTWK(S) (K)mPILGLGTWK(S) (K)SPPGQVTEAVK(V) (K)SPPGQVTEAVK(V) (K)SPPGQVTEAVK(V) (K)VAIDVGYR(H) (K)VAIDVGYR(H) (K)VAIDVGYR(H) (R)HIDcAHVYQNEVEGVAIQEK(L) (K)REELFIVSK(L) (K)REELFIVSK(L) (K)LWcTYHEK(G) (K)AIGISNFNHLQVEMILNKPLK(Y) (K)YKPAVNQIEcHPYLTQEK(L)

								(K)YKPAVNQIEcHPYLTQEK(L) (K)LIQYcQSK(G) (K)LIQYcQSK(G) (K)HNKTTAQVLIR(F) (K)HNKTTAQVLIR(F) (K)TTAQVLIRFPMQR(N) (K)TTAQVLIRFmQR(N) (K)TTAQVLIRFPMQR(N) (R)NLVVIPK(S) (R)NLVVIPK(S) (K)VDFELSSQDMTLLSYNR(N) (R)VcALLScTSHKDYPFHEEF(-)
1098	gi 4506667	60S acidic ribosomal protein PO	34	9	10	18	42	(K)SNYFLK(I) (K)SNYFLK(I) (K)IIQLLDDYPK(C) (K)IIQLLDDYPK(C) (K)IIQLLDDYPK(C) (K)cFIVGADNVGSK(Q) (R)GHLENNPALEK(L) (R)GHLENNPALEK(L) (R)GHLENNPALEK(L) (R)GHLENNPALEK(L) (R)AGAIAPcEVTVPAQNTGLGPEK(T) (K)TSFFQALGITTK(I) (K)TSFFQALGITTK(I) (R)GTIEILSDVQLIK(T) (R)GTIEILSDVQLIK(T) (R)GTIEILSDVQLIK(T) (R)NVASVcLQIGYPTVASVPHSIINGYKR(V) (R)VLALSVDYTFPLAEKVK(A)
1098	gi 110590506	GlyoxylateHYDROXYPYRUVATE REDUCTASE	36	6	6	9	31	(R)AADcEVEQWDSDEPIPAKELER(G) (R)AADcEVEQWDSDEPIPAKELER(G) (R)GVAGAHGLLcLLSDHVDKR(I) (R)ILDAAGANLK(V) (R)ILDAAGANLK(V) (R)RLPEAIEEVK(N) (R)GDVVNQDdLYQALASGK(I) (K)IAAAGLDVTSPEPLTNHPLLTLK(N) (K)IAAAGLDVTSPEPLTNHPLLTLK(N)
1098	gi 5803187	transaldolase	37	5	6	9	17	(R)ILDWHVANTDKK(S) (K)SYELEDPGVK(S) (K)TIVMGASFR(N) (K)TIVmGASFR(N) (K)ALAGcDFLTISPK(L) (K)ALAGcDFLTISPK(L) (K)LLGELLQDNAK(L)

