



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Análisis de la relación ZEB1-CRTAM

TESIS

Que presenta

M. en C. CRYSTELLE ALICIA ROJAS MARQUEZ

**Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS**

en la Especialidad de
Genética y Biología Molecular

Directores de la tesis:

Dra. Esther López Bayghen Patiño

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

México, D.F.

Abril, 2015

ASESORES

Dra. Rosaura Hernández Rivas
Departamento Biomedicina Molecular
CINVESTAV

Dr. Bulmaro Cisneros Vega
Departamento de Genética y Biología Molecular
CINVESTAV

Dr. Jaime García Mena
Departamento de Genética y Biología Molecular
CINVESTAV

Dr. Ezequiel Fuentes Pananá
Hospital Infantil de México Federico Gómez, México DF, México

Este trabajo fue realizado en los
Departamentos de Genética y Biología Molecular
y en el departamento de Biomedicina Molecular
del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional
bajo la dirección de la Dra. Esther López-Bayghen Patiño
y del Dr. Vianney Ortiz Navarrete

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado en parte gracias al apoyo económico otorgado por CONACyT (155518 a E.L.B) y CB 2005-01-48963 (V.O.N.)

Durante la realización de la presente investigación la autora contó con el apoyo de la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

La autora agradece la asistencia técnica de:

Auxiliares de Investigación:

Dra. Miriam Huerta Pérez, DGBM

Victor Rosales en Citometría de flujo

Q.B.P. Ma. Guadalupe Aguilar,

Unidad de Ácidos Nucléicos, DGBM

T. de I. Gerardo Marmolejo González, DET

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi comité tutorial por todo el apoyo, los conocimientos, la paciencia y el tiempo dedicado a la asesoría de este proyecto. Les agradezco fueran parte de mi formación científica.

A mis padres:

Gracias por colgarse la mochila al hombro conmigo cuando emprendo un nuevo viaje. Gracias por las palabras de aliento en los momentos más difíciles y por hacerme saber que siempre estarán allí si los necesito. Los amo.

A mis amigos:

Gracias por el apoyo incondicional, por las increíbles vivencias y “primeramente” por ser mi familia durante 300 días del año.

A mis compañeros de laboratorio gracias por los buenos momentos, el aprendizaje y la compañía.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INDICE	vi
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Inmunidad adaptativa.....	3
Células T.....	3
Eventos durante la estimulación de los linfocitos T	4
Moléculas expresadas durante la activación temprana en linfocitos T.....	5
Regulación de las moléculas expresadas durante la estimulación de los linfocitos T.....	6
ZEB1: una proteína represora que regula la actividad transcripcional	7
Características generales de ZEB1	8
Regulación de la expresión de ZEB1	9
Mecanismos de regulación ejercidos por ZEB1	12
Regulación de la actividad transcripcional de ZEB1.....	14
ZEB1 en la regulación de genes del sistema inmune.....	14
CRTAM (Molécula Asociada A Linfocitos T Restringidos Por Clase I)	16

ANTECEDENTES DIRECTOS.....	19
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
ESQUEMA EXPERIMENTAL.....	27
MATERIAL Y METODOS.....	28
Oligonucleótidos.....	28
Vectores.....	28
Cepas bacterianas	29
Líneas celulares y medios de cultivo	29
Programas bio-informáticos	30
Anticuerpos	30
Activación celular	30
Citometría de Flujo.....	30
Extracción y purificación de DNA plasmídico	31
Transfección transitoria.....	31
Medición del gen reportero Luciferasa.....	31
Mutación sitio dirigida.....	32
Marcaje terminal de oligonucleótidos utilizando el fragmento Klenow	33
Ensayos de retardamiento.....	33
Estadística.....	33
RESULTADOS	34
Localización y efecto funcional de los sitios Zeb-1 localizados en el promotor de CRTAM	34

ZEB1 es capaz de regular negativamente la actividad transcripcional del promotor del gen CRTAM	34
El análisis de mutantes por sustitución en los sitios cajas tipo E reveló su aportación individual en la regulación negativa del gen CRTAM.....	37
La represión ejercida por ZEB1 requiere la unión al elemento caja tipo E canónico en el promotor del gen CRTAM	39
DISCUSION.....	44
CONCLUSIONES.....	50
PERSPECTIVAS	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52
Anexo 1. Artículo aceptado para publicación	57

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla 1. Principales diferencias entre linfocitos T citotóxicos y T ayudadores	3
Figura 1. Señalización en la estimulación del linfocito T.....	5
Figura 2. Cinética de expresión de las moléculas de activación temprana en linfocitos T estimulados.	6
Figura 3. PTPasas involucradas en la señalización de la célula T.	7
Figura 4. Representación gráfica del gen TCF8 y los dominios proteicos a los que da origen cada exón.....	9
Figura 5. ZEB1 contiene dominios represores independientes.....	9
Figura 6. Asa reguladora establecida entre ZEB1-SIP1 y la familia miR-200.....	10
Figura 7. Asa reguladora establecida entre TGF- β -ZEB1/2-miR200 y la familia miR-192.....	11
Figura 8. La regulación ejercida entre ZEB1 y diferentes micro-RNAs promueve eventos opuestos: EMT/troncalidad y la diferenciación epitelial.....	13
Tabla 3. Complejos represores a los que se asocia ZEB1	13
Tabla 4. Modificaciones pos-traduccionales que alteran la actividad de los miembros de la familia de represores zfh-1	14
Tabla 5. ZEB1 durante diferentes etapas del desarrollo, tumores y en el sistema inmune.....	15
Figura 9. Análisis para caracterizar la expresión de CRTAM en células T y tejidos humanos (<i>Northern Blot</i>).	16
Figura 10. Representación gráfica de los dominios de la proteína hCRTAM	17
Figura 11. CRTAM es un nuevo miembro de la familia de proteínas nectinas	18
Figura 12. Dominios diferenciales entra las proteínas Nectinas y tipo nectinas (Necl) y sus funciones.....	19

Figura 13. El gen hCRTAM se expresa temporalmente en células TCD8+ activadas.	20
Figura 14. Representación gráfica de la localización e identidad de los sitios de unión para factores de transcripción en el promotor de CRTAM.	21
Figura 15. Proteínas nucleares de células Jurkat interactúan con el elemento ZEB1d in vitro.	22
Figura 16. La vomitoxina inhibe la formación de complejos de retardamiento con la sonda ZEB1Dr.	23
Figura 17. Actividad funcional de las construcciones CRTAM.	35
Figura 18. El factor de transcripción ZEB1 exógeno reprime la actividad transcripcional del promotor hCRTAM.	36
Figura 19. Efecto de las mutaciones en las cajas E distales y proximales sobre la actividad promotora del gen hCRTAM.	38
Figura 20. Los elementos cajas E proximales no participan en la represión ejercida por ZEB1 en el promotor del gen hCRTAM.	40
Figura 21. La sobreexpresión de ZEB1, previa a la activación linfocitaria, disminuye la expresión de CRTAM.	41
Figura 22. La sobreexpresión de ZEB1, a la par con el estímulo de activación linfocitaria, disminuye la expresión de CRTAM.	42
Figura 23. La sobreexpresión de ZEB1, posterior al estímulo de activación linfocitaria, disminuye la expresión de CRTAM.	43

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AP-1	Proteína activadora 1
ARN	Ácido Ribonucleico
cDNA	DNA complementario
CRTAM	Molécula asociada a linfocitos T restringidos por moléculas del complejo de histocompatibilidad de clase I
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminoetraacético
FITC	Isocianato de fluoresceína
h	hora
ICAM	Moléculas de adhesión intercelular
Ig	Inmunoglobulinas
IgSF	Superfamilia de las Inmunoglobulinas
Kb	Kilobases
KCl	Cloruro de Potasio
LB	Medio Luria-Broth
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MHC	Complejo mayor de Histocompatibilidad
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mm ³	Milímetros cúbicos
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NCAM	Moléculas de adhesión celular neural
NK	<i>Natural Killer</i>
NaCl	Cloruro de sodio

Necl	Familia de las Nectinas y <i>Nectin-like</i>
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
Pb	Pares de bases
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PMSF	Fenil-metil-sulfonyl-fluoruro
PDZ	Proteína de la densidad post sinaptica (PSD95), supresor tumoral del disco largo de <i>Drosophila</i> , proteínas de la Zonula ocludens 1
PKC	Proteína cinasa C
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SynCAM1	Nectin-like2
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletilenediamina
TBS	Solución salina tamponada con Tris
TSLC1	Nectin-like2
VCAM	Moléculas de adhesión vascular
ZEB1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micrómetros
µm ²	Micrómetros cuadrados

RESUMEN

La activación de la célula T dirige la inducción de genes requeridos para una apropiada respuesta inmune. Dentro de estos se encuentra CRTAM (*Class-I MHC restricted T Cell Associated Molecule*), una proteína que juega un papel fundamental durante el desarrollo de la célula T y en la proliferación y la generación de la polaridad celular durante la activación antigénica. CRTAM pertenece a la familia de proteínas *Nectin-like* (Nectin1), contiene un dominio de unión a PDZ que le permite interactuar con proteínas como Scrib y así regular diversos procesos como la polaridad celular. CRTAM se expresa de manera constitutiva en diversos tejidos y órganos como bazo, timo, intestino, etc., y de manera transitoria en células del sistema inmune como TCD8⁺, NKT, TCD4⁺ y neutrófilos. En nuestro grupo, caracterizamos el promotor del gen CRTAM y determinamos que los miembros de la familia AP-1 actúan como activadores transcripcionales que permiten la inducción transitoria de CRTAM durante el proceso de activación linfocitaria. En este trabajo, investigamos los mecanismos moleculares que regulan la expresión de CRTAM, particularmente la regulación negativa del gen. Por medio de ensayos funcionales demostramos que CRTAM es blanco molecular del represor transcripcional ZEB1 (*Zinc finger E-box-binding protein*), un factor de transcripción con dedos de zinc y homeodominio, que actúa como regulador maestro de diversos genes en el sistema inmune. La sobre-expresión de ZEB1 reprime la actividad del promotor de CRTAM así como la expresión endógena en células T de humano. La represión transcripcional mediada por ZEB1 se abate cuando sus elementos de unión al DNA (cajas tipo E) en el promotor de CRTAM son mutados. En conclusión, ZEB1 actúa como un represor transcripcional para el gen CRTAM en células T no estimuladas y estimuladas y de esta manera podría modular la respuesta inmune adaptativa.

ABSTRACT

T cell activation leads to the induction of genes that are required for appropriate immune responses. This includes CRTAM (Class-I MHC-restricted T cell associated molecule), a protein that plays a key role in T cell development, proliferation, and cell polarity generation during activation. CRTAM is a member of the Nectin-like family, its expression is inducible on NKT cells and TCD8⁺ lymphocytes when activated through TCR or mitogenic stimulus. Also, CRTAM is constitutively expressed in some tissues and organs like testis, cerebellum, thymus, liver and spleen, indicative of a differential regulation and expression pattern for CRTAM gene.

We previously characterized the CRTAM promoter and described how AP-1 family members are important for inducing CRTAM expression upon antigenic activation. Here, we show that CRTAM is a molecular target for ZEB1 (zinc finger E-box-binding protein), a homeodomain/Zn finger transcription factor. ZEB1 acts as a master regulator of expression for important immune genes like CD4⁺, IL-2, GATA-3. Several consensus sites for binding of the negative regulator ZEB1 were identified in the CRTAM regulatory region by *in silico* analysis. The regulatory sites consist of two E-box like elements, ZEB1Dr and ZEB1DI, deletion of these elements increase CRTAM transcriptional activity implicating a role in the negative regulation of CRTAM promoter. Overexpression of ZEB1 repressed CRTAM promoter activity, as well as endogenous CRTAM levels in human T cells. ZEB1-mediated transcriptional repression was abolished when E-box-like elements, in the CRTAM promoter, are mutated. In conclusion, ZEB1 functions as a transcriptional repressor for the CRTAM gene in both non-stimulated and stimulated T cells, thereby modulating adaptive immune responses.

INTRODUCCIÓN

Inmunidad adaptativa

Células T

El timo es el sitio en donde los linfocitos se diferencian en células efectoras funcionales [1]. Tras su producción en la médula ósea, los linfocitos migran hacia el timo donde se diferenciarán mediante eventos discriminatorios de selección positiva y negativa [2]. Durante este proceso de diferenciación las células T re-arreglan algunos segmentos génicos para lograr la expresión de una molécula única de unión al antígeno, el TCR, mediante el cual llevan a cabo el reconocimiento de antígenos presentes en el organismo [3]. La mayoría de las células T periféricas expresan un TCR alfa-beta. Estas células responden a un antígeno cuando es presentado en forma de péptidos cortos unidos a moléculas de MHC clase I o II. Los ligandos de las moléculas de clase I alertan al sistema inmune de una infección intracelular mientras que los ligandos de las moléculas de clase II ayudan a combatir las infecciones extracelulares. Los linfocitos T expresan varias proteínas de superficie características además del TCR, conocidas como CDs [3, 4]. De acuerdo a esta dicotomía, las células T maduras alfa-beta comprenden dos linajes, caracterizados por el reconocimiento de péptidos asociados a moléculas de MHC-I o MHC-II, cuyas funciones efectoras están fundamentadas en base a este reconocimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Principales diferencias entre linfocitos T citotóxicos y T ayudadores. Tomado de [5-7].

Célula T	Marcador de superficie	Reconocimiento de antígeno	Función biológica
Ayudadora (T helper, Th)	CD4+	MHC-II	Efecto mediado por citocinas <ul style="list-style-type: none">• Estimulación de macrófagos• Inflamación• Cambio de isotipo de Ig

Citotóxica (T cytotoxic, Tc)	CD8+	MHC-I	Efecto mediado por contacto directo célula-célula <ul style="list-style-type: none"> • Lisis de la célula blanco (perforinas) • Apoptosis de la célula blanco (Fas)
---------------------------------	------	-------	---

Los linfocitos T pueden encontrarse en tres estados funcionales distintos: las células T vírgenes, las células de memoria que han estado en contacto con el antígeno al menos una vez pero que han vuelto posteriormente al estado de reposo o inactivación, preparadas para responder a una re-estimulación. El tercer estado se presenta cuando se pone en marcha la respuesta inmune específica con los linfocitos T efectores, caracterizados por determinados marcadores de estimulación y por su capacidad para llevar a cabo respuestas efectoras que incluyen producción de citocinas y citotoxicidad [8, 9]

Eventos durante la estimulación de los linfocitos T

Las células T “nãive” que no han tenido contacto con un antígeno (también llamadas células en reposo) y tienen un menor grado de síntesis proteica. Dentro de los primeros minutos posteriores al reconocimiento del antígeno, la transcripción *de novo* de genes y la síntesis proteica se incrementan en las células T activadas. Las vías bioquímicas que enlazan el reconocimiento del antígeno con las respuestas de las células T consisten en la activación de enzimas, reclutamiento de proteínas adaptadoras y la producción de factores transcripcionales activos (ejemplo representativo en la Figura 1). Estas vías metabólicas son iniciadas por el entrecruzamiento del TCR y ocurren cerca de este complejo. Este evento dispara vías de transducción de señales que involucran segundos mensajeros, cinasas (PTKs) y fosfatasas (PTPasas). Algunas de estas cascadas de señalización culminan con la inducción de la transcripción de genes, de acuerdo a programas de expresión que son característicos de las diferentes sub-clases de células T, llevando a la diferenciación y proliferación [9, 10].

Moléculas expresadas durante la activación temprana en linfocitos T

La regulación de la respuesta transcripcional inducida por la estimulación linfocitaria incluye la modulación ejercida por un conjunto de factores transcripcionales y co-reguladores de la transcripción que generan modificaciones en el grado de compactación de la cromatina [11]. Los activadores transcripcionales interactúan directamente con complejos co-activadores de la transcripción que muestran entre otras, actividad de histona acetil-transferasa (HAT); de hecho, la acetilación de histonas en los promotores de las citocinas se incrementa después de la estimulación transcripcional [12]. Sin embargo, este incremento tiene una naturaleza transitoria, lo que podría reflejar la sustitución de proteínas activadoras que reclutan HATs por represores que pueden reclutar complejos histona desacetilasa (HDAC) [13].

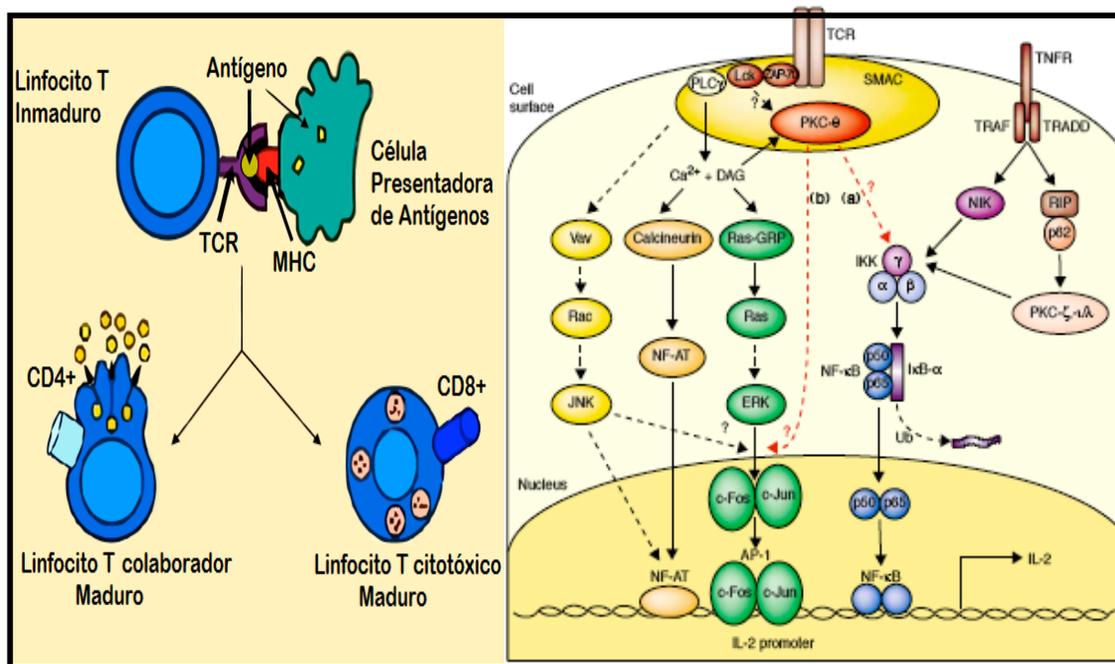


Figura 1. Señalización en la estimulación del linfocito T. PKC-teta juega un papel central, conectando el TCR con transactivadores nucleares como NF- κ B y AP-1. PKC- θ regula la habilidad de las células T periféricas para secretar IL-2 y proliferar tras la estimulación. Modificado de [14].

Para IL-2, CD25 e IFN-gama (interferón gama), moléculas que se regulan a nivel transcripcional, cuya expresión es independiente de proteínas sintetizadas *de novo*, que alcanzan un máximo de expresión e inmediatamente son reguladas a la baja (Figura 2). Este comportamiento es controlado positivamente por los factores de transcripción como

AP-1, NF- κ B y NFAT [15] los cuales son activados por PKC teta fundamentalmente, a través de la señal proveniente del TCR y de CD28 (Figura 1). Esto sugiere que los genes controlados por esta vía responden de manera temprana y son importantes para la función de los linfocitos T [16].

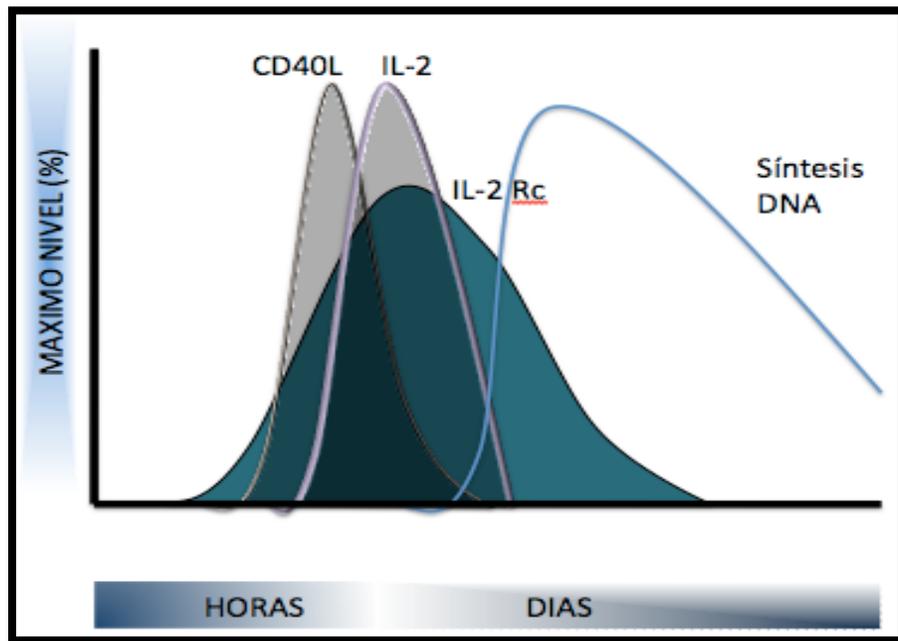


Figura 2. Cinética de expresión de las moléculas de activación temprana en linfocitos T estimulados. Modificado de [17]

Regulación de las moléculas expresadas durante la estimulación de los linfocitos T

Muchas de las respuestas de las células T son mediadas por citocinas, además de diversos receptores y moléculas de superficie que son inducidos durante la estimulación de los linfocitos TCD8+. Las citocinas pueden actuar de forma autócrina o parácrina, mientras que los receptores permiten a las células ser permisibles a los estímulos mediados por éstas [17]. Los principales eventos inducidos por las citocinas median el crecimiento celular, la inflamación, la inmunidad, la diferenciación y la reparación. Debido a que las citocinas regulan la amplitud y duración de las respuestas inmunes inflamatorias

deben ser producidas de manera transitoria y son reguladas principalmente por la presencia de antígenos.

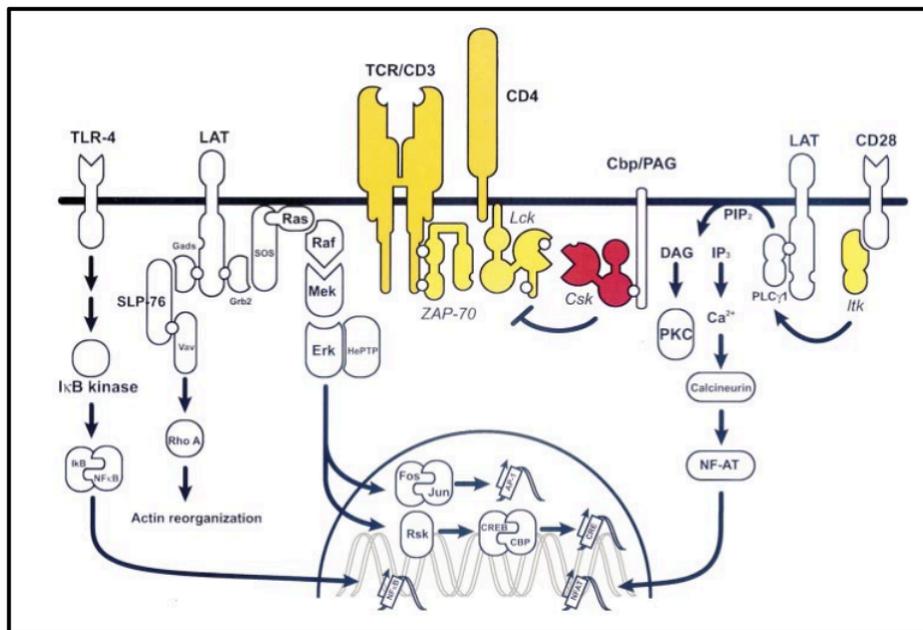


Figura 3. PTPasas involucradas en la señalización de la célula T. Ilustración esquemática de las vías de señalización intracelular y las cinasas involucradas en la activación de la célula T y representación de las funciones de PTPasas en la señalización del TCR. CD45 Y LMPTP desfosforilan los residuos inhibidores en Lck y ZAP-70 y tiene una función activadoras (amarillo), donde otras PTPasas inhiben la señalización de la célula T en varios niveles (rojo) (Modificado de [18]).

ZEB1: una proteína represora que regula la actividad transcripcional

ZEB1 forma parte de la familia Zfh que comprende proteínas con dedos de zinc/homeodominio que fueron inicialmente identificadas en *Drosophila*, donde son requeridas para la adecuada diferenciación de tejidos como el sistema nervioso central y músculo. ZEB1 se encarga de reprimir genes músculo-específico y regular la diferenciación miogénica en vertebrados. De este modo, ZEB1 actúa como un regulador de la diferenciación de tejidos mediante la represión de la transcripción génica [19].

ZEB1 se une a elementos conocidos como cajas tipo E (CANNTG) [20]. Una vez unido a estos sitios en la región promotora de los genes que regula, ZEB1 reprime la transcripción y bloquea los programas de diferenciación celular [19]. ZEB1 también actúa como un

importante regulador del desarrollo de la célula T. El modelo murino que carece de la expresión de ZEB1 presenta una importante reducción en las células tímicas [21].

IL-2 es el clásico y mejor ejemplo de las proteínas expresadas durante la estimulación del linfocito TCD4⁺. En el promotor de IL-2 se encuentra una secuencia conocida como NRE (*Negative Response Element*). En 1991, Williams y colaboradores encontraron, por hibridación sustractiva de una biblioteca de cDNAs, que una proteína con dedos de zinc se une al NRE, y media la represión en condiciones celulares basales [22]. Estudios posteriores confirmaron la identidad de esta proteína de unión al NRE como ZEB1 y establecieron que esta proteína reprime al gen IL-2 durante la activación de células Th1 y reprime a los genes en Th2 [23].

Características generales de ZEB1

La familia ZEB de factores de transcripción en humanos consiste de dos miembros, ZEB1 (deltaEF1, AREB6, NIL-2a, TCF8) y ZEB2 (SIP1); aunque tienen estructuras muy similares, desempeñan diferentes funciones moleculares. Por ejemplo, durante la etapa embrionaria en el ratón, ZEB1 se encuentra involucrado en el desarrollo de los derivados de la cresta neural, el sistema músculo-esquelético y la selección de los linfocitos T; mientras ZEB2 se expresa en células provenientes de la delaminación de la cresta neural y del tubo neural donde participa durante el compromiso de las células progenitoras neuronales [24].

El gen TCF8 (zfhx1a) que codifica a la proteína ZEB1 se encuentra localizado en el cromosoma 10p11.2 de humano y consta de nueve exones en una región de 50Kb. ZEB1 se caracteriza por la presencia de dos conjuntos separados de dedos de zinc tipo CCHH en los extremos amino- y carboxi-terminal de la proteína que permiten su unión al DNA; el primer conjunto está ubicado en el N-terminal y es codificado por los exones 5-7; el segundo conjunto, en el C-terminal es codificado por los exones 8-9. Adicionalmente se sabe que el exón 7 codifica para la porción media de la proteína que constituye un homeodominio (Figura 4) [25]. Se ha dividido a la proteína ZEB1 en tres dominios funcionales: DB 1 y DB 2 (*DNA Binding Domain*); y RD (*Repressor Domain*) (Figura 5).

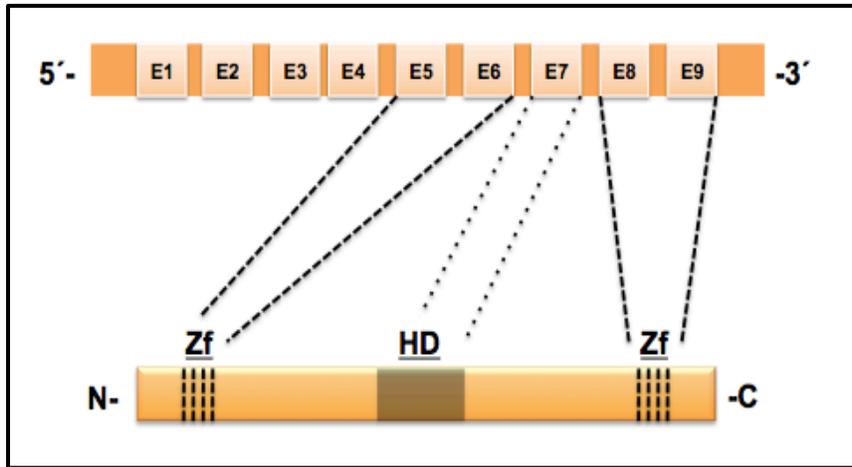


Figura 4. Representación gráfica del gen TCF8 y los dominios proteicos a los que da origen cada exón. (Modificado de [25]).

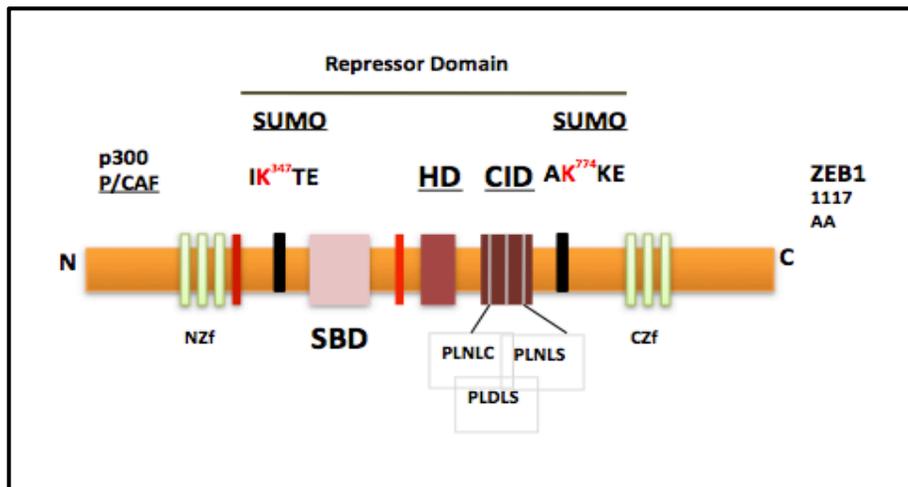


Figura 5. ZEB1 contiene dominios represores independientes. El dominio represor (RD) abarca la porción media de la proteína (AA 302-903); en este dominio se localiza la región 1 (AA 302-542), la región 3 (AA 760-903) y el dominio CID (*CtBP Interacting Domain*); (DB: *DNA Binding Domain*). Modificado de [26].

Regulación de la expresión de ZEB1

ZEB1 se expresa de manera transitoria o estable según la estirpe celular. En el caso de los linfocitos TCD4⁺ se expresa de manera estable. En cambio, en células epiteliales su expresión se asocia con fenómenos celulares malignos como la transición epitelio-

mesenquimal (EMT), donde ZEB1 juega un papel fundamental reprimiendo la expresión de la proteína e-caderina [27].

La citocina TGF-beta, el producto metabólico PGE2 y algunas señales de stress como la hipoxia promueven la expresión de ZEB1 [28-30]. Transcripcionalmente, algunos factores ubicuos son capaces de mediar la expresión de ZEB1, entre ellos p65, AP-1, Ets, Smad3, Jagged-1, etc. [31-34]. Además la regulación pos-transcripcional de ZEB1 parece ser clave en diferentes tipos de cáncer.

Diversos grupos han caracterizado la expresión de diversas familias de microRNAs como marcadores de células cancerosas y normales y existe particular interés en la familia miR-200 [35]. Esta familia de microRNAs inhibe la migración e invasión de líneas celulares provenientes de cánceres, y su expresión se relaciona con la presencia de marcadores de diferenciación. ZEB1 es un blanco directo de miR-200, además se ha demostrado que este factor inhibe la transcripción de dos miembros de la familia, miR-141 y miR-200c (Figura 6) [36-40].

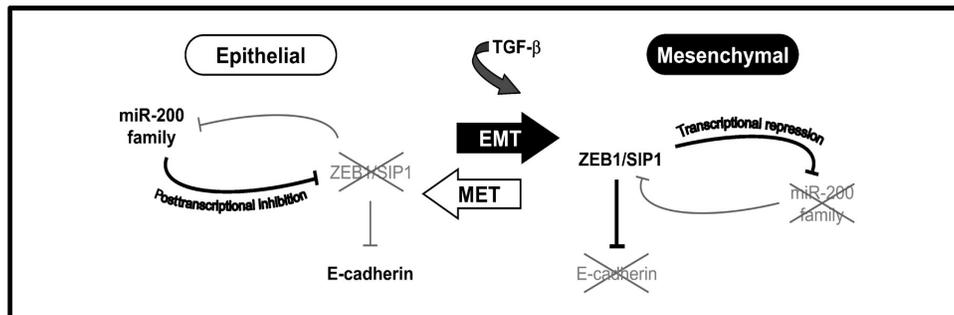


Figura 6. Asa reguladora establecida entre ZEB1-SIP1 y la familia miR-200 (tomado de [37]).

Existe poca información con respecto a la regulación de la expresión de ZEB1 durante la diferenciación de la célula T. En 1994, Christ y colaboradores encontraron que el ratón carente del gen TGF-β1 desarrolla un síndrome de agotamiento progresivo que culmina con la muerte. Las principales características asociadas son la presencia de un timo hipocelular e incremento en el número de células diferenciadas; en los nódulos linfáticos existe un incremento de células con un fenotipo de activación (CD45Rb^{low}/CD4⁺) las cuales expresan espontáneamente el mensajero de citocinas como IL-2 y TNF-α. La expresión y producción de la citocina IL-2 se observa aumentada con respecto al control

en diversos tejidos linfoides como bazo, timo, nódulos linfáticos y en esplenocitos y timocitos en cultivo [41]. Estos datos permiten establecer una clara relación entre la expresión de TGF- β 1 y la función de ZEB1 durante el desarrollo de la célula T. La elevada expresión de IL-2 en tejidos y células de estirpe linfóide indica la pérdida en la regulación negativa mediada por ZEB1. La relación entre la expresión de ZEB1 y TGF- β 1 ha sido ampliamente demostrada en modelos de cáncer (Figura 7) [39].

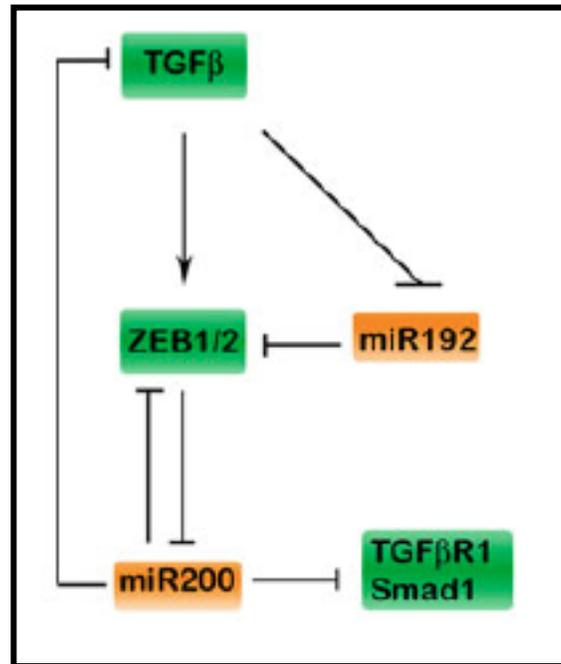


Figura 7. Asa reguladora establecida entre TGF- β -ZEB1/2-miR200 y la familia miR-192 (tomado de [37]).

Durante la estimulación del linfocito T mediada por el TCR y el co-receptor CD28 se induce de manera selectiva a la proteína PKC- θ , la cual activa diversos factores transcripcionales como NF- κ B, lo que culmina con la inducción de diversos genes de respuesta inmune [42]. Recientemente, Sutcliffe y colaboradores mostraron que PKC- θ se transloca al núcleo y se recluta de manera dependiente de la activación a los promotores proximales de genes inducibles en la célula T, por ejemplo CD69, TNF- α , IFN- γ , heparanasa y también a genes de microRNAs. La expresión de los RNAs mensajeros de tres microRNAs blancos de PKC- θ (miR-200c, miR-9 y miR-183) se encontraron inversamente relacionados con la activación de la célula T y la sobreexpresión de PKC- θ .

De tal manera que la sobre-expresión de miR-200c reprime la expresión de ZEB1 en células T no estimuladas y estimuladas, permitiendo un aumento en la expresión de IL-2 en células estimuladas [43, 44].

Finalmente en eventos de infección viral se ha observado que la expresión de ZEB1 se ve favorecida. Durante la infección de citomegalovirus humano la expresión de ZEB1 aumenta 43 veces con respecto al control, dicho aumento se relaciona con la represión de la citocina IL-2 durante la infección [45].

Mecanismos de regulación ejercidos por ZEB1

ZEB1 puede ejercer una represión pasiva o activa [46]. Esta proteína puede funcionar como un represor pasivo al bloquear por competencia la unión de un activador a su sitio de unión al DNA. Los trabajos de varios grupos han demostrado que ZEB1 también puede funcionar como un represor activo ya que bloquea de manera individual los efectos de otros activadores como Ets y c-myb (presentes en sitios cercanos) durante la regulación del gen de la alfa-4 integrina [47]. ZEB1 puede interactuar con dos complejos asociados a la represión de genes (Tabla 3).

ZEB1 también reprime la expresión de miR-203, el cual regula la expresión de factores asociados con características troncales como Sox2 y Klf4 [48]. Así, ZEB1 promueve la motilidad de las células cancerosas y la adquisición de propiedades troncales que permiten su migración (figura 8). ZEB1 puede activar la transcripción del microRNA mir-21 [49], la función de este último se asocia con la disminución celular de la fosfatasa PTEN [50], la cual es importante para modular la función biológica de PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) [51].

ZEB1 coopera con el co-represor CtBP2 y con la HDAC1 para reprimir al promotor de la citocina IL-2 [52]. La disminución de ZEB1 por la expresión ectópica de mir200c se relaciona con el aumento de e-caderina total, sin embargo ZEB1 continua unido al promotor de e-caderina [53]. La expresión ectópica de mir200c disminuye también a la proteína SIRT1, resultando en la expresión de e-caderina, lo que sugiere la participación de SIRT1 en la represión de dicho gen [53, 54]. Este evento parece no estar aislado, ya que células T provenientes del ratón *knock-out* para la proteína SIRT1, presentan una mayor activación, caracterizada por un aumento en la producción de la citocina IL-2 [55].

Finalmente el tratamiento con inhibidores de desacetilasa de histonas permite la expresión de e-caderina y la familia mir-200 en células tumorales [56]. Esto sugiere que ZEB1 necesita de la participación de complejos co-represores para mediar su función represora.

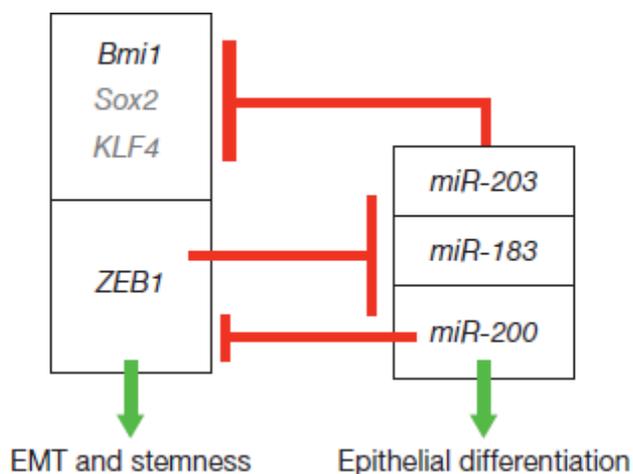


Figura 8. La regulación ejercida entre ZEB1 y diferentes micro-RNAs promueve eventos opuestos: EMT/troncalidad y la diferenciación epitelial. (Tomado de [48])

Tabla 3. Complejos represores a los que se asocia ZEB1

Complejo al que se asocia	Gen regulado	Referencia
CtBP1/2 (que puede interaccionar con proteínas de los complejos HDAC ó PcG (PC2))	Genes dependientes de TGF-beta durante el desarrollo de <i>Xenopus</i>	[57-61]
LSD1/CoREST/CtBP (asociado a este complejo la proteína PC2)	Hormona del crecimiento	[57, 62]

*Abreviaturas: CtBP1/2 (C-terminal binding protein 1/2); HDAC (*Histone Desacetylase complex*); PcG (*Polycomb Group*); PC2 (*Polycomb 2*); LSD1 (*Lysine-specific desmethylase 1*); CoREST (*corepressor of REST/NRSF*); TGF-beta (*Transforming Growth Factor-Beta*).

Regulación de la actividad transcripcional de ZEB1

La actividad de varios factores transcripcionales es regulada por modificaciones pos-traduccionales como la fosforilación, glicosilación, ubiquitinación, sumoilación, etc. Estas modificaciones pueden modular la afinidad de los factores por co-activadores, co-represores o por los complejos basales de la transcripción. Esto puede ocurrir al bloquear directamente una interacción a causa de un residuo modificado, o por un cambio conformacional que modifique la superficie de interacción, o al causar la disociación de una molécula inhibidora [63]. Para el caso de ZEB1 se han descrito dos modificaciones pos-traduccionales que alteran su actividad represora las cuales se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Modificaciones pos-traduccionales que alteran la actividad de los miembros de la familia de represores zfh-1

Proteína	Modificación	Actividad mediada	Gen	Referencias
ZEB1	Fosforilación	*Disminuye unión al DNA *No reclutamiento de CtBP	IL-2	[64, 65]
ZEB1	Sumoilación	Aumenta la capacidad represora	GH (growth hormone)	[57]
SIP1 (ZEB2)	Sumoilación	Disminuye la capacidad represora	E-caderina	[33]

*La fosforilación ha sido sugerida como el posible mecanismo que media la actividad en el gen de IL-2. Se han reportado los estados hipo- e hiperfosforilados de la proteína al igual que los sitios de modificación, por lo que se sugiere podrían intervenir en el reclutamiento de CtBP.

ZEB1 en la regulación de genes del sistema inmune

En su conjunto, la Tabla 5 muestra las capacidades reguladoras de ZEB1 en diferentes eventos, sistemas y tejidos; asimismo, pone de manifiesto la importancia de ZEB1 como regulador negativo de la transcripción durante el desarrollo y funcionalidad de un gran número de células, incluyendo las células del sistema inmune.

Tabla 5. ZEB1 durante diferentes etapas del desarrollo, tumores y en el sistema inmune

Etapa o evento implicado	Función	Genes blanco
Desarrollo embrionario y diferenciación celular	*Formación del corazón *Diferenciación de neuronas motoras *Formación y migración de células embrionarias gonadales *Síntesis de colágena en osteoblastos. *Desarrollo de células del esqueleto. *Diferenciación de células musculares	Eve Pro- α (1) colágeno Alfa-7-integrina Troponina
Tumores	Transición epitelio-mesénquima	E-caderina.
Sistema inmune	Desarrollo de los linfocitos T	CD4 Cadena pesada de las inmunoglobulinas (Ig) IL-2 GATA-3 Alfa-4- integrina

Originalmente ZEB1 se descubrió como un posible represor del gen de IL-2 [22]. Los estudios posteriores confirmaron su actividad represora para el gen IL-2 durante la estimulación de células Th1 y la represión del gen en las células Th2 [23]. ZEB1 también regula la actividad del potenciador de la cadena pesada de las inmunoglobulinas [20], del gen GATA-3 [66] y de la α -4 integrina [47]. Adicionalmente, la expresión del gen CD4 en células T está controlada negativamente por ZEB1 [67].

ZEB1 es un factor crítico para el desarrollo de las células T. El ratón mutante (δ EF1 Δ C 727), que produce una forma truncada de la proteína carente del conjunto de dedos de zinc del C-terminal, muestra una severa hipocelularidad en el timo acompañada de defectos en el desarrollo de los timocitos. Esto se debe a una eliminación de los precursores T c-kit⁺. Aunado a esto, los timocitos mutantes también muestran una expresión elevada de la α -4 integrina, (importante en la migración de los linfocitos desde la médula ósea hasta el timo y en el desarrollo intratímico de los mismos). Todo esto sugiere que la de-represión de este gen, debido a la mutación de δ EF1, afecta la llegada de los linfocitos T al timo y su desarrollo una vez que se encuentran allí [68]. En los órganos linfoides secundarios también se observa una reducción significativa de los linfocitos TCD8⁺, en comparación con los CD4⁺. En contraste, los linfocitos B se

desarrollan de forma normal [68] porque la eliminación de ZEB1 es compensada por la presencia de ZEB2 en este linaje [69] (Tabla 5). Recientemente Arnold y colaboradores encontraron resultados similares a los descritos anteriormente. Mediante el uso de mutagénesis química obtuvieron una transversión T-A en el exón 7 de ZEB1 que produce un codón de paro prematuro. Las características principales de este ratón incluyen alteraciones en las sub-poblaciones tímicas, disminución de células NK en el bazo, células B en la zona marginal y casi una completa falta de células B-B1 peritoneales [70]. Contrario a los reportes previos estos resultados destacan la participación de ZEB1 en la diferenciación de la célula B.