								(K)LLGELLQDNAK(L) (K)LLGELLQDNAK(L)
1098	gi 119620368	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	32	5	5	8	19	(K)VIVVGNPANTNcLTASK(S) (K)VIVVGNPANTNcLTASK(S) (K)ENFScLTR(L) (K)LGVTANDVK(N) (K)LGVTANDVK(N) (K)LGVTANDVK(N) (K)GEFVTTVQQR(G) (K)FVEGLPINDFSR(E)
1098	gi 14141157	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	37	4	4	8	13	(R)STGEAFVQFASK(E) (R)STGEAFVQFASK(E) (K)EIAENALGK(H) (K)EIAENALGK(H) (K)EIAENALGK(H) (R)VHIDIGADGR(A) (R)DGMDNQGGYGSVGR(M) (R)DGMDNQGGYGSVGR(M)
1098	gi 10835063	nucleophosmin isoform 1	33	3	4	5	12	(K)mSVQPPTVSLGGFEITPPVVLRL(L) (K)mSVQPPTVSLGGFEITPPVVLRL(L) (K)GPSSVEDIK(A) (K)FINYVK(N) (K)FINYVK(N)
1098	gi 14043072	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	37	3	3	4	13	(R)GFGFVTDDHDPVDKIVLQK(Y) (R)GGNFGFGDSR(G) (R)GGGGNFGPGPGSNFR(G) (R)GGGGNFGPGPGSNFR(G)
1098	gi 119609192	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35	2	3	4	12	(K)VIHDNFGIVEGLmTTVHAITATQK(T) (K)VIHDNFGIVEGLmTTVHAITATQK(T) (R)GALQNIIPASTGAAK(A) (R)GALQNIIPASTGAAK(A)
1098	gi 118137847	Phosphoribosyl Pyrophosphate Synthetase 1	36	2	2	3	8.9	(R)NcTIVSPDAGGAK(R) (K)IQVIDISmILAEAIRR(T) (K)IQVIDISmILAEAIRR(T)
1098	gi 13786847	L-Lactate Dehydrogenase H Chain	37	2	2	3	9.6	(K)IVVVTAGVR(Q) (R)VIGSGcNLSAR(F) (K)LKDDEVAQLKK(S)
1110	gi 119574954	voltage-dependent anion channel 2	34	10	12	26	33	(R)DIFNKGFGFLVK(L) (K)GFGFLVK(L) (K)ScSGVEFSTSGSSNTDTGK(V) (K)ScSGVEFSTSGSSNTDTGK(V) (K)ScSGVEFSTSGSSNTDTGKVTGTLET(Y) (K)ScSGVEFSTSGSSNTDTGKVTGTLET(Y) (K)ScSGVEFSTSGSSNTDTGKVTGTLET(Y) (K)ScSGVEFSTSGSSNTDTGKVTGTLET(Y) (K)ScSGVEFSTSGSSNTDTGKVTGTLET(Y) (K)LTFDITTFSPNTGK(K) (K)LTFDITTFSPNTGK(K)

								(K)LTFDITTFSPNTGKK(S) (K)LTFDITTFSPNTGKK(S) (K)LTFDITTFSPNTGKK(S) (K)LTFDITTFSPNTGKK(S) (R)NNFAVGYR(T) (R)NNFAVGYR(T) (R)NNFAVGYR(T) (K)YQLDPTASISAK(V) (K)YQLDPTASISAK(V) (K)YQLDPTASISAK(V) (K)VNNSSLIGVGYTQTLRPGVK(L) (K)VNNSSLIGVGYTQTLRPGVK(L) (K)VNNSSLIGVGYTQTLRPGVK(L) (K)VNNSSLIGVGYTQTLRPGVK(L) (K)LTLSALVDGK(S) (K)LTLSALVDGK(S) (K)LTLSALVDGK(S)
1110	gi 18594498	GTPase, IMAP family member 1	34	6	6	11	20	(K)SATGNSILGQR(R) (R)LGATSVTR(A) (R)LGATSVTR(A) (R)LGATSVTR(A) (R)FTAQDQQAVR(Q) (R)FTAQDQQAVR(Q) (R)FTAQDQQAVR(Q) (R)ALRELVAEcGGR(V) (R)ELVAEcGGR(V) (R)ELVAEcGGR(V) (R)EQEAQVEQLLGMVEGLVLEHK(G)
1110	gi 119620368	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	32	5	5	7	20	(K)SQGAALDKYAK(K) (K)VIVVGNPANTNcLTASK(S) (K)VIVVGNPANTNcLTASK(S) (K)ENFScLTR(L) (K)LGVTANDVK(N) (K)LGVTANDVK(N) (K)FVEGLPINDFSR(E)
1110	gi 119589975	calponin 2	32	4	4	4	19	(R)TWIEGLTGLSIGPDFQK(G) (K)GLQSGVDIGVK(Y) (K)AGQcVIGLQMGTKN(C) (K)cASQSGMTAYGTRR(H)
1110	gi 119593674	cytochrome b5 reductase 3	33	2	2	2	9.6	(R)STPAITLESPIKYPLR(L) (R)GPSGLLVYQKG(G)
1139	gi 119625664	annexin A5	33	7	7	11	27	(K)GLGTDEESILTLTSLR(S) (K)GLGTDEESILTLTSLR(S) (R)QEISAAF(K) (R)QEISAAF(K) (R)LYDAYELK(H)

								(R)LYDAYELK(H) (K)VLTEIIASR(T) (K)VLTEIIASR(T) (R)ETSGNLEQLLAVVK(S) (R)SIPAYLAETLYAMK(G) (R)SEIDLFNIR(K)
1139	gi 2343185	tubulin folding cofactor B	27	3	3	4	11	(R)SLTIAEFK(C) (R)LGEYEDVSR(V) (R)LGEYEDVSR(V) (K)YTISQEA YDQR(Q)
1151	gi 15718687	40S ribosomal protein S3	27	8	8	10	40	(K)AELNEFLTR(E) (R)ELAEDGYSGVEVR(V) (R)VTPTRTEIIILATR(T) (R)VTPTRTEIIILATR(T) (R)IRELTA VVQKR(F) (R)FGFPEGSVELYAEK(V) (R)GLcAIAQAESLR(Y) (R)GLcAIAQAESLR(Y) (K)LLGGLAVR(R) (K)GGKPEPPAMPQPVP TA(-)
1151	gi 119568486	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 1	31	2	2	2	7.4	(K)NTFSSGSDLNAVK(S) (R)LVEIIGSR(Q)
1154	gi 4826659	F-actin-capping protein subunit beta	31	13	16	26	47	(R)RLPPQQIEK(N) (R)RLPPQQIEK(N) (R)RLPPQQIEK(N) (R)DKVVGKDYLLcDYNR(D) (K)DYLLcDYNR(D) (R)SPWSNKYDP PLEDGAMP SAR(L) (R)SPWSNKYDP PLEDGAmP SAR(L) (R)SPWSNKYDP PLEDGAMP SAR(L) (R)KLEVEANNAFDQYR(D) (R)KLEVEANNAFDQYR(D) (K)LEVEANNAFDQYR(D) (K)SGSGTMNLGGS LTR(Q) (K)SGSGTMNLGGS LTR(Q) (K)SGSGTmNLGGS LTR(Q) (K)SGSGTMNLGGS LTR(Q) (R)QMEKDETVSDcSPHIANIGR(L) (R)LVEDMENKIR(S) (R)LVEDMENKIR(S) (R)STLNEIYFGK(T) (R)STLNEIYFGK(T) (R)STLNEIYFGK(T) (K)TKDIVNGLR(S) (K)TKDIVNGLR(S)