CRTAM (Molécula Asociada a Linfocitos T Restringidos por Clase I)

CRTAM (class I-restricted T cell-associated molecule) o molécula asociada a linfocitos T restringidos por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I, fue descubierta en el año 2000 por Kennedy y colaboradores. Mediante la hibridación substractiva de los RNA mensajeros expresados en linfocitos TCD8+ y células NKT activadas y no activadas, estos autores identificaron un nuevo miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig-SF): CRTAM; ésta es una molécula expresada abundantemente en células NKT dobles negativas (DN), CD4+ y linfocitos TCD8+ convencionales, y en diferentes tejidos (Figura 9)

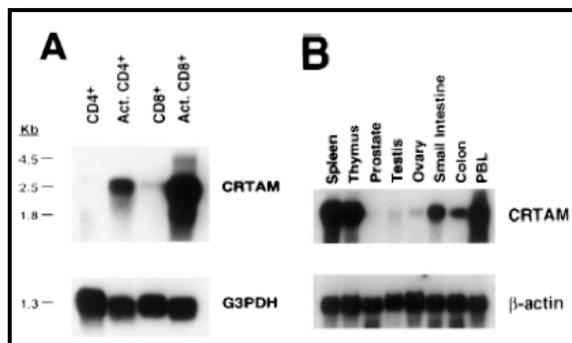


Figura 9. Análisis para caracterizar la expresión de CRTAM en células T y tejidos humanos (Northern Blot). (A) RNA total de PBL CD4+ y CD8+ purificados con o sin Ionomicina y PMA, sondas para CRTAM y GAPDH. (B) mRNA de bazo, timo, próstata, testículos, ovario, intestino Delgado, colon, y PBL sin estímulo, sondas para CRTAM y beta-actina [71].

El gen que codifica para la proteína CRTAM de humano se localiza en el cromosoma 11q21-22; tiene una homología del 72.4% con el de ratón (localizado en el cromosoma 9), y codifica para una proteína de 393 aa, con un peso molecular de 44 kDa.

CRTAM es una proteína tipo I transmembranal que contiene dominios de Ig variables y constantes (Figura 10) [72]; además contiene un dominio PDZ clase I, altamente conservado y capaz de establecer la interacción y el ensamblaje de grandes complejos de proteínas, incluidos en eventos como la adhesión, la polaridad y la proliferación celular [71, 73, 74].

CRTAM se clasifica como un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas [71] y muestra un 30% en identidad y 55% de similitud con miembros de la familia de proteínas *Nectin* y *Nectin-like* (Nectin-I) (Figura 11) [73]. Las nectinas son una familia de moléculas de adhesión celular tipo inmunoglobulina que median interacciones independientes de Ca^{2+} , estas pueden formar complejos de manera homotípica y heterotípica resultando en la adhesión celular. Existen cinco moléculas tipo nectina (*Nectin-like* o *necls*) que tienen estructuras y dominios similares a las nectinas, aunque parecen jugar papeles diferentes a las nectinas (Figura 12 A y B) [75, 76].

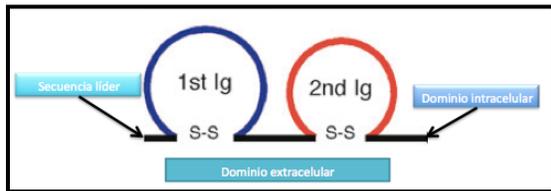


Figura 10. Representación gráfica de los dominios de la proteína hCRTAM. Modificado de [73].

En el 2005, Arase y colaboradores encontraron que CRTAM tiene como ligando a la proteína TSLC1/NECL-2, con la cual lleva a cabo una interacción heterotípica. La interacción CRTAM-Necl2 promueve la citotoxicidad de las células NKT y la secreción de interferón gama por las células TCD8+, además de mediar el rechazo celular de tumores que expresan Necl-2 *in vivo* [77].

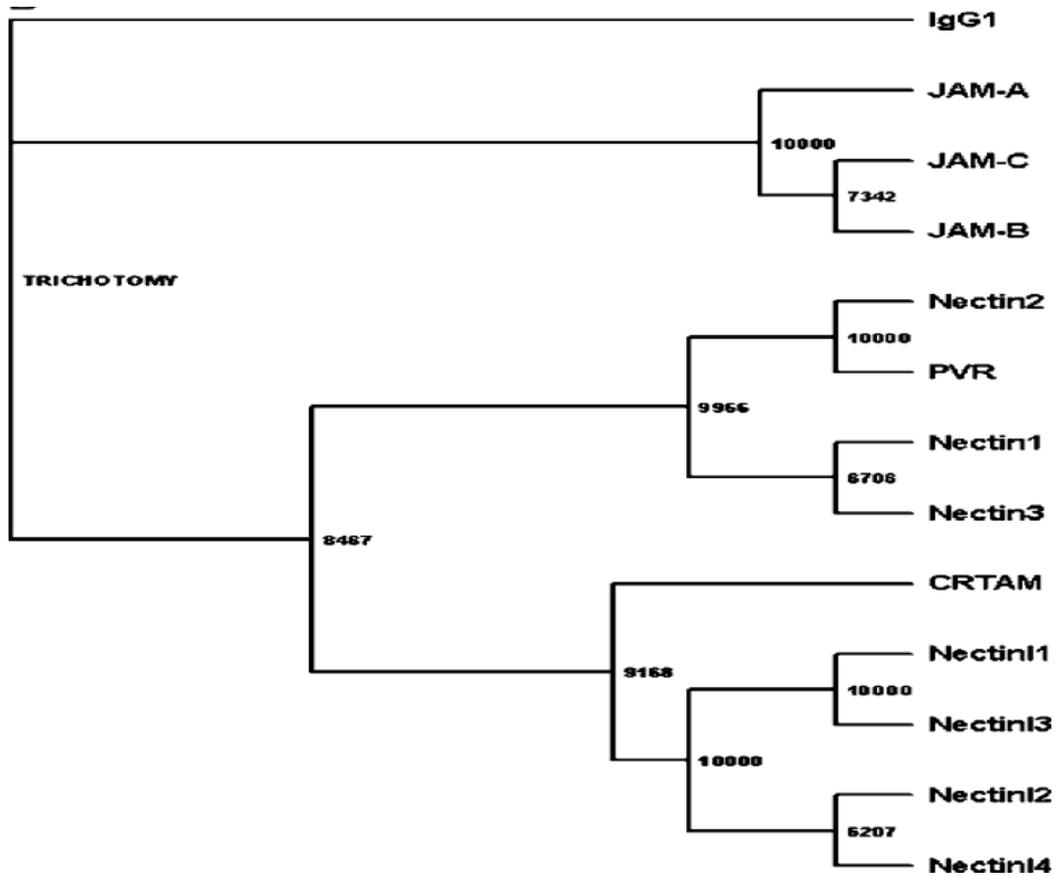


Figura 11. CRTAM es un nuevo miembro de la familia de proteínas nectinas. Árbol filogenético obtenido por el programa Clustal X y obtenido tras el alineamiento de las secuencias disponibles para los genes de la familia *Nectin-like*. Tomado de [73].

Yeh y colaboradores en el 2008 reportaron que CRTAM se encuentra sobre-expresada en una sub-clase de células TCD4+ bajo condiciones de estimulación vía CD3/CD28 y coordina un complejo de señalización por medio del dominio de unión a PDZ, el cual incluye a la proteína Scrib. De esta manera CRTAM controla una fase tardía de la polaridad en las células T, además de que selectivamente regula la producción de IFN gama e IL-22 [74].

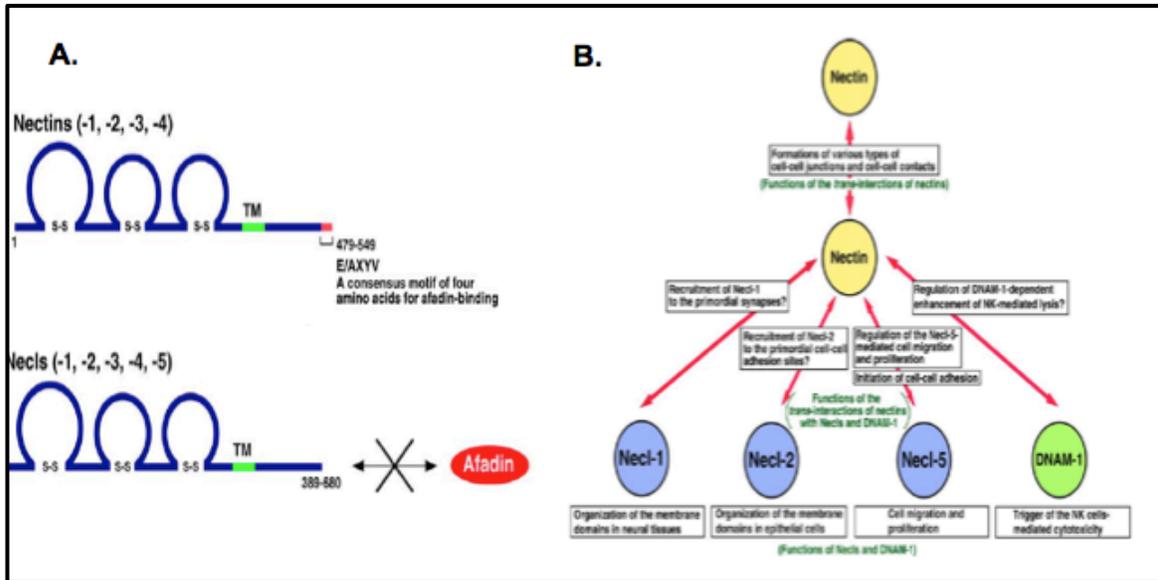


Figura 12. Dominios diferenciales entre las proteínas Nectinas y tipo nectinas (Necl) y sus funciones. A) Dominios extracelulares e intracelulares de las proteínas tipo Nec y Necls, donde estas últimas no tienen el dominio para interactuar con afadina. B) Funciones relacionadas a las interacciones homo- y heterotípicas entre los miembros de las familias Nec y Necls (Modificado de [75, 78]).

Por otra parte, se ha demostrado que la expresión de *CRTAM* en la superficie de las células activadas vía CD3/CD28, es gradual; su presencia comienza a ser evidente a partir de las 2 horas y desaparece después de 96 horas de estimulación, lo cual indica que *CRTAM* es una molécula de activación de linfocitos TCD8+, NKTs y NKs.

ANTECEDENTES DIRECTOS

Como se mencionó anteriormente, la expresión de *CRTAM* es inducible y transitoria; en la superficie de las NKTs los niveles máximos de expresión de la proteína se observan a las 36 h post-estimulación, mientras que en los LTCD8+ estimulados en cultivo se detecta la máxima expresión a las 24 h, y se mantiene hasta por 60 h [73]. Estos datos obtenidos por nuestro grupo de trabajo han llevado a proponer que la expresión del gen *CRTAM* está regulada a nivel transcripcional [79]. En un trabajo previo se realizó una cinética de estimulación tratando células mononucleares de sangre periférica con Ionomicina y PMA.

Mediante ensayos de RT-PCR se encontró que la expresión del mensajero de CRTAM alcanza su máximo a las 12 h post-estimulación y decae hacia las 48 h (Figura 13).

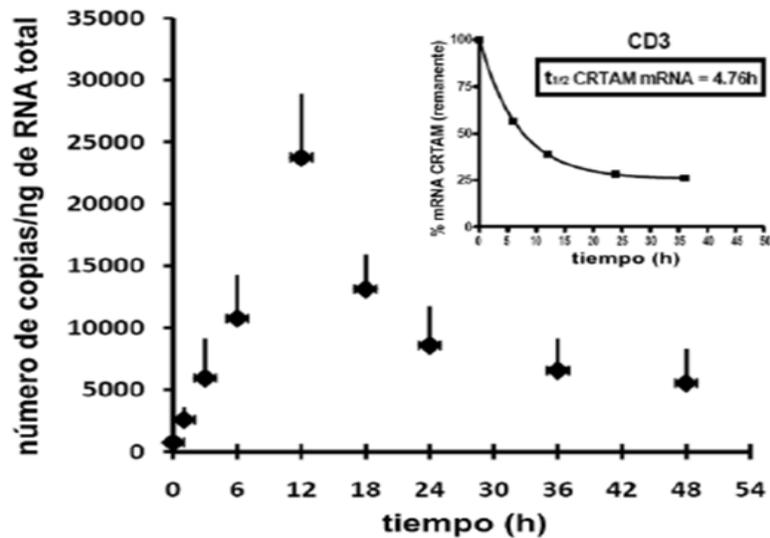


Figura 13. El gen hCRTAM se expresa temporalmente en células TCD8+ activadas. Niveles de mensajero de CRTAM respecto a los niveles de GAPDH, un gen *housekeeping* utilizado como control no modificado por la estimulación linfocitaria. Se muestra la vida media del RNA mensajero de CRTAM en el recuadro (tomado de [79]).

Asimismo, la expresión de CRTAM se ve severamente afectada al tratar células de bazo de ratón con Actinomicina D, un potente inhibidor de la transcripción, lo que sugiere que la expresión del mRNA de CRTAM se da *de novo* y que la expresión del gen está regulada a nivel transcripcional. Realizando un análisis bio-informático de la región de 2kb río arriba del codón de inicio de la traducción del gen CRTAM, se describió la presencia de sitios potenciales de unión para factores transcripción, como AP-1 y ZEB-1 (principalmente un represor). Posteriormente, mediante ensayos de retardamiento, se mostró que la región de 1.9Kb contiene un sitio de reconocimiento y unión al DNA para el factor transcripcional AP-1 (Figura 14).

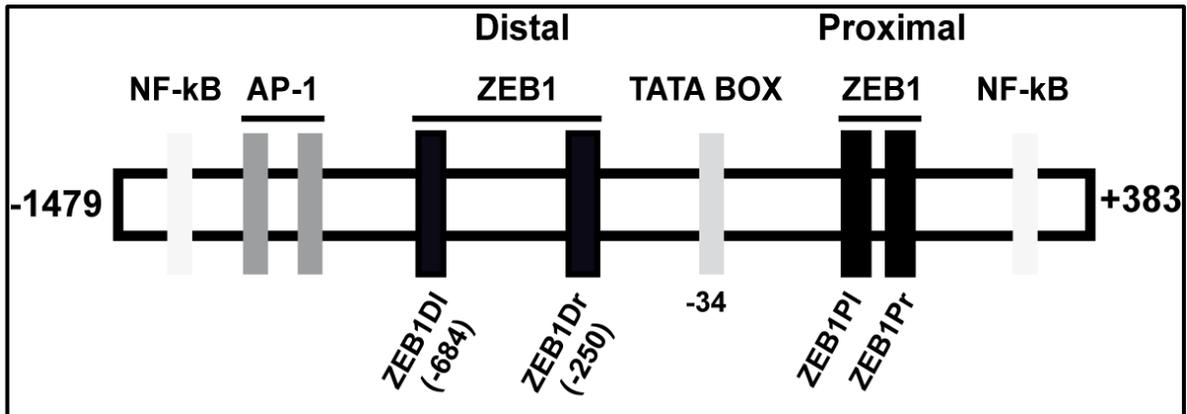


Figura 14. Representación gráfica de la localización e identidad de los sitios de unión para factores de transcripción en el promotor de CRTAM. Tras el análisis bio-informático realizado sobre la región de 2Kb río arriba del codón de inicio de la traducción en el gen CRTAM, se seleccionaron los sitios potenciales de unión para los activadores transcripcionales AP-1, NF-κB y para el represor transcripcional ZEB1.

El patrón particular de expresión de CRTAM tras la estimulación linfocitaria sugiere que debe haber un fenómeno de represión para que la expresión del gen regrese hacia el nivel basal. Durante el trabajo de tesis de maestría demostramos que el represor transcripcional ZEB1 se expresa en células Jurkat en condiciones de reposo y estimulación. Asimismo, se analizó el promotor del gen CRTAM, encontrando sitios potenciales de unión para ZEB1. Mediante ensayos de retardamiento en gel, utilizando como sondas la secuencia de la caja tipo E del promotor del gen CRTAM (ZEB1Dr), mostramos que existen proteínas en el núcleo de las células Jurkat capaces de reconocer y unirse a dicha secuencia (Figura 15). También mostramos que el tratamiento con vomitoxina, una toxina que funciona como inhibidor de la unión de ZEB1 al DNA en células Jurkat, inhibe la formación de complejos de retardamiento con la sonda ZEB1Dr (Figura 16), sugiriendo que ZEB1 puede regular negativamente la expresión de CRTAM [80].

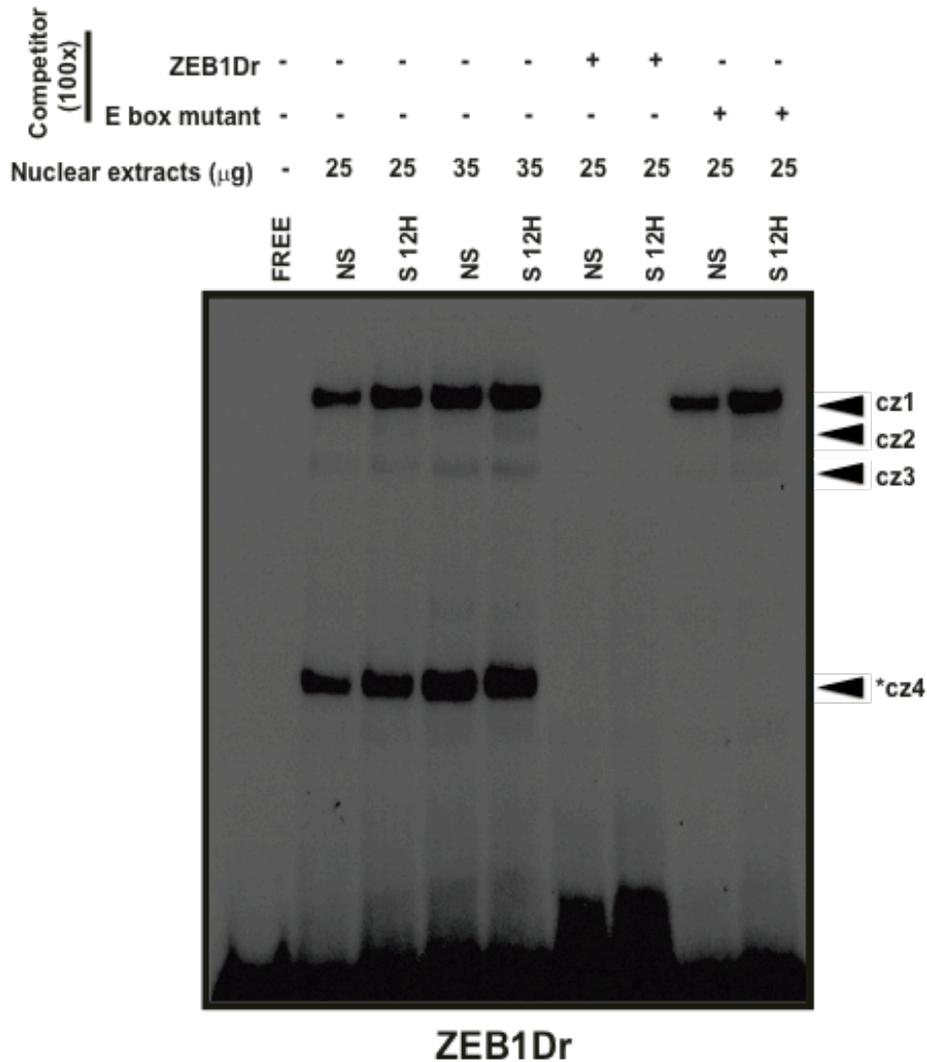


Figura 15. Proteínas nucleares de células Jurkat interactúan con el elemento ZEB1d in vitro. (A) Se obtuvieron extractos nucleares (EN) de células Jurkat NS o S por 12 h; la concentración de proteínas fue cuantificada por el método de Bradford. Posteriormente, 25 o 35 µg de cada extracto nuclear (carriles 1-3, 6-9 y 4-5 respectivamente) fueron usados para realizar ensayos de retardamiento en gel usando la sonda ZEB1Dr marcada radiactivamente (sitio -250). (B) La sonda ZEB1Dr forma tres complejos retardados: cz1, cz3 y cz4 con EN de células NS (carriles 2 y 4) y en células estimuladas por 12 h (S 12 h) se observó la aparición del complejo cz2 (carriles 3 y 5). La especificidad de los complejos cz1, cz2 y cz3 se determinó mediante ensayos de competencia con un exceso de la sonda caja E mutada sin marcar radiactivamente (100 veces, carriles 8 y 9).

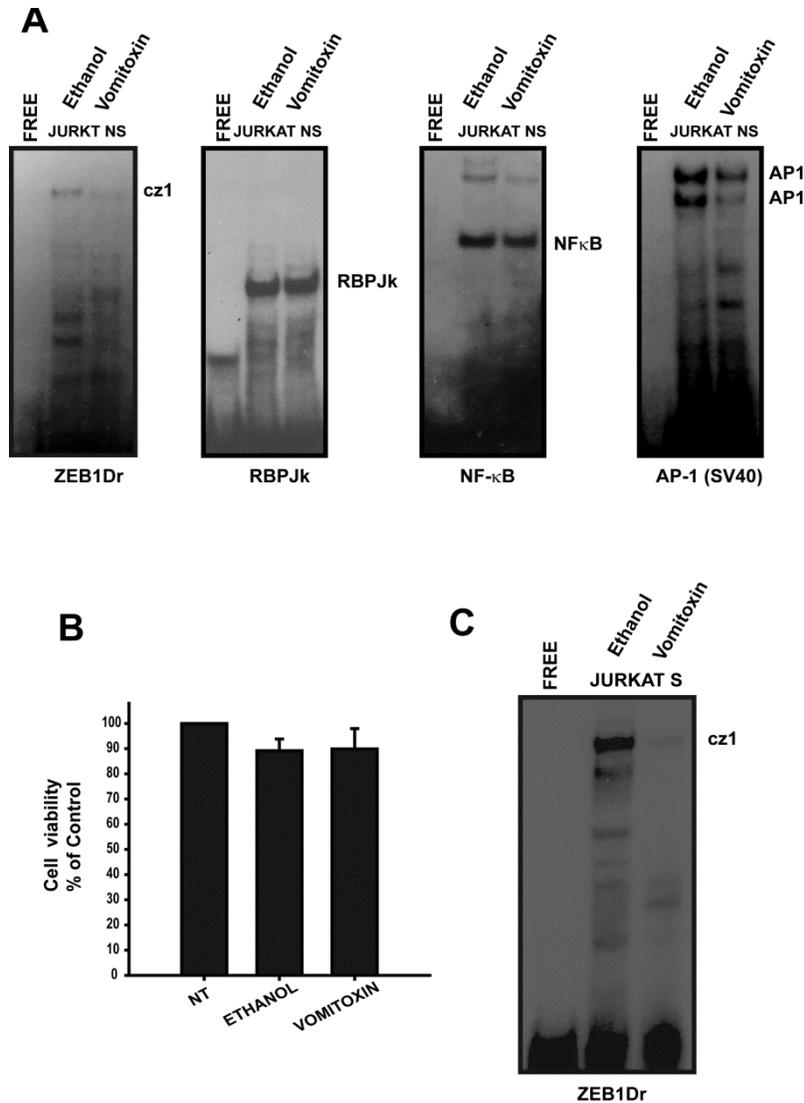


Figura 16. La vomitoxina inhibe la formación de complejos de retardamiento con la sonda ZEB1Dr. (A) Las células Jurkat (1×10^5) fueron cultivadas en 1mL de medio RPMI con 10% SFB; se agregaron al medio 2.5 μ L de etanol absoluto o 2.5 μ L de vomitoxina (250ng/mL). Se obtuvieron los EN de estas células y se tomaron 25 μ g de cada EN para combinarlos con la sonda marcada que se indica en cada caso. (B) Las células Jurkat fueron cultivadas 24 h en presencia de etanol absoluto (2.5 μ L) o vomitoxina (250ng/mL); se realizó un ensayo de MTT para medir la viabilidad celular después del tratamiento con vomitoxina. Se muestran los resultados de un ensayo representativo realizado por triplicado. (C) Para obtener estos EN, las células Jurkat (1×10^5) fueron cultivadas en 1mL de medio RPMI con 10% SFB; se agregaron al medio 2.5 μ L de etanol absoluto o 2.5 μ L de vomitoxina (250ng/mL) y se estimularon PMA y ionomicina como se indica en materiales y métodos. Las cabezas de flecha indican en todos los casos los complejos que son específicos, determinado por ensayos de competencia (datos no mostrados). Ver página siguiente.