								(K)DIVNGLR(S) (R)SVQTFADK(S) (R)SVQTFADK(S)
1154	gi 157168362	purine nucleoside phosphorylase	32	6	7	10	25	(R)LVFGFLNGR(A) (R)FGDRFPAMSDAYDR(T) (R)FGDRFPAMSDAYDR(T) (K)LGADAVGMSTVPEVIVAR(H) (K)LGADAVGMSTVPEVIVAR(H) (K)LGADAVGmSTVPEVIVAR(H) (R)VFGFSLITNK(V) (R)VFGFSLITNK(V) (K)VIMDYESLEK(A) (K)ANHEEVLAAGK(Q)
1154	gi 149243076	Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 8, Hsd17b8	27	2	2	2	11	(R)SALALVTGAGSGIGR(A) (K)VGNVQGTNYAASK(A)
1232	gi 2507187	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	25	9	10	14	62	(K)SGGASHSELIHNLR(K) (K)SGGASHSELIHNLR(K) (K)VFEVMLATDR(S) (K)ALDVGGSGGILTAcFAR(M) (K)ALDVGGSGGILTAcFAR(M) (K)VIGIDHIKELVDDSINNVR(K) (K)ELVDDSINNVR(K) (R)KDDPTLLSSGR(V) (R)VQLVVG DGR(M) (R)VQLVVG DGR(M) (R)VQLVVG DGR(M) (R)mGYAEEAPYDAIHVGAAAPVVPQALIDQLKPGGR(L) (R)LILPVG PAGGNQM LEQYDKLQDGSIK(M) (R)LILPVG PAGGNQM LEQYDKLQDGSIK(M)
1232	gi 15431303	60S ribosomal protein L9	22	4	4	5	25	(K)TILSNQTVDIPENV DITLK(G) (R)TVIVKGPR(G) (R)TVIVKGPR(G) (R)TicSHVQNM IK(G) (K)FLDGIYVSEK(G)
1232	gi 1174149	small GTP binding protein Rab7	23	3	3	3	17	(K)VII LGDSGVGK(T) (K)ATIGADFLTK(E) (K)EAINVEQAFQTIAR(N)
1232	gi 119616745	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	21	2	2	3	12	(K)TLLGDGPVVTDPK(A) (K)TLLGDGPVVTDPK(A) (K)TLLGDGPVVTDPKAPNVVTR(L)
1232	gi 7546411	Manganese Superoxide Dismutase	22	2	2	2	18	(K)HHAAYVNNLNVT EEKYQEALAK(G) (K)GDVTAQJALQPALK(F)
1254	gi 392959	LMP-2	21	5	7	15	32	(R)VSAGEAVVNR(V) (R)VSAGEAVVNR(V) (R)VSAGEAVVNR(V)

								(R)VFDKLSPLHER(I) (R)VFDKLSPLHER(I) (R)FTTDAIALAMSR(D) (R)FTTDAIALAmSR(D) (R)FTTDAIALAMSR(D) (R)FTTDAIALAmSR(D) (R)DGSSGGVIYLVTTAAGVDHR(V) (R)DGSSGGVIYLVTTAAGVDHR(V) (R)DGSSGGVIYLVTTAAGVDHR(V) (R)VILGNELPK(F) (R)VILGNELPK(F) (R)VILGNELPK(F)
1254	gi 2662291	cytochrome b5	16	3	3	5	40	(K)GQEVETSVTYR(L) (K)GQEVETSVTYR(L) (R)NSLKELWLVHGR(V) (R)FLNEHPGGEVLEEQAGVDASESFEDVGHSSDAR(E) (R)FLNEHPGGEVLEEQAGVDASESFEDVGHSSDAR(E)
1254	gi 32189392	peroxiredoxin-2	20	3	3	5	20	(R)KEGGLPLNIPLADVTR(R) (K)TDEGIAYR(G) (R)QITVNDLPVGR(S) (R)QITVNDLPVGR(S) (R)QITVNDLPVGR(S)
1254	gi 4502171	adenine phosphoribosyltransferase	20	2	2	2	10	(R)AAIGLLAR(H) (R)IDYIAGLDSR(G)
1276	gi 21624607	coactosin-like protein	16	8	9	13	42	(R)AAYNLVR(D) (R)FTTG DAMSK(R) (R)FTTG DAMSKR(S) (R)FTTG DAMSKR(S) (R)SKFALITWIGENVSLQR(A) (R)SKFALITWIGENVSLQR(A) (K)TGTDKTLVKEVVQNF(AK)(E) (K)TLVKEVVQNF(AK)(E) (K)EVVQNF(AK)(E) (K)EVVQNF(AK)(E) (K)EVVQNF(AK)(E) (K)EFVISDRK(E) (K)EFVISDRK(E)
1276	gi 4502171	adenine phosphoribosyltransferase	20	6	7	12	36	(R)SFPDFPTPGVVFR(D) (R)DISPVLKDPASFR(A) (R)DISPVLKDPASFR(A) (R)DISPVLKDPASFR(A) (R)AAIGLLAR(H) (R)AAIGLLAR(H) (R)AAIGLLAR(H) (K)ATHGGRIDYIAGLDSR(G) (K)ATHGGRIDYIAGLDSR(G)