Diversas evidencias experimentales señalan que ZEB1 requiere asociarse con otras proteínas para llevar a cabo su función, siendo el caso de la interacción con CTBP en el gen IL-2 [52]. Recientemente se ha descrito que en algunos cánceres en los que se recupera la expresión de la proteína e-caderina mediante la disminución de ZEB1, este represor permanece unido al promotor de dicho gen [53]. Además algunos genes blanco de ZEB1 han mostrado re-expresarse tras el tratamiento con inhibidores de histona desacetilasa (HDAC) [56]. Por lo anterior y dada la exquisitez con la que ZEB1 regula a CRTAM puede sugerirse que durante la estimulación linfocitaria su capacidad represora se limita por la interacción con otras proteínas. Por ello es importante llevar a cabo un análisis funcional de la actividad de CRTAM bajo la influencia de ZEB1.

HIPÓTESIS

El represor transcripcional ZEB1 reconoce y se une específicamente al promotor de CRTAM por lo que podría regular negativamente al gen CRTAM.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

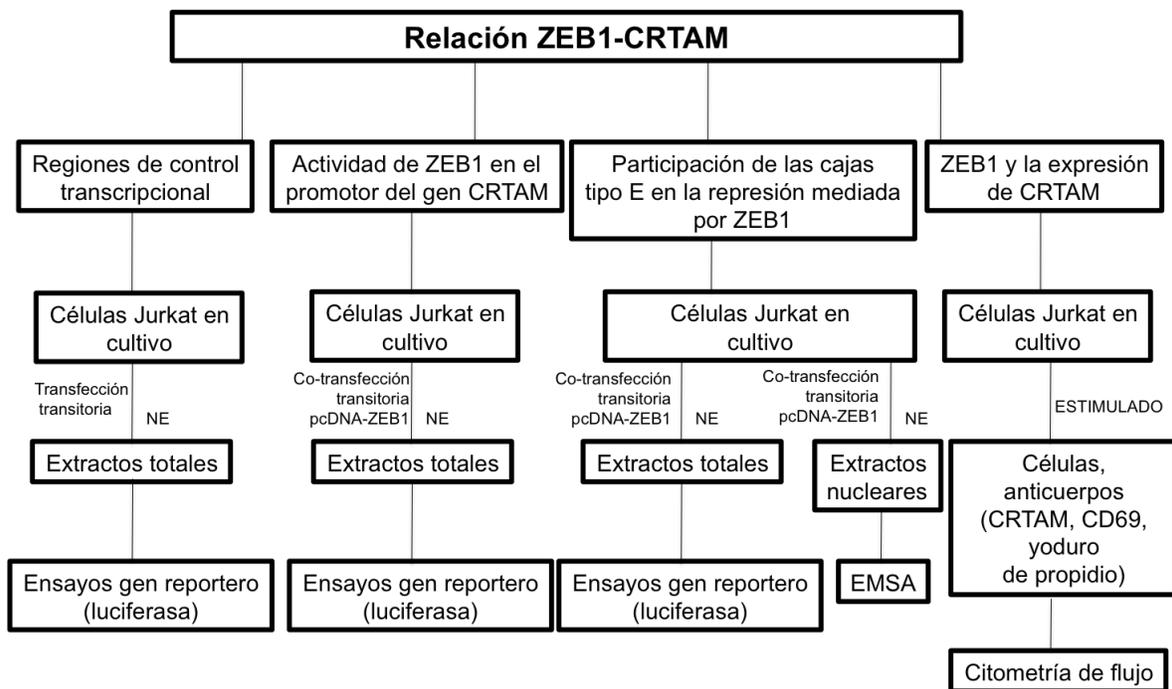
Analizar la función represora de ZEB1 sobre el gen CRTAM.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar las regiones de control transcripcional involucradas en la represión del gen CRTAM mediante ensayos de gen reportero con regiones del promotor del gen CRTAM que contienen o carecen de las cajas tipo E distales y proximales.
2. Determinar la actividad de ZEB1 en el promotor del gen CRTAM evaluando la expresión de un gen reportero que contiene sitios de unión para ZEB1 en el promotor del gen CRTAM en presencia de ZEB1 exógeno.
3. Evaluar la participación de las cajas tipo E localizadas en la región reguladora del gen CRTAM en la represión mediada por ZEB1
 - a. Al generar mutaciones en la región reguladora de CRTAM que eliminen la interacción de ZEB1 con sus secuencias de reconocimiento (cajas tipo E), en el contexto de una construcción reportera y en condiciones de reposo.
 - b. Al realizar ensayos tipo EMSA utilizando como sondas las cajas tipo E mutadas del promotor del gen CRTAM para mostrar la pérdida de unión de ZEB1, utilizando extractos nucleares de células Jurkat que sobre-expresen al represor.
 - c. Analizar la expresión de CRTAM en células Jurkat que sobre-expresen al regulador negativo ZEB1, al medir las moléculas de CRTAM presentes en la superficie de células Jurkat durante

condiciones de activación mediante tinción celular y citometría de flujo.

ESQUEMA EXPERIMENTAL



MATERIAL Y METODOS

Oligonucleótidos

Para la detección del mRNA de ZEB1 (gen TCF8) se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (Invitrogen). ZEB1s: 5'-GGGAATGCTAAGAACTGCTGG-3' ZEB1as: 5'-GGTGTAAGTGCACAGGGAGC-3'; ambos diseñados para amplificar un fragmento de 400 pb a partir de RNA total. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de un fragmento de 550 pb del gen GAPDH son: GAPDHs: 5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCGG-3'; y GAPDHas: 5'-GTGGCAGTGATGGCATGGACT-3'.

Para los ensayos de retardamiento se utilizaron las siguientes sondas:

ZEB1mDr, 5' CTAGAATGAGTGAGTGGGCATTTAATACATGAGTG-3';

ZEB1mDI, 5'- CTAGGTTCCACCAGGAGGTGTTCTGGGGGCA-3';

ZEB1mPr, 5'- CTAGGTTCCACCAGGAGGTGTTCTGGGGGCA-3';

ZEB1mPI, 5'- CTAGACATCACTCACACCTCTCTGCCATCAA-3'.

Vectores

Las construcciones p1900-CRTAM y p400-CRTAM están descritas en [81]. Para obtener la construcción pdelta1300-CRTAM, la construcción p1900CRTAM se digirió con las enzimas XhoI y XmaI durante 1 hora a 37°C. La construcción p1900-CRTAM contiene una región de 1903 pb del promotor del gen CRTAM clonada en los sitios XhoI y XmaI en el vector pGL3-BASIC (Promega) que contiene al gen de la Luciferasa como reportero y carece de promotor eucariótico y de secuencias potenciadoras. Se corroboró la liberación del fragmento por medio de electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, los fragmentos fueron separados en un gel preparativo del cual se cortó la banda de 2kb

aproximadamente; el fragmento de DNA se obtuvo mediante la técnica de purificación en columna. Con el programa Vector NTI, se analizaron los sitios de restricción de la región de 1.9Kb; se determinó que las enzimas EcoRI y NdeI reconocen secuencias cercanas a las posiciones de los elementos ZEB1Dr y ZEB1DI, es decir, EcoRI corta a la derecha del sitio ZEB1Dr y NdeI a la izquierda del sitio ZEB1DI (cortan en las posiciones -467 y -1310 con respecto al codón de inicio de la traducción; ver figura 14). Se restringió durante 1 hora a 37°C. La correcta digestión del fragmento se corroboró por electroforesis en gel de agarosa; el fragmento esperado por el corte de las dos enzimas tenía un tamaño de aproximadamente 742 pb, además de dos fragmentos de 600pb cada uno aproximadamente. Posteriormente se realizó un gel preparativo del cual se cortaron los fragmentos de 600pb; estos fueron purificados por columna y se ligaron entre sí. El fragmento de 1.3Kb obtenido por esta ligación fue clonado en el vector pGL3-Basic mediante una reacción adicional de ligación. La correcta clonación fue corroborada por restricción enzimática de la construcción obtenida.

El vector de expresión pCDNA 3.1-ZEB1 fue donado por el Dr. Hujiro Higashi, Universidad de Osaka [46].

Cepas bacterianas

E.coli DH5 α , previamente preparadas para transformación mediante el método de cloruro de rubidio [82] y transformadas mediante el método de choque térmico [83]. Las clonas positivas fueron crecidas en medio de cultivo LB (Luria-Bertani) y la selección de las colonias se efectuó con 100 μ g/ml de ampicilina.

Líneas celulares y medios de cultivo

Las células de linfoma humano Jurkat se cultivaron en medio RPMI (Invitrogen), suplementado con 2 mM de L-Glutamina, 10% de suero fetal bovino (SFB), 50 U/ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomycin. Los ensayos de transfección transitoria se realizaron en presencia del mismo medio de cultivo sin SFB.

Programas bio-informáticos

El programa Vector NTI fue utilizado para la elaboración de los mapas de restricción. La predicción de los potenciales factores de transcripción que se unen a la región 5' adyacente al gen *CRTAM* se determinó usando la base de datos Phylofoot [84].

Anticuerpos

Para los ensayos de citometría de flujo se utilizaron anticuerpos dirigidos contra las proteínas CRTAM (conjugado al fluorocromo APC-Cy5) (eBioscience, Inc., LHD100811); CD69 (conjugado al fluorocromo ECD) (eBioscience, Inc.) y los correspondientes controles de isotipo (eBioscience, Inc.).

Activación celular

Las células Jurkat (5×10^6) fueron activadas con Ionomicina (200 ng/ml) y PMA (forbol 12-miristato 15-acetato; 2 ng/ml) durante los tiempos indicados en cada figura. Las células sin activar o en reposo fueron cultivadas en presencia de DMSO.

Citometría de flujo

Las células Jurkat (1×10^6) fueron estimuladas con Ionomicina (200ng/mL) y PMA (2ng/mL) por 3, 12 y 15 horas; se incluyeron como controles células sin tratamiento. Las células fueron transfectadas utilizando el método de electroporación con 2 μ g de cada vector (según sea el caso, pie de figura) por diferentes tiempos; transcurrido este tiempo de incubación, las células se transfirieron a un tubo de microcentrífuga y se centrifugaron a 1,500 r.p.m. durante 5 min; entonces se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron y lavaron con PBS 1x y se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, las células se incubaron en una solución de inmunoglobulinas humanas (Laboratorios Pisa) por 10 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, a cada tubo se añadieron 4 μ g de cada uno de los siguientes anticuerpos: CD69-ECD (eBioscience, Inc.) y CRTAM-APC (eBioscience, Inc.). La mezcla se incubó 20 minutos a 4°C. Al finalizar el tiempo de incubación, a cada tubo se añadieron 3mL de PBS al 2% de SFB y las células fueron centrifugadas a 1,500 r.p.m. durante 5 min. Finalmente, se decantó el

sobrenadante y las células fueron re-suspendidas en 200µL en PBS y se añadió yoduro de propidio para medir viabilidad celular. Las células teñidas fueron analizadas utilizando en citómetro de flujo Cyan (Dako, Carpinteria, CA).

Extracción y purificación de DNA plasmídico

Este proceso se realizó utilizando el estuche *Wizard Plus SV minipreps DNA purification Systems* (Promega Corporation). El DNA se cuantificó con la ayuda espectrofotómetro (Nanodrop 2000c, Thermo Fisher Scientific Inc). La autenticidad del plásmido se corroboró mediante análisis de restricción y por secuenciación automatizada. El DNA se almacenó a -20°C para su uso posterior.

Transfección transitoria

Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) o mediante electroporación. Para el protocolo de electroporación se utilizó el equipo Nucleofector (Amaxa-Lonza) y el estuche *Human T cell nucleofector* (Lonza) siguiendo las recomendaciones del proveedor. 1×10^6 células fueron incubadas con 2µg de cada plásmido que contienen el gen reportero luciferasa, plásmido de expresión o el plásmido vacío siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se agregó medio fresco y se permitió la recuperación celular por 24 H. Para el protocolo utilizando la lipofección mediante el reactivo Lipofectamine 2000, el DNA plasmídico y el reactivo Lipofectamine 2000 se mezclaron en presencia de medio basal durante 30 minutos. Pasado este tiempo se agregó cada mezcla de lipofección a su respectivo pozo celular. 24 horas después, la mezcla de transfección fue desechado y reemplazado por con medio de cultivo fresco. Transcurrido este periodo, las células fueron lavadas una vez con PBS 1X y utilizadas para obtener extractos totales y determinar la actividad de luciferasa y la concentración de proteínas.

Medición del gen reportero Luciferasa

Las células transfectadas se cosecharon 48 h post-transfección, se lavaron una vez con PBS 1X y se resuspendieron en 100 µl de solución de lisis (25 mM de Tris-fosfato, 2 mM de DTT, 2 mM de ácido N,N,N',N'-tetraacético-1, 2-diaminociclohexano, 1.25 mg/ml de

lisozima, 2.5 mg/ml de BSA, glicerol 10% v/v y 1% de Tritón X-100 m/v; Promega). El lisado se centrifugó a 10 300 rpm por 30 segundos a temperatura ambiente; se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford para normalizar los extractos totales [85]. Para la determinación de la actividad de luciferasa se utilizó el sistema *Dual Luciferase Reporter* (Promega) y un luminómetro Fluoro Scan FL (Ascent).

Mutación sitio dirigida

Se utilizó el estuche *Quickchange site-directed mutagenesis* (Stratagene, Cedar Creek, TC), los sitios CAGGTA localizado en la posición -250pb, CAGGTG localizado en la posición -684, ACACCT en la posición +150pb y AGGTG en el sitio +204pb en la construcción p1900-CRTAM fueron mutados a los siguientes nucleótidos CATTTA, CATTG, ACATT y ATTTG, respectivamente. Finalmente las condiciones de PCR para mutación sitio dirigida se generaron de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las clonas candidatas fueron aisladas y secuenciadas para confirmar el cambio de nucleótidos deseado.

La secuencia de oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR fueron las siguientes:

ZEB1Rd (posición 250), sentido 5'- gatggggaatgagtggcatttaatacatgagtgagtgagg-3', antisentido 5'-cccactcactcatgtattaaatgccactcattccccatc-3'.

ZEB1Ld (posición -684), sentido 5'- gtagtgcatactagatgctgtacatttgacaagatgaatgggtgg-3', antisentido 5'-ccaccattcattcatctgtcaaagtacagcatctagatgcactac-3'.

ZEB1Lp (posición +250), sentido 5'-caattttgtcaccaacacatcactcacatttctctgcatcaaga-3', antisentido 5'-aaacaattttgtcaccaacacatcactcacacctctctgcatcaagataa-3'.

ZEB1Rp (posición +204), sentido 5'-cccaaaatgtccaccaggattgtttctgggggcagct-3', antisentido 5'-gtccccaaaatgtccaccaggaggtgttctgggggcagctaac-3'.

Marcaje terminal de oligonucleótidos utilizando el fragmento Klenow

El marcaje de los oligonucleótidos de doble cadena se llevó a cabo empleando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Se marcaron de 40 a 100 ng de DNA, en un volumen final de 10 μ l, con 1 μ l de nucleótidos (10 mM de los nucleótidos dGTP, dTTP, dCTP) y 10 mCi de [α - 32 P]dATP en presencia de 1 μ l de regulador de marcaje (TM 10X; Tris pH 8.5 100 mM y MgCl₂ 50 mM). Esta mezcla se incubó con 1 U del fragmento Klenow (Invitrogen) por 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la sonda marcada se diluyó en H₂O para tener una concentración final de 1 ng/ μ l.

Ensayos de retardamiento

Se obtuvieron extractos nucleares provenientes de células Jurkat no estimuladas y estimuladas como fue descrito previamente [81]. La reacción estándar se hizo con 25 μ g de extracto nuclear y 1 ng de cada una de las sondas marcadas radiactivamente, ZEB1Dr, ZEB1DI, ZEB1Pr y ZEB1PI, en un tampón de interacción que contiene HEPES 13 mM, pH 7.9, KCl 60 mM, EDTA 0.13 mM, dithiothreitol 2 mM, poly(dI:dC) y Glicerol al 10%. Los complejos DNA-proteína fueron resueltos en geles no desnaturalizantes de poli(acrilamida) al 6% en regulador de boratos TBE 0.5X (Tris 45 mM, ácido bórico 45 mM y EDTA 1mM) y se revelaron por autoradiografía.

Estadística

Los datos se encuentran expresados como la media \pm del valor del error estándar. Se realizó un análisis tipo ANOVA para determinar si existía diferencia significativa entre las condiciones probadas. Cuando dicho análisis indicó significancia (alrededor de 0.05), se utilizó el análisis post-hoc Student-Newman-Keuls para determinar las condiciones que fueran significativamente diferentes entre ellas (Prism, GraphPad Software).

RESULTADOS

Localización y efecto funcional de los sitios Zeb-1 localizados en el promotor de CRTAM

La primera parte de este trabajo consistió en hacer un análisis funcional del promotor de CRTAM en células Jurkat, para lo cual se generaron nuevas construcciones derivadas de la construcción original reportada por Valle-Ríos [79] y que contiene la región reguladora completa. Las construcciones obtenidas a partir de p1900-CRTAM (región reguladora completa) se nombraron pdelta1300-CRTAM y p400-CRTAM. Por medio de digestión enzimática se logró la eliminación específica de las cajas tipo E, ZEB1Dr y ZEB1DI (elementos distales) del promotor del gen CRTAM en la construcción pdelta1300-CRTAM. Al realizar ensayos de gen reportero usando células Jurkat y estas construcciones, se observó que al eliminar los elementos distales aumentó la actividad transcripcional en comparación a las células transfectadas con el promotor de 1.9Kb intacto (p1900-CRTAM) (Figura 17). Debido a que la construcción pdelta1300-CRTAM conserva los elementos de unión AP-1 que se encuentran involucrados en la expresión de CRTAM [79], evaluamos la actividad transcripcional de una construcción que carece de los elementos distales (ZEB1Dr y ZEB1DI) y los sitios de unión a AP-1 (p400-CRTAM). La actividad transcripcional de la construcción p400-CRTAM fue similar a la observada en la construcción pdelta1300-CRTAM (Figura 17). Estos resultados sugieren que los elementos cajas tipo E distales están involucrados en la represión de la actividad del promotor del gen CRTAM en células T no estimuladas.

ZEB1 es capaz de regular negativamente la actividad transcripcional del promotor del gen CRTAM

La represión mediada por ZEB1 requiere su unión al DNA. Como hemos mostrado los elementos distales, ZEB1Dr y ZEB1DI, participan en la represión de la actividad transcripcional del promotor del gen CRTAM (Figura 17). Para determinar el efecto de ZEB1 en la regulación negativa de CRTAM realizamos ensayos de co-transfección transitoria. Las construcciones p400-CRTAM y p1900-CRTAM fueron co-transfectadas con los vectores de expresión pcDNA3.1 (sin inserto) y pcDNA-ZEB1. Se ilustra la actividad relativa de la construcción p400-CRTAM (Figura 18A) y de la construcción

p1900-CRTAM (Figura 18B) con respecto a los valores obtenidos al co-transfectar con el vector pcDNA3.1. La sobre-expresión de ZEB1 disminuyó la actividad de ambas construcciones, lo que sugiere la participación de los elementos proximales y distales en el fenómeno de represión mediado por ZEB1. Además es importante señalar que variaciones en la cantidad de ZEB1 presente en la célula impactan de manera diferente la actividad del promotor del gen CRTAM (Figura 18). Estos resultados sugieren que ZEB1 actúa como un represor de CRTAM.

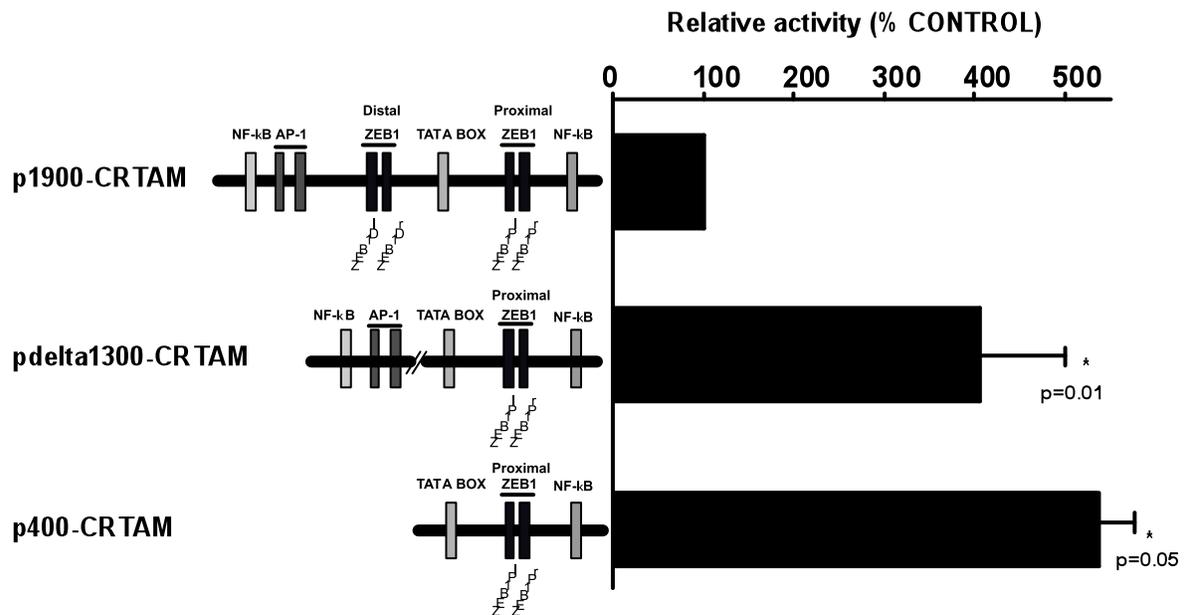


Figura 17. Actividad funcional de las construcciones CRTAM. Representación esquemática de las construcciones obtenidas a partir de la región reguladora completa del hCRTAM (izquierda). Las células Jurkat fueron transfectadas transitoriamente con 10 μ g de las construcciones indicadas. 24h pos-transfección se obtuvieron los lisados celulares y se realizaron ensayos para determinar la actividad del gen de luciferasa. La actividad transcripcional está expresada como la actividad relativa con respecto a la construcción p1900-CRTAM (control). Cada valor representa la media \pm el error estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Los valores de p se obtuvieron mediante ANOVA de una vía.