								(R)IDYIAGLDSR(G) (R)IDYIAGLDSR(G) (R)EK LAPVPFFSLLQYE(-)
1276	gil32189392	peroxiredoxin-2	20	7	7	11	33	(K)ATAVVDGAFKEVK(L) (R)KEGGLGPLNIPLLDVTR(R) (R)KEGGLGPLNIPLLDVTR(R) (R)RLEDYGV LKTDEGIAYR(G) (R)LSEDYGV LK(T) (R)LSEDYGV LKTDEGIAYR(G) (K)TDEGIAYR(G) (K)TDEGIAYR(G) (R)QITVNDLPVGR(S) (R)QITVNDLPVGR(S) (R)QITVNDLPVGR(S)
1276	gil238538004	Traf6	17	3	3	4	19	(R)LLAEPVPGIK(A) (R)LLAEPVPGIKAEPDESNA R(Y) (K)TNEAQAIETAR(A) (K)TNEAQAIETAR(A)
1276	gil19697925	glia maturation factor gamma	17	2	2	3	15	(R)LVQTAELTK(V) (R)TTDDLTEAWLQEK(L) (R)TTDDLTEAWLQEK(L)
1276	gil157884034	[cu-Zn] Superoxide Dismutase	16	2	3	3	37	(R)HVGDLGNVTADKDG VADVSIEDSVISLSGDHcIIGR(T) (R)HVGDLGNVTADKDG VADVSIEDSVISLSGDHcIIGR(T) (R)TLVVHEKADDLGKGGNEESTK(T)

Anexo 4. Lista total de proteínas identificadas y número de acceso en Uniprot

Spot #	GI #	Protein name	Uniprot Accession #
1098	gi 10835063	nucleophosmin	P06748
626	gi 10863945	X-ray repair cross-complementing protein 5	P13010
1098	gi 110590506	GlyoxylateHYDROXYPYRUVATE REDUCTASE	Q9UBQ7
895	gi 112491419	Prolidase	P12955
800, 805, 823, 832, 839, 853, 862	gi 11493459	Serum albumin	P02768
832	gi 11527777	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	P14866
1232	gi 1174149	small GTP binding protein Rab7	P51149
1098	gi 118137847	Phosphoribosyl Pyrophosphate Synthetase 1	P60891
1151	gi 119568486	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 1	Q96DC8
1050	gi 119572233	zyxin	Q15942
1050	gi 119574488	GTPase, IMAP family member 4	Q9NUV9
1110	gi 119574954	voltage-dependent anion channel 2	P45880
740	gi 119580852	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6 (Ku autoantigen, 70kDa)	P12956
893	gi 119581533	drebrin-like	Q9UJU6
895	gi 119583082	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978
1110	gi 119589975	calponin 2	Q99439
920	gi 119591135	aspartyl aminopeptidase	Q9ULA0
1110	gi 119593674	cytochrome b5 reductase 3	P00387
832, 853	gi 119594330	CD5 antigen	P06127
832	gi 119594345	dihydroxyacetone kinase 2	Q3LXA3
853	gi 119594723	EH-domain containing 1	Q9H4M9
823, 832, 839, 853	gi 119598292	pyruvate kinase, muscle	P14618
1050	gi 119600342	aldolase A, fructose-bisphosphate	P04075
920	gi 119607750	fascin homolog 1, actin-bundling protein	Q16658
893	gi 119608775	tubulin, beta 2C	Q8N6N5
1050, 1098	gi 119609192	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406
1232	gi 119616745	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	P52566
1098, 1110	gi 119620368	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	P40925
1139	gi 119625664	annexin A5	P08758
1050	gi 119626277	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	Q14103
1098	gi 13529257	Aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	P15121
1098, 1050	gi 13786847	L-Lactate Dehydrogenase	P07195
1098	gi 14043072	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 isoform B1	P22626
1098	gi 14141157	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	P31942
1050	gi 14250401	actin, beta	P60709
740	gi 14603253	Phosphoglucomutase 2	Q96G03
1154	gi 149243076	Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 8, Hsd17b8	Q92506
1232	gi 15431303	60S ribosomal protein L9	P32969
895	gi 15620780	glutamate carboxypeptidase	Q04609
1154	gi 157168362	purine nucleoside phosphorylase	P00491
1151	gi 15718687	40S ribosomal protein S3	P23396
1276	gi 157884034	[cu-Zn] Superoxide Dismutase	P00441
740	gi 167614506	plastin -2	P13796

893	gi 167887751	vimentin	P08670
893	gi 18088719	Tubulin, beta	P07437
1110	gi 18594498	GTPase, IMAP family member 1	Q8WWP7
1050	gi 18645167	annexin A2	P07355
805	gi 189428	phosphatase 2A regulatory subunit	P30153
805, 853	gi 189502784	mitochondrial heat shock 60kD protein 1 variant 1	P10809
1276	gi 19697925	glia maturation factor gamma	O60234
920	gi 197210452	uridine monophosphate synthetase isoform I	P11172
920	gi 197692395	RuvB-like 1	Q9Y265
920	gi 19923748	dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	P36957
862	gi 20070125	protein disulfide-isomerase precursor	P07237
832	gi 20151189	Glutamate Dehydrogenase	P00367
920	gi 203282367	Enolase 1	P06733
920	gi 2134709	adenylosuccinate lyase	P30566
1276	gi 21624607	coactosin-like protein	Q14019
862, 893, 895	gi 220702506	TapasinERP57 HETERODIMER	O15533
1139	gi 2343185	tubulin folding cofactor B	Q99426
455	gi 23510338	ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	P22314
1276	gi 238538004	Traf6	Q9Y4K3
1232	gi 2507187	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	P22061
1254	gi 2662291	cytochrome b5	P00167
1254, 1276	gi 32189392	peroxiredoxin-2	P32119
853	gi 32483399	serine/threonine-protein kinase PAK 2	Q13177
895	gi 32709	IFP53	P23381
1254	gi 392959	LMP-2	P28065
920	gi 425518	anti-colorectal carcinoma heavy chain	
1254, 1276	gi 4502171	adenine phosphoribosyltransferase	P07741
853	gi 4502643	T-complex protein 1 subunit zeta	P40227
1098	gi 4506667	60S acidic ribosomal protein P0	P05388
832	gi 4557014	catalase	P04040
920	gi 4557317	annexin A11 isoform 1	P50995
1050	gi 460771	hnRNP-E1	Q15365
839	gi 4757810	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	P25705
1154	gi 4826659	F-actin-capping protein subunit beta	P47756
1050	gi 5031601	actin related protein 2/3 complex subunit 1B	O15143
1098	gi 5453710	LIM and SH3 domain protein 1	Q14847
1098	gi 5803187	transaldolase	P37837
862, 895, 920	gi 5902134	coronin-1A	P31146
1232	gi 7546411	Manganese Superoxide Dismutase	P04179

Anexo 5. Resultados del análisis bioinformático utilizando la herramienta DAVID

GO term identifier	# of Proteins	p-Value	Cluster Enrichment Score
GO:0006091~generation of precursor metabolites and energy	11	1.1 E-5	5
GO:0007010~cytoskeleton organization	12	3.4 E-5	3.62
GO:0006732~coenzyme metabolic process	7	3.1 E-5	3
GO:0042981~regulation of apoptosis	16	4.0 E-5	2.73
GO:0008380~RNA splicing	7	5.5 E-3	2.03
GO:0044271~nitrogen compound biosynthetic process	8	2.5 E-3	2
GO:0050863~regulation of T cell activation	8	4.4 E-6	1.85
GO:0044092~negative regulation of molecular function	6	4.2 E-2	1.58