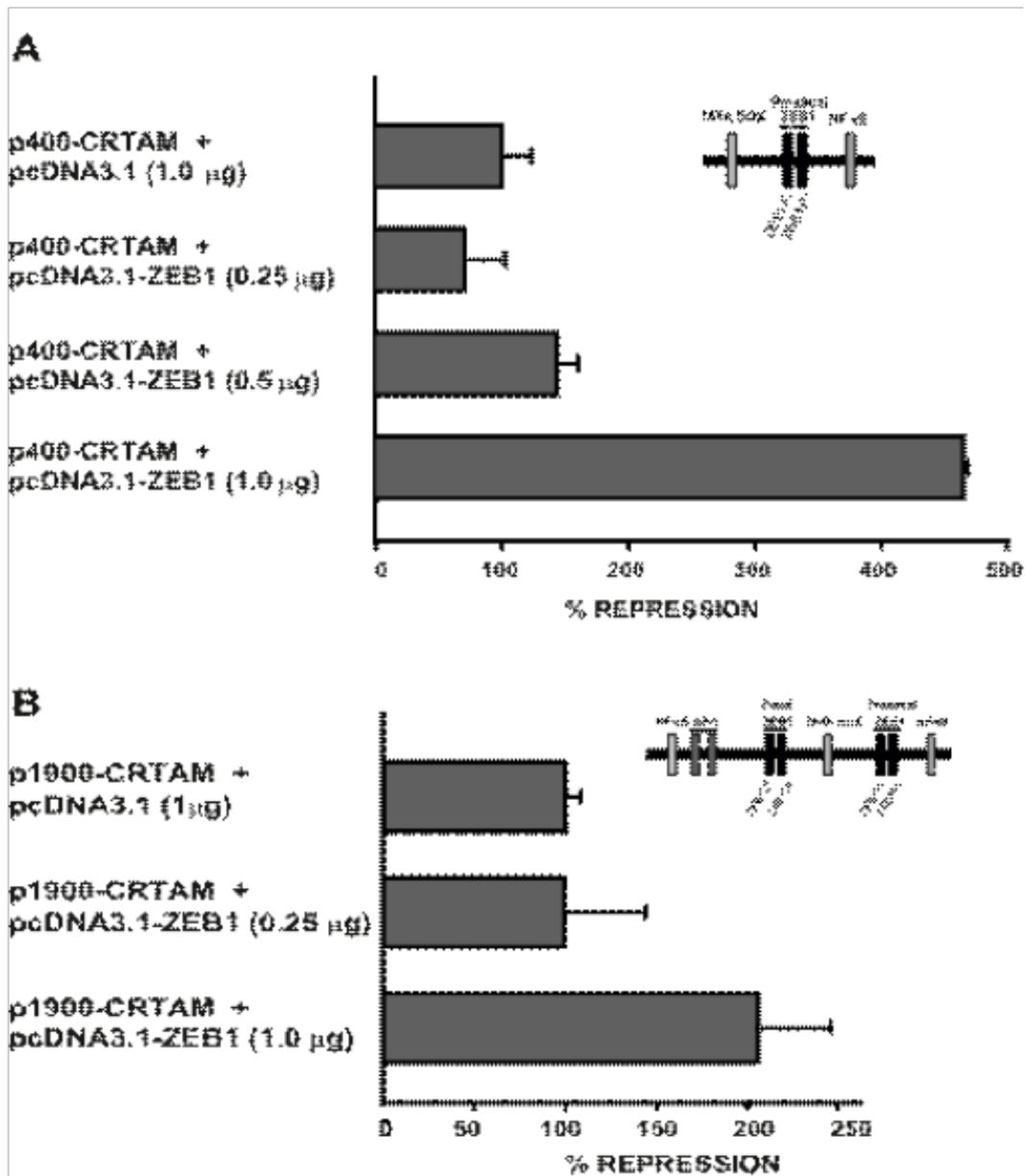


Figura 18. El factor de transcripción ZEB1 exógeno reprime la actividad transcripcional del promotor hCRTAM. Las células Jurkat fueron co-transfectadas transitoriamente con 0.25, 0.5 o 1 µg de los vectores pcDNA3.1 o pcDNA3.1-ZEB1 y 1 µg de las construcciones p400-CRTAM (A) o p1900-CRTAM (B). 24 horas después de la transfección se obtuvieron los lisados celulares y la actividad de luciferasa fue cuantificada y expresada como % de represión. El % de represión se calculó como el incremento sobre el fondo obtenido por la co-transfección de las construcciones p400-CRTAM y p1900-CRTAM con el vector pcDNA3.1. Cada valor representa la media del error estándar de tres experimentos realizados por triplicado.

El análisis de mutantes por sustitución en los sitios cajas tipo E reveló su aportación individual en la regulación negativa del gen CRTAM

Para evaluar la contribución de los elementos denominados cajas E distales y proximales, sobre la actividad del gen hCRTAM, decidimos mutarlos. Para probar la hipótesis de que la interacción ZEB1-caja E en el promotor del gen hCRTAM es funcionalmente relevante, fue importante evaluar los nucleótidos requeridos para la unión de ZEB1. Reportes previos han mostrado que la capacidad de unión al DNA de ZEB1 es abolida cuando los elementos consenso de las cajas E son mutados en el núcleo central [21]. Debido a nuestros resultados previos (Figuras 18A, 18B), decidimos evaluar la participación de las cuatro cajas E del promotor del gen hCRTAM. Las construcciones mutadas para los sitios distales y proximales se muestran a la izquierda en la Figura 19. La mutación del elemento ZEB1Dr (construcción p1900-ZEB1mDr) promueve un aumento en la actividad de promotor en células Jurkat (Figura 19A). Sin embargo, al mutar el elemento ZEB1DI (construcción p1900-ZEB1mDI) no induce una desrepresión del promotor (Figura 19A). Importantemente, cuando ambos elementos distales son mutados en la misma construcción (p1900-doublemD CRTAM), el promotor gana actividad comparada con la construcción p1900-ZEB1mDr. Previamente observamos que la expresión exógena del represor transcripcional ZEB1 permitía reprimir la actividad promotora de la construcción p400-CRTAM. Sin embargo, la mutación de cualquiera de las cajas E de la región proximal (p1900-ZEB1mPr-CRTAM, p1900-ZEB1mPI-CRTAM) no permiten la desrepresión del promotor (Figura 19B). Aun cuando ambos elementos fueron simultáneamente mutados (p1900-doublemP-CRTAM) (Figura 19B). Estos resultados sugieren un papel fundamental para los elementos distales en la regulación de la actividad del promotor de CRTAM, y la importancia del elemento ZEB1Dr en esta función.

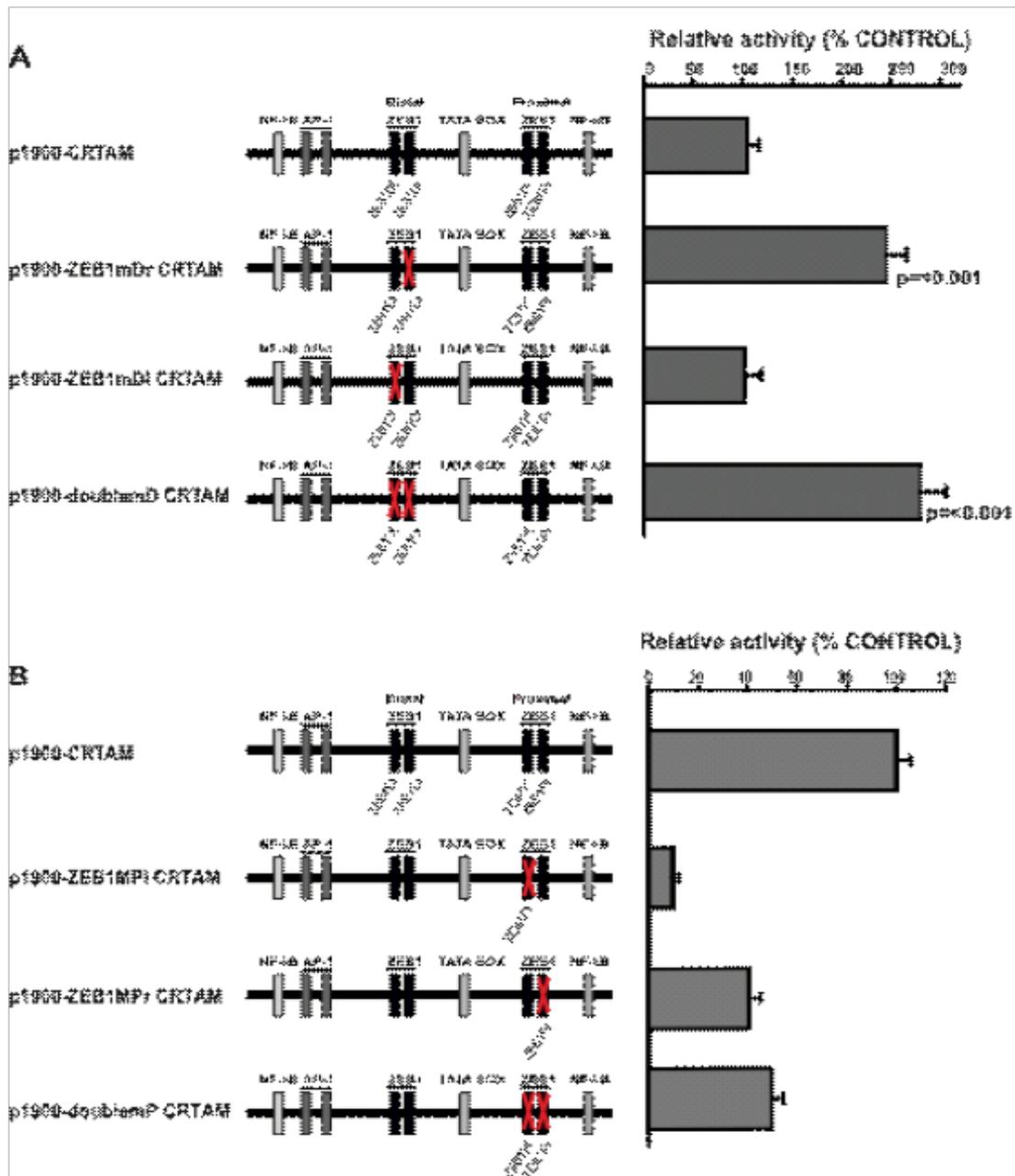


Figura 19. Efecto de las mutaciones en las cajas E distales y proximales sobre la actividad promotora del gen hCRTAM. (A) Se muestra la actividad del gen reportero luciferasa para las construcciones p1900-CRTAM, p1900-ZEB1mDr-CRTAM, p1900-ZEB1mDI-CRTAM y p1900-doublemD-CRTAM en células Jurkat transfectadas transitoriamente. (B) Se muestra la actividad del gen reportero luciferasa para las construcciones p1900-CRTAM, p1900-ZEB1mPr-CRTAM, p1900-ZEB1mPI-CRTAM y p1900-doublemP-CRTAM en células Jurkat transfectadas transitoriamente. La actividad de luciferasa se midió y ajustó al control (p1900-CRTAM). Los valores de p se obtuvieron mediante ANOVA de una vía.

La represión ejercida por ZEB1 requiere la unión al elemento caja tipo E canónico en el promotor del gen CRTAM

Para confirmar que las diferencias funcionales observadas entre los grupos proximales y distales de cajas tipo E se deben a la variabilidad en el reconocimiento y unión de ZEB1 (Figura 19), realizamos ensayos de retardamiento en gel (EMSA). Estos ensayos se realizaron utilizando extractos nucleares de células Jurkat no estimuladas y transfectadas transitoriamente con los vectores pcDNA3.1 o pcDNA3.1-ZEB1. Las sondas utilizadas corresponden a cada sitio caja tipo E mutado en las construcciones previamente descritas. Como se esperaba, los elementos cajas tipo E proximales (ZEB1PrM y ZEB1PIM) muestran mayor formación de complejos DNA-proteína comparado con aquéllos observados en los elementos distales (ZEB1DrM y ZEB1DIM) (Figura 20). Esta tendencia prevalece aun cuando se utilizaron extractos nucleares de células Jurkat que sobre-expresan ZEB1 (Figura 20). De este modo, la mutación de los sitios cajas tipo E es suficiente para interferir con la actividad represora de ZEB1 en el promotor del gen CRTAM.

Anteriormente observamos que las células Jurkat mantienen una expresión basal del RNA mensajero para el gen de CRTAM. Sin embargo, la expresión máxima del mensajero de CRTAM se alcanza a las 12h pos-activación [79]. Para probar que ZEB1 es un represor *bona fide* del gen CRTAM endógeno en las células T Jurkat, primero determinamos cómo la sobre-expresión de ZEB1 previa a la activación celular afecta a expresión de CRTAM. Las células Jurkat fueron transfectadas transitoriamente con las construcciones de expresión pcDNA3.1 o pcDNA3.1-ZEB1 y después de 48 h, fueron estimuladas con PMA (2ng/mL) y Ionomicina (200ng/mL). Los niveles de expresión de CRTAM fueron evaluados por citometría de flujo 12h después de la activación (Figura 21). Encontramos que la sobre-expresión de ZEB1 causa una fuerte reducción de la proteína total CRTAM en la superficie de las células Jurkat (Figura 21).

Como segundo paso, para definir si ZEB1 participa en la disminución de CRTAM observada después del estímulo de activación, las células Jurkat fueron transfectadas e inmediatamente sometidas al estímulo de activación con PMA/Ionomicina por 12 horas. Analizamos los niveles de expresión de CRTAM por medio de citometría de flujo y al comparar los niveles de expresión contra las células control, observamos que la sobre-

expresión de ZEB1 de nuevo es suficiente para disminuir la expresión de CRTAM (Figura 22). Es decir, la expresión de CRTAM (mediada por un estímulo de activación) es disminuida por la sobre-expresión de ZEB1.

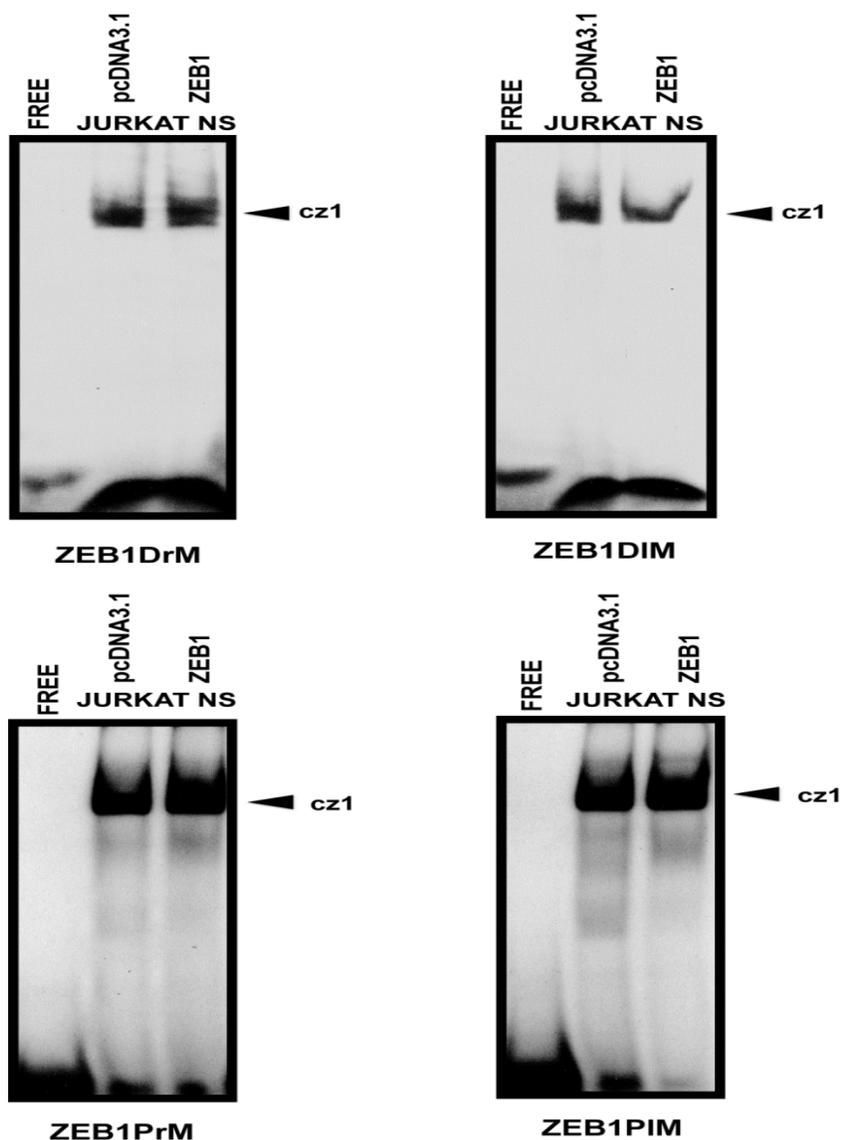


Figura 20. Los elementos cajas E proximales no participan en la represión ejercida por ZEB1 en el promotor del gen hCRTAM. Ensayos de retardamiento en gel que muestran la formación de complejos DNA-proteína por la interacción entre las sondas con las secuencias mutadas de las cajas tipo E y proteínas nucleares. Células Jurkat fueron transfectadas transitoriamente con 2 μ g de los vectores de expresión pcDNA3.1 o pcDNA3.1-ZEB1. Los extractos nucleares se obtuvieron 48 h pos-transfección. Este resultado es representativo de 3 experimentos realizados independientemente con resultados similares.

En tercer lugar, las células Jurkat fueron activadas, permitiendo que los activadores transcripcionales como AP-1 promuevan la expresión de CRTAM; después de 3h las células fueron transfectadas y el estímulo de activación fue extendido por 15h (Figura 23). Los niveles de expresión de CRTAM por citometría de flujo, mostraron disminución con respecto al control. Todos estos datos indican que ZEB1 es suficiente para regular la expresión de CRTAM durante el proceso de activación linfocitaria.

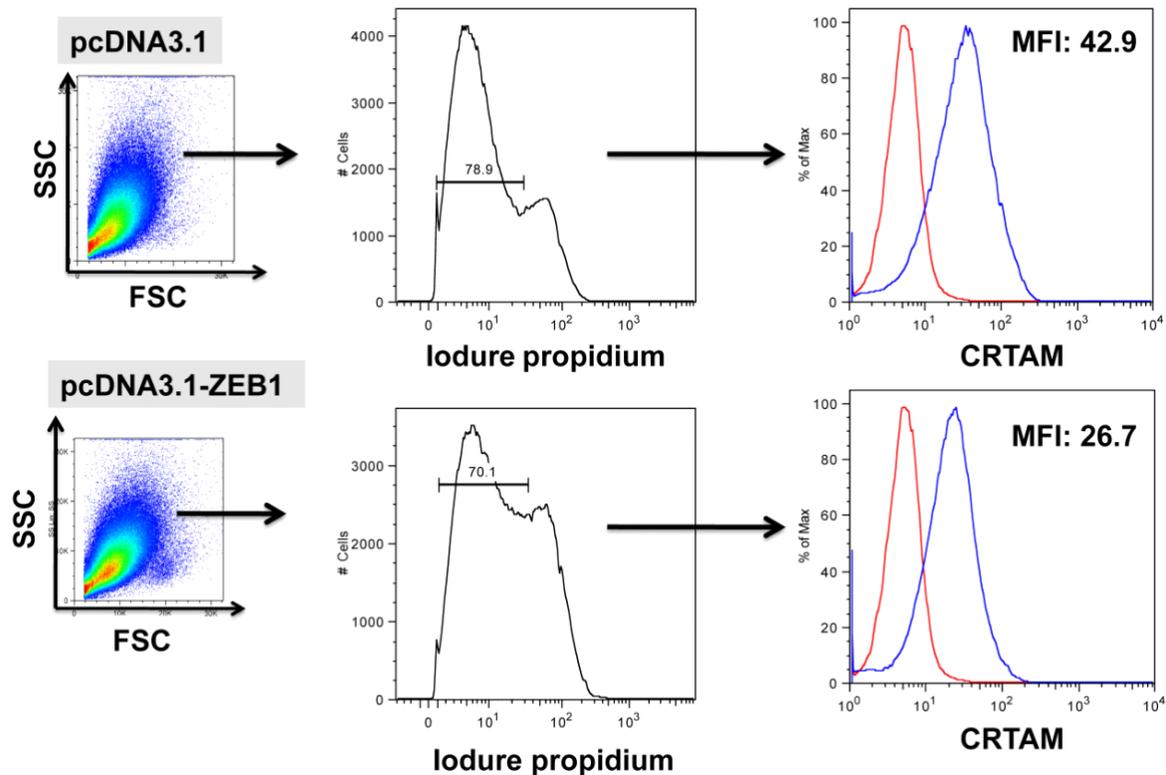


Figura 21. La sobreexpresión de ZEB1, previa a la activación linfocitaria, disminuye la expresión de CRTAM. Células T Jurkat fueron transfectadas con 2µg del vector de expresión pcDNA3.1 o pcDNA3.1-ZEB1 usando el equipo de electroporación Nucleofector (Amaxa-Lonza) y el kit Human T cell nucleofector (Lonza) siguiendo las instrucciones del proveedor. 48h después de la transfección las células fueron estimuladas con PMA (2ng/mL) y Ionomicina (200ng/mL) por 12h. Se muestra la expresión de CRTAM en células Jurkat previamente transfectadas por 48h y activadas por 12h. Este resultado es representativo de tres experimentos realizados independientemente con resultados similares.