Anexo 6. Resultados del análisis bioinformático utilizando la herramienta STRING para identificar procesos biológicos enriquecidos

Biological Process (GO)			
<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
GO:0019674	NAD metabolic process	8	7.12e-07
GO:0055114	oxidation-reduction process	20	2.11e-06
GO:0005996	monosaccharide metabolic process	11	2.69e-06
GO:0006734	NADH metabolic process	6	6.39e-06
GO:0071822	protein complex subunit organization	22	6.39e-06
GO:0019320	hexose catabolic process	6	4.15e-05
GO:0060249	anatomical structure homeostasis	10	9.37e-05
GO:0046364	monosaccharide biosynthetic process	6	9.39e-05
GO:0051186	cofactor metabolic process	10	0.000126
GO:0009117	nucleotide metabolic process	12	0.000128
GO:1901564	organonitrogen compound metabolic process	21	0.000134
GO:0006732	coenzyme metabolic process	9	0.000202
GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy	11	0.000222
GO:0019318	hexose metabolic process	8	0.000255
GO:0009156	ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	6	0.000313
GO:0043933	macromolecular complex subunit organization	23	0.000529
GO:0019637	organophosphate metabolic process	14	0.000595
GO:0051084	de novo posttranslational protein folding	5	0.000638
GO:0019319	hexose biosynthetic process	5	0.000758
GO:0006461	protein complex assembly	15	0.000852
GO:0070271	protein complex biogenesis	15	0.000852
GO:0044764	multi-organism cellular process	13	0.001
GO:0001894	tissue homeostasis	7	0.00129
GO:0006950	response to stress	29	0.00129
GO:0009168	purine ribonucleoside monophosphate biosynthetic process	5	0.00129
GO:0022607	cellular component assembly	20	0.00129
GO:0030029	actin filament-based process	10	0.00129
GO:0042455	ribonucleoside biosynthetic process	6	0.00129
GO:0044085	cellular component biogenesis	21	0.00129
GO:0061621	canonical glycolysis	4	0.00129
GO:1901657	glycosyl compound metabolic process	9	0.00129
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	13	0.00163
GO:0044403	symbiosis, encompassing mutualism through parasitism	13	0.00163
GO:0006082	organic acid metabolic process	14	0.00176
GO:0016051	carbohydrate biosynthetic process	6	0.00189
GO:0009056	catabolic process	19	0.00278
GO:0009161	ribonucleoside monophosphate metabolic process	7	0.00278
GO:0009165	nucleotide biosynthetic process	7	0.00278
GO:0016032	viral process	12	0.00278
GO:0019430	removal of superoxide radicals	3	0.0029
GO:0030036	actin cytoskeleton organization	9	0.0029
GO:0009119	ribonucleoside metabolic process	8	0.00322
GO:0009260	ribonucleotide biosynthetic process	6	0.00322
GO:0006796	phosphate-containing compound metabolic process	19	0.00336
GO:0006000	fructose metabolic process	3	0.00347
GO:0055086	nucleobase-containing small molecule metabolic process	10	0.00361
GO:0006006	glucose metabolic process	6	0.00366
GO:0051259	protein oligomerization	9	0.00384
GO:1901575	organic substance catabolic process	17	0.00441
GO:0006163	purine nucleotide metabolic process	8	0.00463
GO:0071451	cellular response to superoxide	3	0.00463
GO:0006094	gluconeogenesis	4	0.00467
GO:0046129	purine ribonucleoside biosynthetic process	5	0.00508
GO:0007015	actin filament organization	6	0.0063
GO:0050870	positive regulation of T cell activation	6	0.0063
GO:0007010	cytoskeleton organization	12	0.00646
GO:0050863	regulation of T cell activation	7	0.00646
GO:0009060	aerobic respiration	4	0.00734

GO:0016071	mRNA metabolic process	10	0.00788
GO:1902589	single-organism organelle organization	19	0.00792
GO:0000302	response to reactive oxygen species	6	0.00841
GO:0033554	cellular response to stress	17	0.00841
GO:0080135	regulation of cellular response to stress	11	0.00875
GO:0046128	purine ribonucleoside metabolic process	7	0.00883
GO:0051262	protein tetramerization	5	0.00883
GO:0048871	multicellular organismal homeostasis	7	0.00897
GO:0009167	purine ribonucleoside monophosphate metabolic process	6	0.0102
GO:0044712	single-organism catabolic process	12	0.0103
GO:0051704	multi-organism process	20	0.0103
GO:0006897	endocytosis	9	0.012
GO:0006090	pyruvate metabolic process	4	0.0129
GO:0009152	purine ribonucleotide biosynthetic process	5	0.0137
GO:0005975	carbohydrate metabolic process	11	0.016
GO:0006457	protein folding	6	0.016
GO:1902175	regulation of oxidative stress-induced intrinsic apoptotic signaling pathway	3	0.0167
GO:0080134	regulation of response to stress	15	0.0172
GO:0006167	AMP biosynthetic process	2	0.0174
GO:0000398	mRNA splicing, via spliceosome	6	0.0197
GO:0010035	response to inorganic substance	8	0.0204
GO:0009259	ribonucleotide metabolic process	7	0.0205
GO:0050878	regulation of body fluid levels	10	0.0206
GO:0002376	immune system process	18	0.0211
GO:0072522	purine-containing compound biosynthetic process	5	0.0217
GO:0042743	hydrogen peroxide metabolic process	3	0.0231
GO:0043066	negative regulation of apoptotic process	11	0.0251
GO:0015980	energy derivation by oxidation of organic compounds	7	0.0253
GO:0044711	single-organism biosynthetic process	14	0.0253
GO:0030155	regulation of cell adhesion	9	0.0259
GO:0008380	RNA splicing	7	0.0278
GO:0034655	nucleobase-containing compound catabolic process	7	0.0286
GO:0043648	dicarboxylic acid metabolic process	4	0.0286
GO:0051126	negative regulation of actin nucleation	2	0.0303
GO:0044723	single-organism carbohydrate metabolic process	9	0.0324
GO:0006144	purine nucleobase metabolic process	3	0.0328
GO:0072350	tricarboxylic acid metabolic process	3	0.0328
GO:0044710	single-organism metabolic process	28	0.0338
GO:0042981	regulation of apoptotic process	14	0.0364
GO:0072521	purine-containing compound metabolic process	7	0.0365
GO:0006909	phagocytosis	5	0.0375
GO:0075713	establishment of integrated proviral latency	2	0.0375
GO:0034614	cellular response to reactive oxygen species	4	0.0376
GO:0006754	ATP biosynthetic process	3	0.0393
GO:0032501	multicellular organismal process	34	0.0394
GO:0044707	single-multicellular organism process	33	0.0415
GO:0046686	response to cadmium ion	3	0.0415
GO:0001775	cell activation	9	0.042
GO:0051128	regulation of cellular component organization	18	0.043
GO:0051017	actin filament bundle assembly	3	0.0439
GO:0001845	phagolysosome assembly	2	0.0449
GO:0045333	cellular respiration	5	0.0457
GO:2001233	regulation of apoptotic signaling pathway	7	0.0488

Anexo 7. Resultados del análisis bioinformático utilizando la herramienta STRING para identificar las vías enriquecidas

KEGG Pathways			
<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
01100	Metabolic pathways	19	2.29e-05
01200	Carbon metabolism	7	2.29e-05
00620	Pyruvate metabolism	5	4.85e-05
00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	5	0.000284
05130	Pathogenic Escherichia coli infection	4	0.00307
00030	Pentose phosphate pathway	3	0.00597
00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	3	0.00597
01230	Biosynthesis of amino acids	4	0.00615
04145	Phagosome	5	0.00803
00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	3	0.0103
00230	Purine metabolism	5	0.0124
03450	Non-homologous end-joining	2	0.0281
			<i>(less ...)</i>