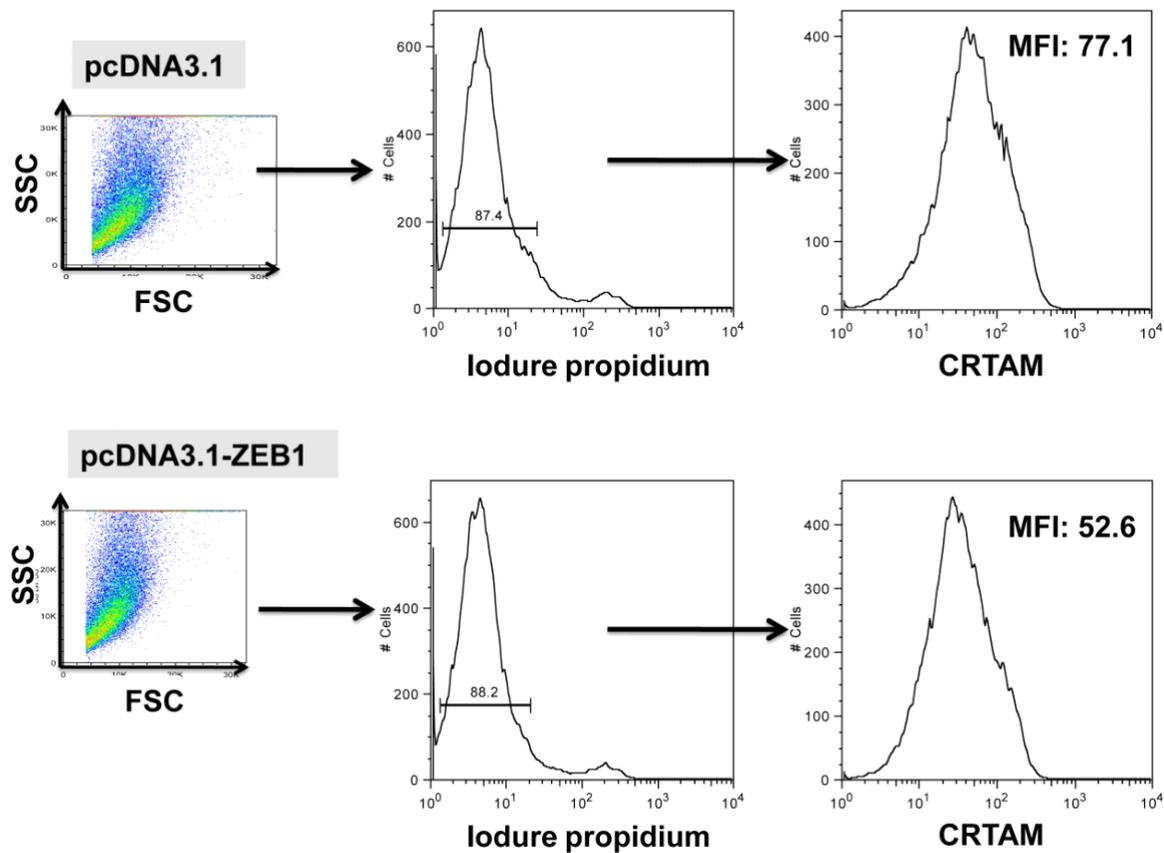


Figura 22. La sobreexpresión de ZEB1, a la par con el estímulo de activación linfocitaria, disminuye la expresión de CRTAM. Células T Jurkat fueron transfectadas con 2 μ g del vector de expresión pcDNA3.1 o pcDNA3.1-ZEB1 usando el equipo de electroporación Nucleofector (Amaxa-Lonza) y el estuche *Human T cell nucleofector* (Lonza) siguiendo las instrucciones del proveedor. Inmediatamente después de la transfección las células fueron estimuladas con PMA (2ng/mL) y Ionomicina (200ng/mL) por 12h. Se muestra la expresión de CRTAM en células Jurkat transfectadas y activadas por 12h. El resultado que se muestra en la figura es representativo de 3 experimentos realizados independientemente con resultados similares.

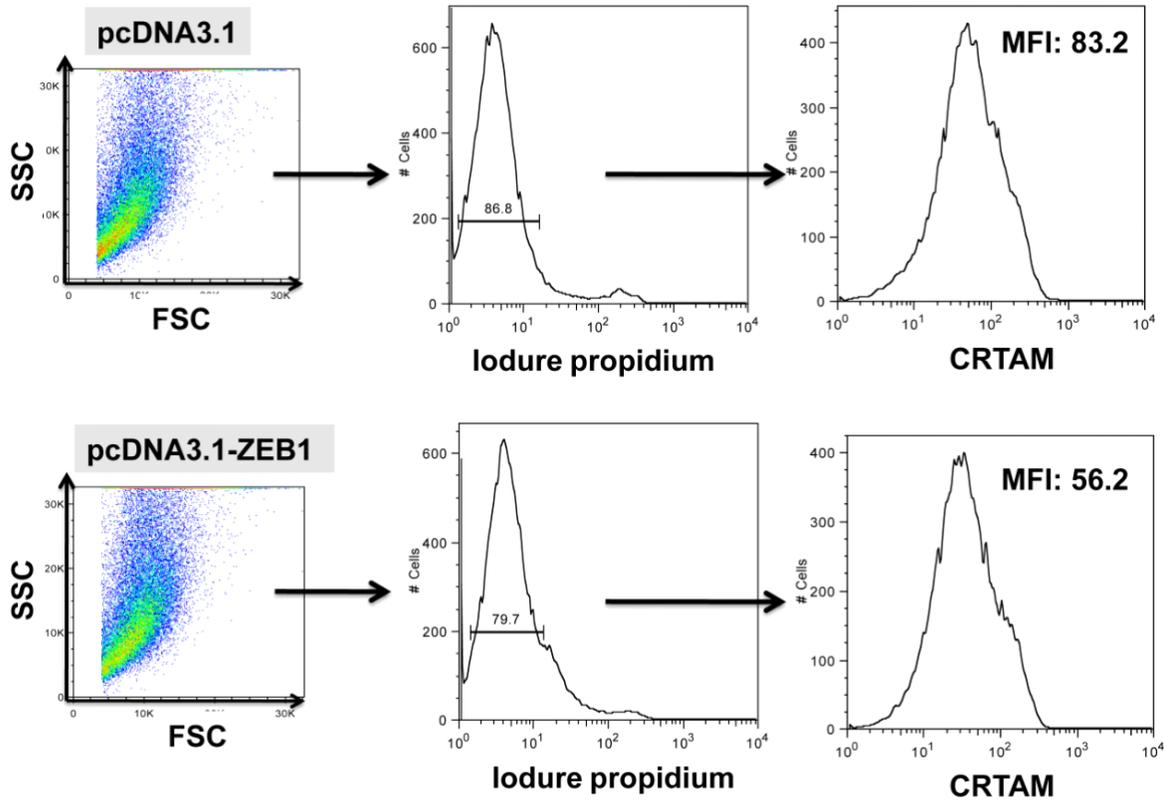


Figura 23. La sobreexpresión de ZEB1, posterior al estímulo de activación linfocitaria, disminuye la expresión de CRTAM. Células T Jurkat fueron activadas por 3h y transfectadas con 2 μ g del vector de expresión pcDNA3.1 o pcDNA3.1-ZEB1 usando el equipo de electroporación Nucleofector (Lonza) y el estuche *Human T cell nucleofector* (Lonza), siguiendo las instrucciones del proveedor. Después de la transfección se dió el estímulo de activación con PMA (2ng/mL) y Ionomicina (200ng/mL) por un total de 15h. Se muestra la expresión de CRTAM en células Jurkat transfectadas 12h y activadas por 15h. Experimento representativo de tres repeticiones.

DISCUSION

La regulación de la expresión génica establece los perfiles de expresión específicos de una célula particular o de estadio de diferenciación específica [86]. El inicio de la transcripción es probablemente el paso regulador más importante en el control de la expresión génica. Los factores transcripcionales, proteínas que se unen a secuencias específicas de DNA en las regiones reguladoras de los genes, regulan el inicio de la transcripción de genes específicos [87]. Muchos de los genes son expresados en diferentes etapas del desarrollo, en algunos casos en diferentes linajes celulares, y en otros, sólo después de la activación. ¿Cómo y cuándo son estos genes diferencialmente regulados en respuesta a distintas señales de desarrollo o de activación, si las células contienen un grupo común de sitios de unión a las mismas proteínas? Mientras que la respuesta a esta pregunta es compleja y no ha sido totalmente resuelta, existen diversos modelos que permiten una pequeña redundancia en las secuencias reguladoras en *cis* para diferentes genes, mientras se mantienen el potencial para la expresión diferencial.

Es posible que los elementos reguladores negativos o silenciadores jueguen un papel importante en la expresión de los genes celulares de linaje específico T [88]. La regulación de la expresión génica durante la diferenciación linfocítica es un complejo proceso que involucra interacciones entre múltiples elementos de regulación transcripcional positivos y negativos [88]. Diversos cambios en la expresión génica representan la culminación de la vía de señalización iniciada en la estimulación del TCR y son requeridos para que la célula T sea totalmente competente al proceso de proliferación y posea la habilidad de producir citocinas efectoras [89].

Existe poca información o evidencia de los factores de unión al DNA capaces de controlar la transcripción del gen CRTAM. Los elementos de control en la región reguladora que dirigen la expresión del promotor CRTAM humano apenas empiezan a describirse [79]. Por ello hemos enfocado nuestro trabajo en estudiar los mecanismos involucrados en el control negativo de la transcripción del gen CRTAM. El presente estudio identificó una

nueva región de unión para la proteína ZEB1 en el promotor del gen CRTAM humano. En la región distal de CRTAM hay dos cajas E (ZEB1Dr y ZEB1DI) (Figura 17). Una caja E puede ser reconocida por ZEB1. Las cajas E se han conservado durante la evolución debido a su importancia en la regulación transcripcional, particularmente de diversos genes del sistema inmune [90]. Particularmente, este factor de transcripción tiene una función reguladora en células T quiescentes y durante una fase tardía de la activación de linfocito T. ZEB1 ha sido extensivamente estudiado por la represión transcripcional que ejerce sobre el gen de la citocina IL-2. ZEB1 puede cooperar con CtBP2 y HDAC1 para reprimir la expresión de IL-2 en células T a través de elementos específicos en el promotor del gen IL-2, una caja E llamada NRE [23]. Dado que CRTAM es una molécula de activación como IL-2, mantener una expresión controlada probablemente podría requerir de ZEB1. Mediante el uso de un análisis de mutantes por sustitución de cajas E, definimos que los elementos del grupo distal, ZEB1mDr y ZEB1mDI, son importantes para mantener la expresión del gen CRTAM. Mostramos que la mutación simultánea de ambas cajas E conlleva a una sustancial de-represión del promotor en células Jurkat (Figura 19). Sin embargo cuando mutamos el grupo de elementos proximales, ZEB1mPr y ZEB1mPI, no se observaron efectos (Figura 19). Estas observaciones demuestran que ZEB1Dr y ZEB1DI se encuentran involucrados en el silenciamiento del promotor del gen CRTAM humano, previo a la activación de la célula T. Cuando realizamos ensayos de retardamiento en gel de cada secuencia de caja tipo E mutada, observamos que la diferencia funcional observada entre los elementos distales y proximales se debe a la falta de reconocimiento y unión de ZEB1 en los elementos distales (Figura 20).

La represión mediada por ZEB1 en el promotor CRTAM implica la unión al elemento de ZEB1Dr (Figura 19). Este es un hallazgo importante porque ZEB1 requiere un sitio de unión con el fin de tener un efecto sobre la función del promotor. Una vez unido, ZEB1 puede mediar la actividad de represión cis- o trans- [20, 21, 91]. ZEB1 compite con otros activadores de la transcripción básicos y de tipo hélice-asa-hélice (bHLH) para la unión al mismo elemento en la cromatina y es capaz de reprimir activamente la transcripción de sus genes blanco. Por ejemplo, ZEB1 une el potenciador de CD4 proximal y compite con los activadores de la transcripción E12 y HEB para la unión a la cromatina [21]. En particular, la secuencia central del elemento ZEB1Dr es idéntica a la encontrada en la NRE, elemento represor del promotor de IL-2 [22].

La sobre-expresión de ZEB1 en células Jurkat resultó en la represión de las construcciones reporteras que contienen el promotor de CRTAM transfectadas de manera transitoria (p1900-CRTAM, p400-CRTAM) (Figura 18). Se demostró que una construcción que carece de un sitio de unión a ZEB1, ZEB1Dr (Figura 1) o llevar a un sitio ZEB1Dr mutado (Figura 19) se redujo significativamente la expresión del gen reportero en células Jurkat no activadas. Estos resultados indican que en linfocitos T en reposo, la unión de ZEB1 al sitio ZEB1Dr es suficiente para reprimir la expresión CRTAM. Asimismo, demostramos que ZEB1 es capaz de reducir la expresión de la proteína CRTAM en la superficie de células Jurkat estimuladas (Figura 21, Figura 22, Figura 23). Todos estos datos indican que ZEB1 reprime el promotor del gen CRTAM humano. ZEB1 es conocido por controlar la expresión temporal y espacial de genes específicos durante la diferenciación muscular [76]. La pérdida dirigida del extremo C-terminal de ZEB1 en ratón indica que ZEB1 también regula procesos como la diferenciación de la célula T [68]. Este ratón se caracteriza por un severo defecto en la diferenciación de las células T que resulta en una reducción en el número total de timocitos. En nuestro grupo de trabajo, previamente hemos observado que al bloquear la interacción CRTAM-Nect2 se perjudica el crecimiento del timo, impactando el mantenimiento estructural de los lóbulos tímicos [92].

Hay poca información o evidencia que se puede utilizar para dilucidar el mecanismo que regula la expresión CRTAM. Nuestro objetivo en este estudio fue descubrir los factores críticos para la regulación CRTAM. Esto es importante porque CRTAM es una molécula esencial en la regulación del sistema inmune y la adhesión celular epitelial [93]. De hecho, las células T de ratones que no expresan CRTAM muestran una reducción de IFN, IL-22 e IL-17 [74]. Entender mejor el mecanismo que delimita y regula la expresión CRTAM en las células T es importante ya que esto puede ayudar en el descubrimiento de nuevos blancos para el desarrollo de terapias innovadoras.

ZEB1 es un regulador maestro de la regulación de la expresión génica e inicialmente fue descrito como un represor del enhancer del gen δ -cristalino (Funanashi y col., 1993). Durante los últimos años ha incrementado la evidencia que muestra que ZEB1 es crítico no sólo para el control de procesos como la transición epitelio-mesénquima (EMT) sino también en el desarrollo y función de

las células inmunes (Higashi et al, 1999) (Williams et al, 1992). En este estudio identificamos una región reguladora en el promotor del gen CRTAM que funciona en células en estado quiescente y de activación.

Williams y colaboradores entre otros grupos han mostrado que ZEB1 es capaz de regular la respuesta inmune adaptativa mediante la represión transcripcional de genes importantes como la citocina IL-2. CRTAM al igual que IL-2 tienen una expresión dependiente del estímulo de activación y se regulan de manera temporal debido a su importancia (Wang et al., 1991; Yeh et al., 2008; Valle-Ríos et al., 2009).

Aquí, determinamos que ZEB1 reprime el promotor del gen CRTAM y que esta represión es importante para el control de la expresión de CRTAM. La represión mediada por ZEB1 en el promotor de CRTAM involucra la unión al elemento ZEB1Dr (Figura 20). Este es un descubrimiento importante debido a que ZEB1 requiere un sitio de unión para poder ejercer un efecto en la función del promotor del gen blanco. Una vez unido, ZEB1 ha demostrado actuar a través de dos mecanismos de represión, en *cis*- o *trans*- (Brabletz et al., 1999; Genetta et al., 1994; Remacle et al., 1999). ZEB1 compite con activadores transcripcionales de la familia bHLH (basic helix-loop-helix) por la unión al DNA de los mismos elementos y así es capaz de reprimir la transcripción de manera activa en sus genes blanco. Por ejemplo, ZEB1 se une al enhancer proximal en el gen CD4 y compite con los activadores transcripcionales E12 y HEB por la unión al DNA (Brabletz et al., 1999). Además, ZEB1 es capaz de unirse a un elemento en el DNA conocido como caja tipo E y establecer una maquinaria de represión desde el sitio de unión, por ejemplo, el elemento NRE-A en el promotor del gen IL-2 (Wang et al., 2009). Aparentemente este es el caso para el promotor del gen CRTAM. Cabe señalar que la secuencia encontrada en el elemento ZEB1Dr es idéntica a la encontrada en el elemento NRE-A del promotor de IL-2 (Williams et al., 1991). Nosotros mostramos que una construcción carente del sitio de unión ZEB1Dr (Figura 17) o que contiene al sitio ZEB1Dr mutado (Figura 19) producen un aumento significativo en la expresión génica en células Jurkat en reposo. Estos resultados indican que en linfocitos T en reposo, la unión de ZEB1 al sitio ZEB1Dr es suficiente para reprimir la expresión de CRTAM.

Establecimos que la sobre-expresión de ZEB1 es capaz de modular la expresión de CRTAM (Figuras 21, 22 y 23) y esta represión en la actividad es dependiente de la cantidad de DNA utilizado en los experimentos de transfección (Fig. 18).

Interesantemente, la línea celular Jurkat tiene una expresión de ZEB1 muy baja (Hidaka et al., 2008), pero muestran un nivel basal de expresión de CRTAM (Valle-Ríos et al., 2009). De manera contraria, linfocitos T no estimulados tienen un nivel basal de expresión de ZEB1 pero no de CRTAM (datos no mostrados). Parece que existen dos mecanismos diferentes que involucran a ZEB1 en la represión del promotor del gen CRTAM. El mecanismo que actúa en células no estimuladas sugiere que la expresión de ZEB1 es suficiente para la represión de CRTAM. La unión de ZEB1 al elemento NRE en el promotor del gen IL-2 rompe la formación de un complejo de transcripción estable, así inhibiendo la expresión de IL-2 (Williams et al., 1991). Se ha demostrado que ZEB1 interactúa fuertemente con CTBP2 y HDAC1, un complejo co-represor, para reprimir la expresión de IL-1 después de activación antigénica del linfocito T (Wang et al; 2009).

Sería interesante evaluar si este mecanismo molecular se encuentra involucrado en la represión mediada por ZEB1 en el promotor del gen CRTAM después de la activación de la célula T.

ZEB1 es capaz de regular la expresión exacta, temporal y espacial de genes específicos durante la diferenciación muscular (Takagi et al., 1998). Además, experimentos donde se elimina la región Carboxilo terminal del gen ZEB1 en ratón indican que ZEB1 también es un importante regulador de la transcripción génica durante la diferenciación de la célula T (Higashi et al., 1997). El modelo murino de Higashi y colaboradores muestra un severo defecto en la diferenciación de la célula T, que resulta en una reducción del número total de timocitos (Higashi et al., 1997).

Previamente nuestro grupo de trabajo mostró que durante la ontogenia de la célula T, los timocitos expresan CRTAM, y que bloqueando la interacción entre CRTAM y su ligando Necl2 se impacta el crecimiento del timo así regulando la estructura de los lóbulos tímicos (Medina-Contreras et al., 2010). Estos datos sugieren que la expresión de CRTAM en los timocitos se regula por factores transcripcionales diferentes a ZEB1. En este contexto, cuando analizamos el promotor del gen CRTAM de ratón, notamos la presencia de un mayor número de cajas tipo E (datos no mostrados). La presencia de un mayor número de cajas tipo E en el promotor del ratón con respecto al humano abre la posibilidad de mecanismos reguladores adicionales. En este respecto, se ha establecido que ZEB1

pierde la capacidad de represión por competencia activa con factores de transcripción positivos como Gata-3, E2A, HEB, AP4, proteínas con dedos de Zinc (como Ikaros) o con factores tipo Kruppel (como ThPOK). Todos estos participan durante el desarrollo de la célula T (Ellmeier et al., 2013). Sería interesante determinar los mecanismos de regulación en el promotor de CRTAM durante el desarrollo de la célula T.

Existe poca información o evidencia que pueda ser usada para elucidar los mecanismos que regulan la expresión de CRTAM. Nuestro objetivo en este estudio fue descubrir los factores críticos en la regulación transcripcional de CRTAM. Dicha información es importante dado que CRTAM es una molécula esencial en la regulación del sistema inmune y para la adhesión celular epitelial (Garay et al., 2010). De hecho, células T provenientes del ratón carente para CRTAM muestran una producción reducida de IFN γ , IL-22, e IL-17 (Yeh et al., 2008). La comprensión de los mecanismos que regulan la expresión de CRTAM en células T es importante dado que permitirían en la innovación de nuevas alternativas terapéuticas.

CONCLUSIONES

- Localizamos y caracterizamos una región de control negativo en el promotor del gen CRTAM que denominamos elementos distales ZEB1Dr y ZEB1DI.
- ZEB1 actúa como un represor para CRTAM a través su unión a los elementos distales (ZEB1Dr y ZEB1DI) en el promotor del gen CRTAM. La pérdida de la secuencia canónica de estos sitios libera la represión transcripcional ejercida por ZEB1.
- ZEB1 es capaz de reprimir la expresión de CRTAM en condiciones de estimulación linfocitaria.

PERSPECTIVAS

- Determinar por medio de un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) la presencia de ZEB1 en el promotor del gen CRTAM en condiciones de reposo y estimulación.
- Caracterizar los complejos co-represores asociados al represor transcripcional ZEB1 en el promotor del gen CRTAM a través de un ensayo de co-inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).
- Determinar la participación de la familia de microRNAs mir-200 en la regulación de la expresión del gen CRTAM en células T en estado de reposo y activación antigénica.
- Caracterizar el mecanismo de regulación positiva y negativa del gen CRTAM durante la ontogenia del linfocito T.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roitt MI & Delves JM (2003) *Inmunología fundamentos* (Buenos Aires, Argentina.) 11 Ed.
2. Weir MD & Stewart J (1999) *Inmunología* (México, D.F.) 3 Ed.
3. Johnson JJ, *et al.* (2003) Prenatal and postnatal myeloid cells demonstrate stepwise progression in the pathogenesis of MLL fusion gene leukemia. *Blood* 101(8):3229-3235.
4. Parslow TG, Stites DP, Terr AI, & Imboden JB (2002) *Inmunología básica y clínica* (México, D. F.).
5. Kioussis D & Ellmeier W (2002) Chromatin and CD4, CD8A and CD8B gene expression during thymic differentiation. *Nat Rev Immunol* 2(12):909-919.
6. Murphy KM & Reiner SL (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2(12):933-944.
7. Ellmeier W, Sawada S, & Littman DR (1999) The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development. *Annu Rev Immunol* 17:523-554.
8. Regueiro-González JR, López-Larrea C, González-Rodríguez S, & Martínez-Naves E (2002) *Inmunología, Biología y patología del sistema inmune*. (Madrid, España.).
9. Cantrell D (1996) T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 14:259-274.
10. Berridge MJ (2005) Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu Rev Physiol* 67:1-21.
11. Medzhitov R & Horng T (2009) Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol* 9(10):692-703.
12. Chen X, Wang J, Woltring D, Gerondakis S, & Shannon MF (2005) Histone dynamics on the interleukin-2 gene in response to T-cell activation. *Mol Cell Biol* 25(8):3209-3219.
13. Bunting K, Wang J, & Shannon MF (2006) Control of interleukin-2 gene transcription: a paradigm for inducible, tissue-specific gene expression. *Vitam Horm* 74:105-145.
14. Arendt CW, Albrecht B, Soos TJ, & Littman DR (2002) Protein kinase C-theta;: signaling from the center of the T-cell synapse. *Curr Opin Immunol* 14(3):323-330.
15. Kronke M, Leonard WJ, Depper JM, & Greene WC (1985) Sequential expression of genes involved in human T lymphocyte growth and differentiation. *J Exp Med* 161(6):1593-1598.
16. Sun Z, *et al.* (2000) PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404(6776):402-407.
17. Abbas K & Lichtman HA (2001) *Basic immunology* (Philadelphia.).
18. Mustelin T & Tasken K (2003) Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem J* 371(Pt 1):15-27.
19. Postigo AA & Dean DC (1997) ZEB, a vertebrate homolog of Drosophila Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation. *EMBO J* 16(13):3935-3943.
20. Genetta T, Ruezinsky D, & Kadesch T (1994) Displacement of an E-box-binding repressor by basic helix-loop-helix proteins: implications for B-cell specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol Cell Biol* 14(9):6153-6163.
21. Brabletz T, *et al.* (1999) Negative regulation of CD4 expression in T cells by the transcriptional repressor ZEB. *Int Immunol* 11(10):1701-1708.
22. Williams TM, *et al.* (1991) Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression. *Science* 254(5039):1791-1794.
23. Yasui DH, *et al.* (1998) Transcriptional repression of the IL-2 gene in Th cells by ZEB. *J Immunol* 160(9):4433-4440.

24. Gheldof A, Hulpiau P, van Roy F, De Craene B, & Berx G (2012) Evolutionary functional analysis and molecular regulation of the ZEB transcription factors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69(15):2527-2541.
25. Sekido R, *et al.* (1996) Organization of the gene encoding transcriptional repressor deltaEF1 and cross-species conservation of its domains. *Gene* 173(2):227-232.
26. Postigo AA & Dean DC (1999) ZEB represses transcription through interaction with the corepressor CtBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12):6683-6688.
27. Eger A, *et al.* (2005) DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 24(14):2375-2385.
28. Hurt EM, Saykally JN, Anose BM, Kalli KR, & Sanders MM (2008) Expression of the ZEB1 (deltaEF1) transcription factor in human: additional insights. *Mol Cell Biochem* 318(1-2):89-99.
29. Das S, Becker BN, Hoffmann FM, & Mertz JE (2009) Complete reversal of epithelial to mesenchymal transition requires inhibition of both ZEB expression and the Rho pathway. *BMC Cell Biol* 10:94.
30. Bui T, *et al.* (2009) ZEB1 links p63 and p73 in a novel neuronal survival pathway rapidly induced in response to cortical ischemia. *PLoS One* 4(2):e4373.
31. Chua HL, *et al.* (2007) NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2. *Oncogene* 26(5):711-724.
32. Bendoraite A, *et al.* (Regulation of miR-200 family microRNAs and ZEB transcription factors in ovarian cancer: evidence supporting a mesothelial-to-epithelial transition. *Gynecol Oncol* 116(1):117-125.
33. Long J, Zuo D, & Park M (2005) Pc2-mediated sumoylation of Smad-interacting protein 1 attenuates transcriptional repression of E-cadherin. *J Biol Chem* 280(42):35477-35489.
34. Sabourin JC, *et al.* (2009) A mesenchymal-like ZEB1(+) niche harbors dorsal radial glial fibrillary acidic protein-positive stem cells in the spinal cord. *Stem Cells* 27(11):2722-2733.
35. Peter ME (2009) Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluripotency and cancer progression. *Cell Cycle* 8(6):843-852.
36. Spaderna S, Brabletz T, & Opitz OG (2009) The miR-200 family: central player for gain and loss of the epithelial phenotype. *Gastroenterology* 136(5):1835-1837.
37. Bracken CP, *et al.* (2008) A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 68(19):7846-7854.
38. Burk U, *et al.* (2008) A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 9(6):582-589.
39. Gregory PA, *et al.* (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 10(5):593-601.
40. Korpala M, Lee ES, Hu G, & Kang Y (2008) The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* 283(22):14910-14914.
41. Christ M, *et al.* (1994) Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice. *J Immunol* 153(5):1936-1946.
42. Isakov N & Altman A (2002) Protein kinase C(theta) in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 20:761-794.

43. Sutcliffe EL & Rao S (2011) Duplicity of protein kinase C-theta: Novel insights into human T-cell biology. *Transcription* 2(4):189-192.
44. Sutcliffe EL, *et al.* (2012) Chromatinized Protein Kinase C-theta: Can It Escape the Clutches of NF-kappaB? *Frontiers in immunology* 3:260.
45. Browne G, Whitworth C, Bellamy C, & Ogilvie MM (2001) Acute allograft glomerulopathy associated with CMV viraemia. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 16(4):861-862.
46. Sekido R, Murai K, Kamachi Y, & Kondoh H (1997) Two mechanisms in the action of repressor deltaEF1: binding site competition with an activator and active repression. *Genes Cells* 2(12):771-783.
47. Postigo AA, Sheppard AM, Mucenski ML, & Dean DC (1997) c-Myb and Ets proteins synergize to overcome transcriptional repression by ZEB. *EMBO J* 16(13):3924-3934.
48. Wellner U, *et al.* (2009) The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol* 11(12):1487-1495.
49. Du J, *et al.* (2009) BMP-6 inhibits microRNA-21 expression in breast cancer through repressing deltaEF1 and AP-1. *Cell Res* 19(4):487-496.
50. Selcuklu SD, Donoghue MT, & Spillane C (2009) miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 4):918-925.
51. Ikenoue T, Inoki K, Zhao B, & Guan KL (2008) PTEN acetylation modulates its interaction with PDZ domain. *Cancer Res* 68(17):6908-6912.
52. Wang J, *et al.* (2009) The transcription repressor, ZEB1, cooperates with CtBP2 and HDAC1 to suppress IL-2 gene activation in T cells. *Int Immunol* 21(3):227-235.
53. Tryndyak VP, Beland FA, & Pogribny IP (2009) E-cadherin transcriptional down-regulation by epigenetic and microRNA-200 family alterations is related to mesenchymal and drug-resistant phenotypes in human breast cancer cells. *Int J Cancer*.
54. Pruitt K, *et al.* (2006) Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet* 2(3):e40.
55. Zhang J, *et al.* (2009) The type III histone deacetylase Sirt1 is essential for maintenance of T cell tolerance in mice. *The Journal of clinical investigation* 119(10):3048-3058.
56. Scott GK, Mattie MD, Berger CE, Benz SC, & Benz CC (2006) Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res* 66(3):1277-1281.
57. Wang J, *et al.* (2007) Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature* 446(7138):882-887.
58. Postigo AA (2003) Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *EMBO J* 22(10):2443-2452.
59. Lerner UH, Sundqvist G, Ohlin A, & Rosenquist JB (1998) Bacteria inhibit biosynthesis of bone matrix proteins in human osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res* (346):244-254.
60. Koipally J & Georgopoulos K (2000) Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity. *J Biol Chem* 275(26):19594-19602.
61. Sewalt RG, Gunster MJ, van der Vlag J, Satijn DP, & Otte AP (1999) C-Terminal binding protein is a transcriptional repressor that interacts with a specific class of vertebrate Polycomb proteins. *Mol Cell Biol* 19(1):777-787.
62. Kagey MH, Melhuish TA, & Wotton D (2003) The polycomb protein Pc2 is a SUMO E3. *Cell* 113(1):127-137.

63. Whitmarsh AJ & Davis RJ (2000) Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 57(8-9):1172-1183.
64. Yang SH, Sharrocks AD, & Whitmarsh AJ (2003) Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* 320:3-21.
65. Costantino ME, Stearman RP, Smith GE, & Darling DS (2002) Cell-specific phosphorylation of Zfp transcription factor. *Biochem Biophys Res Commun* 296(2):368-373.
66. Boone C, Gregoire F, De Clercq L, & Remacle C (1998) 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) stimulates the adipose conversion of piglet preadipocytes in primary culture. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44(8):1265-1274.
67. Thomas P, *et al.* (1998) Clinical patterns and trends of outcome of elderly patients with bronchogenic carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 13(3):266-274.
68. Higashi Y, *et al.* (1997) Impairment of T cell development in deltaEF1 mutant mice. *J Exp Med* 185(8):1467-1479.
69. Postigo AA & Dean DC (2000) Differential expression and function of members of the zfh-1 family of zinc finger/homeodomain repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6391-6396.
70. Arnold CN, *et al.* (2012) A forward genetic screen reveals roles for Nfkbid, Zeb1, and Ruvbl2 in humoral immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(31):12286-12293.
71. Kennedy J, *et al.* (2000) A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *J Leukoc Biol* 67(5):725-734.
72. Du Pasquier L (2004) Innate immunity in early chordates and the appearance of adaptive immunity. *C R Biol* 327(6):591-601.
73. Patino-Lopez G, *et al.* (2006) Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8+ T lymphocytes. *J Neuroimmunol* 171(1-2):145-155.
74. Yeh JH, Sidhu SS, & Chan AC (2008) Regulation of a late phase of T cell polarity and effector functions by Crtam. *Cell* 132(5):846-859.
75. Nakanishi H & Takai Y (2004) Roles of nectins in cell adhesion, migration and polarization. *Biol Chem* 385(10):885-892.
76. Takagi T, Moribe H, Kondoh H, & Higashi Y (1998) DeltaEF1, a zinc finger and homeodomain transcription factor, is required for skeleton patterning in multiple lineages. *Development* 125(1):21-31.
77. Arase N, *et al.* (2005) Heterotypic interaction of CRTAM with Necl2 induces cell adhesion on activated NK cells and CD8+ T cells. *Int Immunol* 17(9):1227-1237.
78. Irie K, Shimizu K, Sakisaka T, Ikeda W, & Takai Y (2004) Roles and modes of action of nectins in cell-cell adhesion. *Semin Cell Dev Biol* 15(6):643-656.
79. Valle-Rios R, *et al.* (2009) Characterization of CRTAM gene promoter: AP-1 transcription factor control its expression in human T CD8 lymphocytes. *Mol Immunol* 46(16):3379-3387.
80. Rojas-Márquez CA (2009) Análisis del papel de ZEB1 en la actividad transcripcional del gen CRTAM humano. (CINVESTAV, México, D.F.).
81. Valle-Rios R, *et al.* (2009) Characterization of CRTAM gene promoter: AP-1 transcription factor control its expression in human T CD8 lymphocytes. *Molecular Immunology* In press.
82. Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. *J Bacteriol* 62(3):293-300.
83. Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory Manual* (New York, New York) 5th Ed.

84. Lenhard B, *et al.* (2003) Identification of conserved regulatory elements by comparative genome analysis. *J Biol* 2(2):13.
85. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72:248-254.
86. Smale ST, *et al.* (1998) The initiator element: a paradigm for core promoter heterogeneity within metazoan protein-coding genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63:21-31.
87. Staal FJ & Clevers HC (2001) Regulation of lineage commitment during lymphocyte development. *Int Rev Immunol* 20(1):45-64.
88. Leiden JM (1992) Transcriptional regulation during T-cell development: the alpha TCR gene as a molecular model. *Immunol Today* 13(1):22-30.
89. Huang YH, Li D, Winoto A, & Robey EA (2004) Distinct transcriptional programs in thymocytes responding to T cell receptor, Notch, and positive selection signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14):4936-4941.
90. Giroldi LA, *et al.* (1997) Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 241(2):453-458.
91. Remacle JE, *et al.* (1999) New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. *EMBO J* 18(18):5073-5084.
92. Medina-Contreras O, *et al.* (2010) Role of CRTAM during mouse early T lymphocytes development. *Dev Comp Immunol* 34(2):196-202.
93. Garay E, *et al.* (2010) CRTAM: A molecule involved in epithelial cell adhesion. *J Cell Biochem* 111(1):111-122.

Anexo 1. Artículo aceptado para publicación

Rojas-Márquez C, Valle-Rios R, López-Bayghen E, Ortiz-Navarrete V.

CRTAM IS NEGATIVELY REGULATED BY ZEB1 IN T CELLS

Molecular Immunology 2015

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Molecular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimm

Highlights

CRTAM is negatively regulated by ZEB1 in T cells

Molecular Immunology xxx (2015) pp. xxx–xxx

C. Rojas-Marquez, R. Valle-Rios, E. Lopez-Bayghen*, V. Ortiz-Navarrete*

- We examined the transcriptional mechanism of hCRTAM repression.
- ZEB1 represses the hCRTAM promoter in non-stimulated T cells.
- ZEB1 and E-box element binding is required for hCRTAM repression.
- ZEB1 transcriptionally represses hCRTAM, thereby regulating its expression.

UNCORRECTED PROOF



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimm



CRTAM is negatively regulated by ZEB1 in T cells

C. Rojas-Marquez^a, R. Valle-Rios^b, E. Lopez-Bayghen^{c,*}, V. Ortiz-Navarrete^{d,*}

^a Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV)-IPN, Av. IPN No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, México, DF, México

^b Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México, DF, México

^c Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV)-IPN, Av. IPN No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, México, DF, México

^d Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV)-IPN, Av. IPN No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, México, DF, México

article info

Article history:
Received 6 February 2015
Received in revised form 20 March 2015
Accepted 30 March 2015
Available online xxx

Keywords:
CRTAM
ZEB1
E-box-like elements
Transcription
Promoter
Repression

abstract

T cell activation leads to the induction of genes that are required for appropriate immune responses. This includes CRTAM (Class-I MHC-restricted T cell associated molecule), a protein that plays a key role in T cell development, proliferation, and generating cell polarity during activation. We previously characterized the CRTAM promoter and described how AP-1 family members are important for inducing CRTAM expression upon antigenic activation. Here, we show that CRTAM is a molecular target for ZEB1 (zinc finger E-box-binding protein), a homeodomain/Zn finger transcription factor. Overexpression of ZEB1 repressed CRTAM promoter activity, as well as endogenous CRTAM levels in human T cells. ZEB1-mediated transcriptional repression was abolished when E-box-like elements in the CRTAM promoter are mutated. In summary, ZEB1 functions as a transcriptional repressor for the CRTAM gene in both non-stimulated and stimulated T cells, thereby modulating adaptive immune responses.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

CRTAM (Class-I-restricted T cell associated molecule), or CD355, is a member of the nectin-like protein superfamily. CRTAM is constitutively expressed in several non-immune tissues, including liver, lung, testis, kidney, intestine, and brain (Kennedy et al., 2000; Patino-Lopez et al., 2006). Several studies have shown that CRTAM expression in lymphocytes is restricted to cell activation, specifically for TCD8, NK, and TCD4 cells (Boles et al., 2005; Chan et al., 2012; Patino-Lopez et al., 2006; Valle-Rios et al., 2009). CRTAM

plays multiple, diverse roles in lymphocyte function. It promotes TCD8⁺ cell adhesion and retention within the lymph node. Additionally, it induces a late phase of cell polarity during activation and regulates effector function in a small subset of TCD4 cells (Takeuchi et al., 2014).

The effects of CRTAM downregulation have been reported in several previous studies. CRTAM^{-/-} T cells show increased TCR-mediated proliferation and reduced IFN γ and IL22 production (Yeh et al., 2008). Also, blocking CRTAM–Ned2 interaction was shown to impair thymus growth, thus impacting structural maintenance of thymic lobes (Medina-Contreras et al., 2010). Lastly, CRTAM KO mice exhibit reduced protective immunity against viral infection and impaired autoimmune diabetes induction in vivo (Takeuchi et al., 2009; Yeh et al., 2008).

Various signaling proteins, such as Src, Syk, and Tec family members PTK, PLC, PI3K, Vav, calcineurin, and JNK, have been implicated in the regulation of T cell activation and the induction of effector cytokines, mostly at the transcriptional level (Isakov and Altman, 2002). Indeed, it has been established that during lymphocyte activation, the CRTAM gene is mainly regulated at the transcriptional level. Our previous study suggests that in human T cells, signals triggered by TCR activation control CRTAM gene expression through an AP-1 distal regulatory element located in its promoter (Valle-Rios et al., 2009). However, additional

Abbreviations: CRTAM, Class-I MHC-restricted T cell associated molecule; ZEB1, zinc finger E-box binding homeobox 1.

* Corresponding author at: Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV)-IPN No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, México, DF 07360, México.
Tel.: +52 55 50613324; fax: +52 55 50613938.

** Corresponding author at: Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV)-IPN No. 2508, Colonia San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, México, DF 07360, México. Tel.: +52 55 5747 5486; fax: +52 55 5747 3395.

E-mail addresses: ebayghen@investav.mx (E. Lopez-Bayghen), vortiz@investav.mx (V. Ortiz-Navarrete).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.253>
0161-5890/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Rojas-Marquez, C., et al., CRTAM is negatively regulated by ZEB1 in T cells. Mol. Immunol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.253>

downstream effectors or dis-acting regions that directly control CRTAM function and gene expression have yet to be discovered.

An analysis of the human CRTAM promoter shows that it contains two E-box-like elements located at -250 and -684bp from the start site. E-box sequences are recognition sites for the Zfhx family of transcription factors, which contains several members involved in T cell development and effector function (Brabletz et al., 1999; Genetta et al., 1994; Girolodi et al., 1997; Postigo et al., 1997; Remacle et al., 1999; Wang et al., 2009; Williams et al., 1991; Yasui et al., 1998). We previously showed that excluding both E-box-like elements from the CRTAM human promoter increased transcriptional activity (Valle-Rios et al., 2009). Here, we hypothesize that two E-box-like elements, along with the zinc finger transcriptional repressor ZEB1, are regulators of CRTAM expression. Work presented here includes an in-depth study of the human CRTAM promoter that provides insights into the mechanisms behind negative regulation of CRTAM.

2. Material and methods

2.1. Cells

Jurkat cells were cultured in RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) supplemented with 10% FBS, penicillin (50 units/mL), and streptomycin (50 mg/mL) at 37°C under 5% CO₂.

2.2. Transient transfection and reporter gene assays

Transfections were performed with either Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) or by electroporation. For electroporation, 1 × 10⁶ cells were incubated with 10 µg of expression plasmid for each reporter gene, plus either additional expression plasmids or empty vector for a total of 20 µg DNA, in 1 ml of RPMI 1640 medium for 10 min at 4°C. Then, cells were subjected to electroporation at 250 V and 975 mF capacitance using a GenePulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Transfected cells were transferred into fresh media and left to recover for 24 h. For lipid-mediated transfection, plasmid DNA and Lipofectamine 2000 were mixed in basal media, incubated for 30 min, and then applied to the cells (800 µl/well). After 24 h, the transfection medium was removed and replaced with fresh media. Luciferase activity was determined using a luciferase reporter assay system (Promega, Madison, WI, USA) and activity values were normalized to protein content.

2.3. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear extracts from 5 × 10⁶ non-activated, pcDNA3.1 or pcDNA3.1-ZEB1 transfected Jurkat cells were prepared as previously described (Valle-Rios et al., 2009). The binding reaction included radiolabeled probes and 25 or 35 µg of nuclear extract in binding buffer (13 mM HEPES, pH 7.9, 60 mM KCl, 0.13 mM EDTA, 2 mM dithiothreitol, and 10% glycerol). ZEB1Dr probes were either labeled using [³²P] ATP and Klenow fragments, or used for unlabeled competition. For binding analysis,

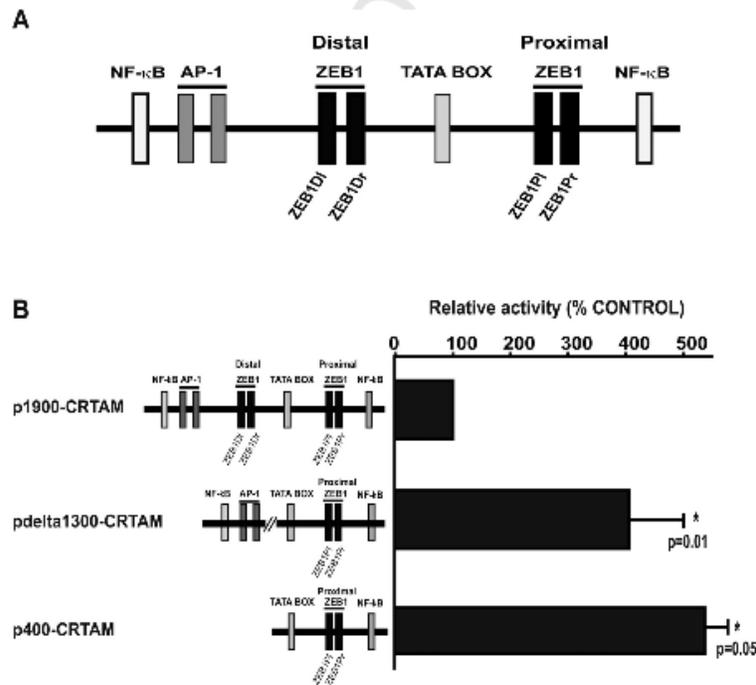


Fig. 1. Identification of a negative regulatory sequence in the CRTAM promoter. (A) Schematic representation of the CRTAM promoter. Identification of control elements made by database analysis (putative binding sites for several transcription factors) is displayed. (B) Results from luciferase activity assay using cells expressing constructs as shown. Jurkat cells were transiently transfected with 10 µg of each construct. Cell lysates were made 24 h after transfection, and luciferase activity experiments were performed. Activity is expressed as relative activity to p1900-CRTAM vector (control). Each value represents the mean ± SEM of three experiments performed in triplicate.

Please cite this article in press as: Rojas-Marquez, C. et al., CRTAM is negatively regulated by ZEB1 in T cells. Mol. Immunol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.253>

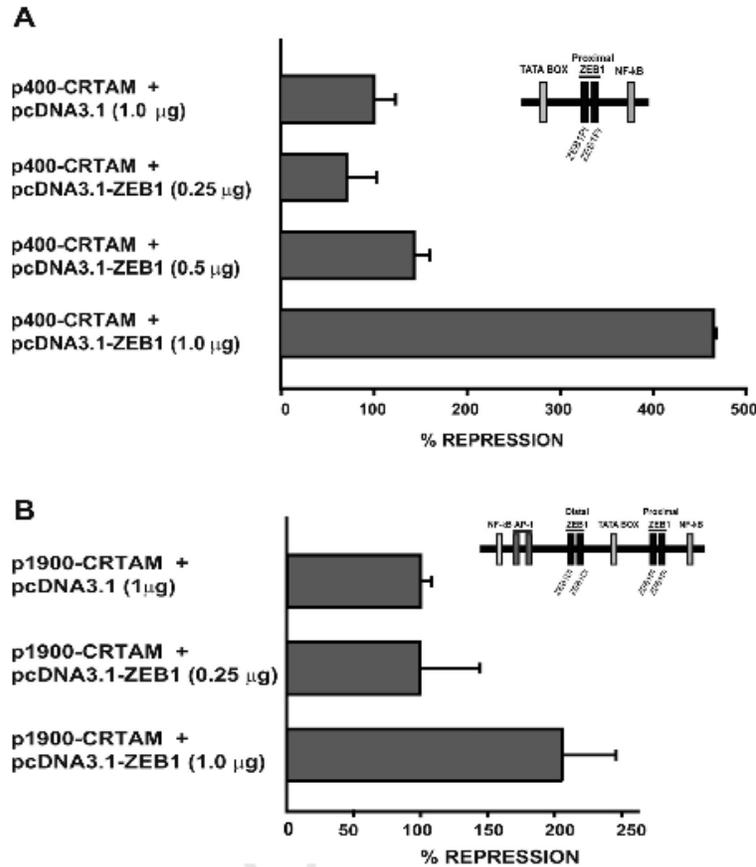


Fig. 2. Exogenous ZEB1 represses CRTAM transcriptional activity. Results from transcriptional activity assays using Jurkat cells co-transfected with either pcDNA3.1-ZEB1 or pcDNA3.1 and p400-CRTAM (A) or p1900-CRTAM (B). Luciferase activity was measured using cell lysates prepared 24 h after transfection. Results are expressed as percent of repression that was calculated as fold increase over the activity level obtained after co-transfection with p1900-CRTAM and pcDNA3.1. Each value represents the mean \pm SEM of three experiments performed in triplicate.

109 the following probes were used: ZEB1Dr, 5'-CTAGAAATGAGTG-
110 AGTGGGCAGGTAATACATGAGTG-3'; E-box mutant, 5'-GGAAGC-
111 AGACCACGGAGTCTGCTCC-3'; ZEB1mDr, 5'-CTAGAAATGAGTGAGT-
112 GGCCATTTAATACATGAGTG-3'; ZEB1mDI, 5'-CTAGGTTCCACCAAG-
113 AGGTGTTCTGGGGCA-3'; ZEB1mPr, 5'-CTAGGTTCCACCAAGGAGG-
114 TGTTCTGGGGCA-3'; ZEB1mPI, 5'-CTAGACATCACTCACACCTC-
115 TCTGCCATCA-3'. DNA-protein binding reactions were carried out
116 for 10 min on ice. DNA-protein complexes were then separated on
117 6% polyacrylamide gels in 0.5% TBE (45 mM Tris, 45 mM boric acid,
118 and 1 mM EDTA) and detected by autoradiography.

119 2.4. Site-directed mutagenesis

120 Using a Quick Change Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene,
121 Cedar Creek, TX, USA), the CAGGTA sequence at -250 bp, CAGGTG
122 at -684 bp, ACACCT at +150 bp, and AGGTG at +204 bp in the p1900-
123 CRTAM construct were mutated to CATTTA, CATTTG, ACATTT, and
124 ATTTG, respectively. PCR was conducted according to manufactur-
125 er's instructions, and candidate clones were sequenced.

The primer sequences used for the PCR reactions were -250 site,
126 forward 5'-gatgggaatgagtgaggcatttaacatgagtgagtg-3', reverse
127 5'-ccactcactcatgtatgaatgccaactcattccactc-3'; -684 site, forward
128 5'-gtagtgcatactagtgctgacattgcaagatgagtgagg-3', reverse 5'-c-
129 caaccattcattcatctgtcaatgtacagcatctagatgcactac-3'; +250 site, for-
130 ward 5'-caattttgtccaacaacacatcactcactttctctgccaatcaaga-3', reverse
131 5'-aaacaattttgtccaacaacacatcactcacaacctctgccaatcaaga-3'; +204
132 site, forward 5'-cccaaatggtccaccaggattgtttctggggcagct-3', re-
133 verse 5'-gtccccaaatggtccaccaggaggtgtctggggcagctaac-3'.
134

135 2.5. Analysis by flow cytometry

136 Anti-human CRTAM, anti-CD69, and corresponding isotype control
137 mAbs were purchased from eBioscience, Inc. (San Diego, CA).
138 Cells were preincubated with 30 mg/mL of human immunoglobulin
139 (Pisa Laboratories, MX, Mexico) in PBS containing 2% FBS and
140 0.01% sodium azide on ice for 15 min. Cells were then stained with
141 antibodies for 30 min and then washed three times with the same
142 buffer. Finally, cells were resuspended in PBS and propidium iodide

Please cite this article in press as: Rojas-Marquez, C. et al., CRTAM is negatively regulated by ZEB1 in T cells. Mol. Immunol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.253>

was added. Stained cells were analyzed using a Cyan Flow Cytometer (Dako, Carpinteria, CA, USA).

2.6. Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM. A one-way ANOVA was performed to determine whether there were significant differences between conditions. When this analysis indicated significance (at the 0.05 level), *post hoc* Student–Newman–Keuls test analysis was used to determine which conditions were significantly different from each other (Rism, GraphPad Software).

3. Results

3.1. E-box sites are important cis-elements involved in CRTAM expression

In silico analysis of the CRTAM promoter sequence revealed four E-box sites (Valle-Rios et al., 2009). These sites have a high binding similarity score for the zinc finger transcription factor ZEB1, with high affinity correlating with the sequences CACCT and CACTG. Both of these sequences are located in the CRTAM promoter in the elements ZEB1DI and ZEB1Dr, and also in the noncanonical E-boxes ZEB1PI and ZEB1Pr (Fig. 1A). Here, ZEB1DI and ZEB1Dr are termed distal E-box elements, while ZEB1PI and ZEB1Pr are termed proximal elements.

Reporter gene assays using transiently transfected Jurkat T cells revealed that deletion of ZEB1Dr and ZEB1DI elements from the CRTAM promoter (p Δ 1300-CRTAM) significantly increased transcriptional activity compared to the cells with the intact 1.9 kbp promoter (p1900-CRTAM) (Fig. 1B). Because the p Δ 1300-CRTAM construct contains AP-1 elements, which are involved in CRTAM expression (Valle-Rios et al., 2009), we also evaluated transcriptional activity in cells containing a construct lacking AP-1 elements (p400-CRTAM). The transcriptional activity in cells containing p400-CRTAM was similar to that in cells containing p Δ 1300-CRTAM (Fig. 1B). These results suggest that distal E-box elements are involved in the repression of the CRTAM promoter activity in non-stimulated T cells.

3.2. Overexpression of ZEB1 downregulates transcriptional activity of the CRTAM promoter

To evaluate the effect of ZEB1 on CRTAM promoter activity, we co-transfected cells from a Jurkat T cell line with full-length ZEB1 (expression plasmid kindly provided by Dr. Hujiro Higashi of Osaka University) and either p1900-CRTAM or p400-CRTAM reporter plasmids. Full-length ZEB1 was found to repress the transcriptional activity of the CRTAM promoter in a dose dependent manner (Fig. 2A and B). These data imply the four E-box elements in the CRTAM promoter are involved in transcription, and that variation in ZEB1 expression impacts this activity. This suggests ZEB1 as a potential CRTAM repressor.

3.3. ZEB1 represses transcription via binding to the CRTAM promoter E-box element ZEB1Dr

To investigate how ZEB1Dr participates in CRTAM regulation, we performed EMSAs using 32 P-radiolabeled oligonucleotides with sequences corresponding to target E-box sites. Nuclear extracts obtained from either non-stimulated or stimulated Jurkat cells were allowed to react with probe oligonucleotides, and then separated on a polyacrylamide gel. Four distinct DNA–protein complexes were observed (Fig. 3, lanes 1–3). The α 2 complex appears specific to nuclear proteins from stimulated cells (Fig. 3, lanes 2–3).

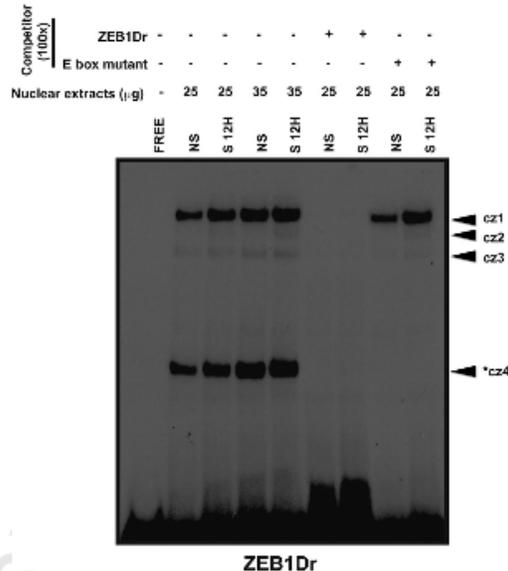


Fig. 3. ZEB1Dr, located in the CRTAM promoter, is recognized by nuclear proteins including ZEB1. Results from an EMSA yielding the formation of several distinct DNA–protein complexes. Nuclear extracts were obtained from Jurkat cells that were either non-stimulated or stimulated with PMA (2 ng/mL) and ionomycin (200 ng/mL). The probe shows distinct complexes with different nuclear extracts concentrations (lanes 2–5) as well as competition assays (lanes 6–9). The results represent a representative of three independent experiments with similar findings.

Indeed, when nuclear protein amounts were increased, the complex bands intensified (Fig. 3, lanes 4–5).

We further investigated specific DNA–protein complex formations by performing competition assays using homologous, unlabeled oligonucleotides probes (Fig. 3, lanes 6–9). As expected, the use of an unlabeled competing probe reduced formation of all complexes (Fig. 3, lanes 6–7). However, when competition experiments were performed using an E-box mutant probe, only α 4 complex formation was inhibited, implying unspecificity (Fig. 3, lanes 8–9). This competition assay also allowed us to observe the specificity of the α 2 complex in stimulated cells (Fig. 3, lane 9). Taken together, these data suggest ZEB1Dr is recognized by and binds with nuclear proteins from Jurkat cells.

To investigate if ZEB1 is a nuclear protein that binds to the ZEB1Dr element, we treated cells with vomitoxin, a mycotoxin that inhibits the DNA-binding capacity of ZEB1 (Yang and Pestka, 2002). Jurkat cells were treated with either vomitoxin or vehicle (ethanol) and nuclear extracts were obtained and used for EMSA assays as previously described. No complex formation was detected when using nuclear extracts from cells treated with vomitoxin (Supplementary Fig. S1 panel A). This inhibition effect is believed to be site-specific because vomitoxin treatment of Jurkat cells produces no effects related to the elements RBPk or NF κ B compared to control cells. However, when using AP-1 element activity as a control for the effects of vomitoxin, we observed changes in protein binding capacity similar to what has been previously reported (Yang and Pestka, 2002). The observed effects following vomitoxin treatment are not due to cell death (Supplementary Fig. S1B). Additionally, this loss of complex formation was observed when using

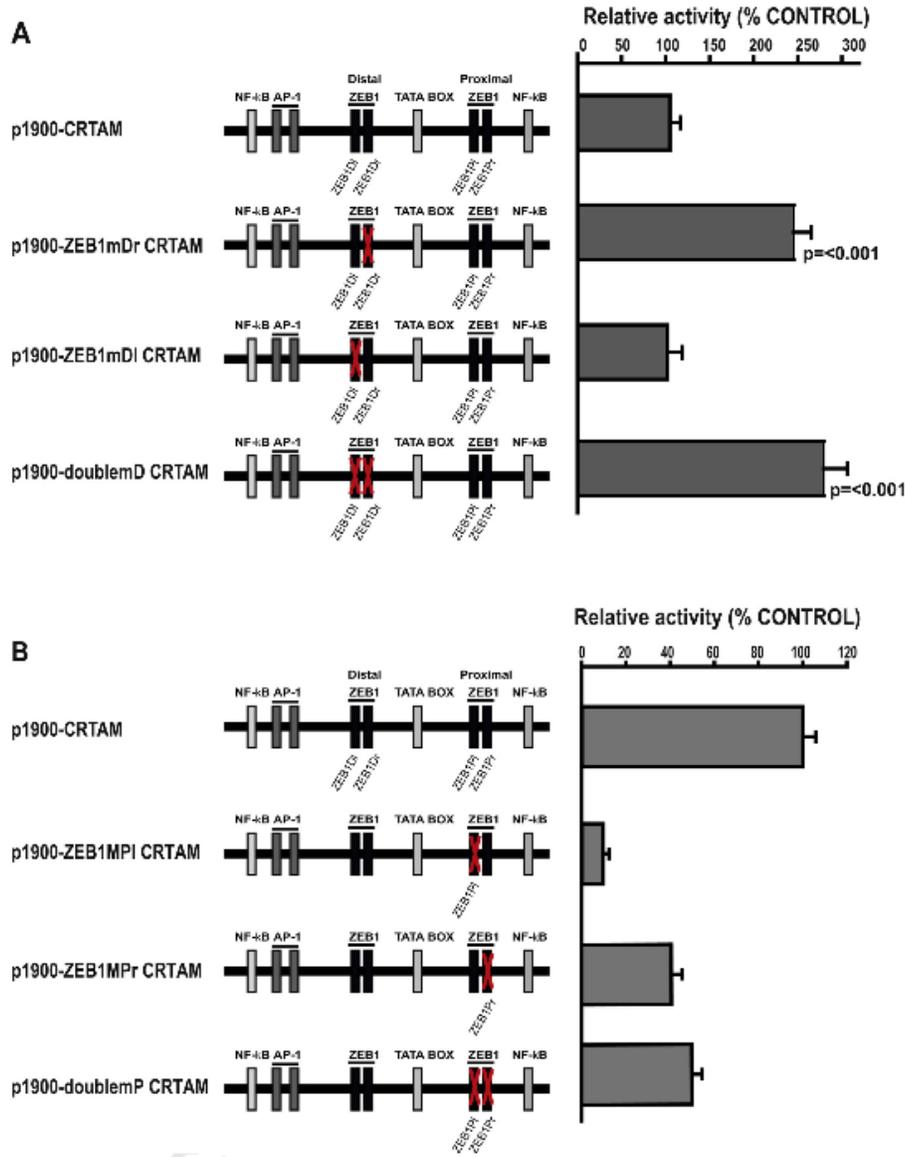


Fig. 4. Effects of E-box mutations on CRTAM promoter activity. Results from luciferase assays showing transcriptional activity produced by mutated versions of the CRTAM promoter in Jurkat cells. Luciferase activity induced by different constructs was measured and normalized to control levels produced using p1900-CRTAM. (A) Reporter activity of distal mutant E-box sites (B) proximal mutant E-box sites. Each value represents the mean \pm SEM of three experiments performed in triplicate.

229 cells treated with vomitoxin and then activated with PMA and
 230 ionomycin (Supplementary Fig. S1C). These results suggest ZEB1
 231 specifically recognizes the element ZEB1Dr contained in the CRTAM
 232 promoter.

233 **Supplementary Fig. S1 related to this article can be**
 234 **found, in the online version, at** [http://dx.doi.org/10.1016/](http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.253)
 235 [j.molimm.2015.03.253](http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.253).

226 3.4. Substitution analysis of E-box sites establishes their role in
 227 negative control of CRTAM promoter activity

228 As our prior results suggest E-box elements contribute to CRTAM
 229 promoter repression (Fig. 2), we produced E-box element mutant
 230 constructs to further study this repressive role. Mutation of the
 231 CAGGTA sequence in ZEB1Dr (p1900-ZEB1mDr, Fig. 4A) led to

Please cite this article in press as: Rojas-Marquez, C. et al., CRTAM is negatively regulated by ZEB1 in T cells. Mol. Immunol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.253>

an approximate two-fold gain in transcriptional activity in Jurk at cells. However, mutating the CAGGTG sequence in ZEB1 (p1900-ZEB1mDI) did not induce derepression of the promoter (Fig. 4A). Importantly, when a construct with two E-box element mutations (p1900-doublemD CRTAM) was tested, it produced a level of CRTAM activation similar to that of the p1900-ZEB1Dr construct. Additionally, mutation of either E-box from the proximal cluster (ZEB1Pr or ZEB1Pr), alone or simultaneously, did not yield derepression of the promoter (Fig. 4B). These results suggest a role for the distal E-box cluster in the regulation of CRTAM promoter activity, and the importance of ZEB1Dr in this function.

3.5. ZEB1 repression is mediated through binding with a canonical E box site in the CRTAM promoter

To confirm that the observed functional differences between the distal and proximal clusters of E-box elements are due to variability in ZEB1 binding, we performed additional EMSAs. These were performed using lysates from unstimulated Jurk at T cells transfected with either pcDNA3.1 or pcDNA3.1-ZEB1 and oligonucleotide probes corresponding to single E-box mutant constructs described earlier. As expected, the E-box elements from the proximal cluster (ZEB1mPr and ZEB1mPI) exhibited higher levels of DNA-protein complex formation compared to experiments that used distal E-box mutations (ZEB1mDr and ZEB1mDI) (Fig. 5A and B). This trend was also observed when using Jurk at cells transfected with pcDNA3.1-ZEB1 (Fig. 5). Thereby, mutation of E-box sites appears sufficient to produce interference with the repressive activity of ZEB1.

3.6. ZEB1 represses expression of endogenous CRTAM

We performed additional experiments to gain insight into the role of ZEB1, specifically testing whether it is a bona fide repressor of endogenous CRTAM in Jurk at T cells. We first wanted to determine if background overexpression of ZEB1 could affect CRTAM expression during cellular activation. For this, Jurk at cells were transiently transfected with either pcDNA3.1 or pcDNA3.1-ZEB1 expression constructs, and then stimulated with PMA (2 ng/mL) and Ionomycin (200 ng/mL) after 48 h of incubation. CRTAM expression levels were assessed 12 h after activation by flow cytometry (Fig. 6A). These results show that ZEB1 overexpression results in downregulation of CRTAM on Jurk at cell surfaces (Fig. 6A).

Additionally, we investigated if ZEB1 participates in CRTAM downregulation that is observed after the cell activation. For this, Jurk at cells were transfected with either pcDNA3.1 or pcDNA3.1-ZEB1, immediately activated with PMA and Ionomycin, and then incubated for 12 h. Flow cytometry analysis revealed CRTAM levels were downregulated in cells overexpressing ZEB1 when compared to control cells (Fig. 6B). Thus, cell activation-mediated CRTAM expression is downregulated by ZEB1 overexpression. Also, to explore the effects of ZEB1 overexpression post-activation of Jurk at cells, we treated cells with PMA and Ionomycin (allowing transcriptional activators like AP-1 to promote CRTAM expression) prior to transfection. After 3 h incubation, cells were transfected with either pcDNA3.1 or pcDNA3.1-ZEB1 and incubated for an additional 12 h (Fig. 6C). Flow cytometry analysis showed CRTAM levels were reduced (Fig. 6C). Taken together, these data suggest ZEB1 overexpression is sufficient to downregulate CRTAM expression.

4. Discussion

In this study, we identified a novel regulatory region in the human CRTAM promoter that functions in both quiescent T cells and during lymphocyte activation. We determined that ZEB1 represses the CRTAM promoter, and this repression is important

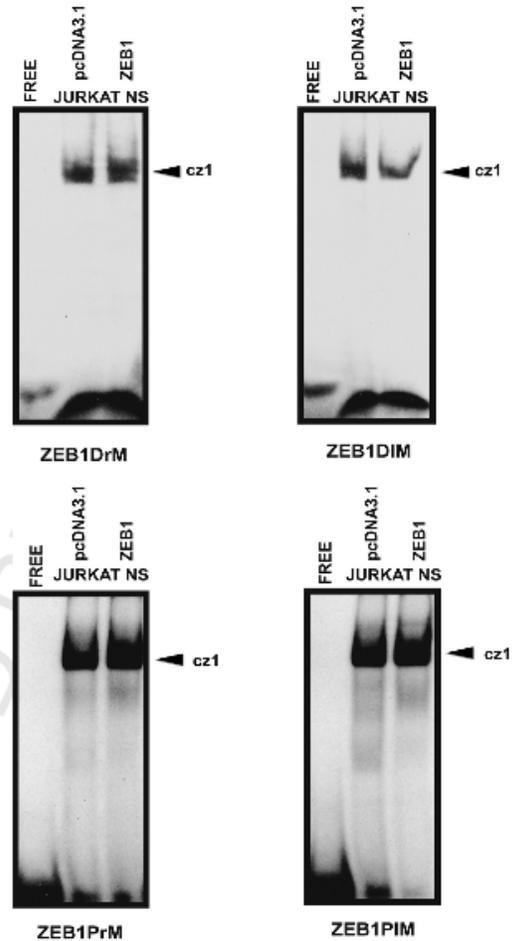


Fig. 5. ZEB1 binding is inhibited through mutation of distal E-box elements in the CRTAM promoter. Results from an EMSA showing the formation of DNA-protein complexes resulting from Jurk at T cells that were transfected with 2 μ g of either pcDNA3.1 or pcDNA3.1-ZEB1 expression vectors. Nuclear extracts were prepared 48 h after transfection. Data regarding distal E-box sites are shown in (A), and results from experiments with proximal E-box sites are shown in (B). The results are representative of three independent experiments with similar findings.

for temporal and spatial CRTAM expression. A well-characterized function for ZEB1 in the immune system is involvement in the rapid shut-off of IL-2 transcription after antigen recognition by T cell lymphocytes (Williams et al., 1992).

The repression mediated by ZEB1 in the CRTAM promoter involves binding to the ZEB1Dr element (Fig. 3). This is an important finding because ZEB1 requires a binding site in order to have an effect on promoter function. Once bound, ZEB1 has been shown to mediate cis- or trans-repression activity (Brabletz et al., 1999; Genetta et al., 1994; Remacle et al., 1999). ZEB1 competes with basic helix-loop-helix (bHLH) transcriptional activators for DNA binding to the same element and is able to actively repress transcription of its target genes. For example, ZEB1 binds the proximal CD4 enhancer and competes with the transcriptional activators E12

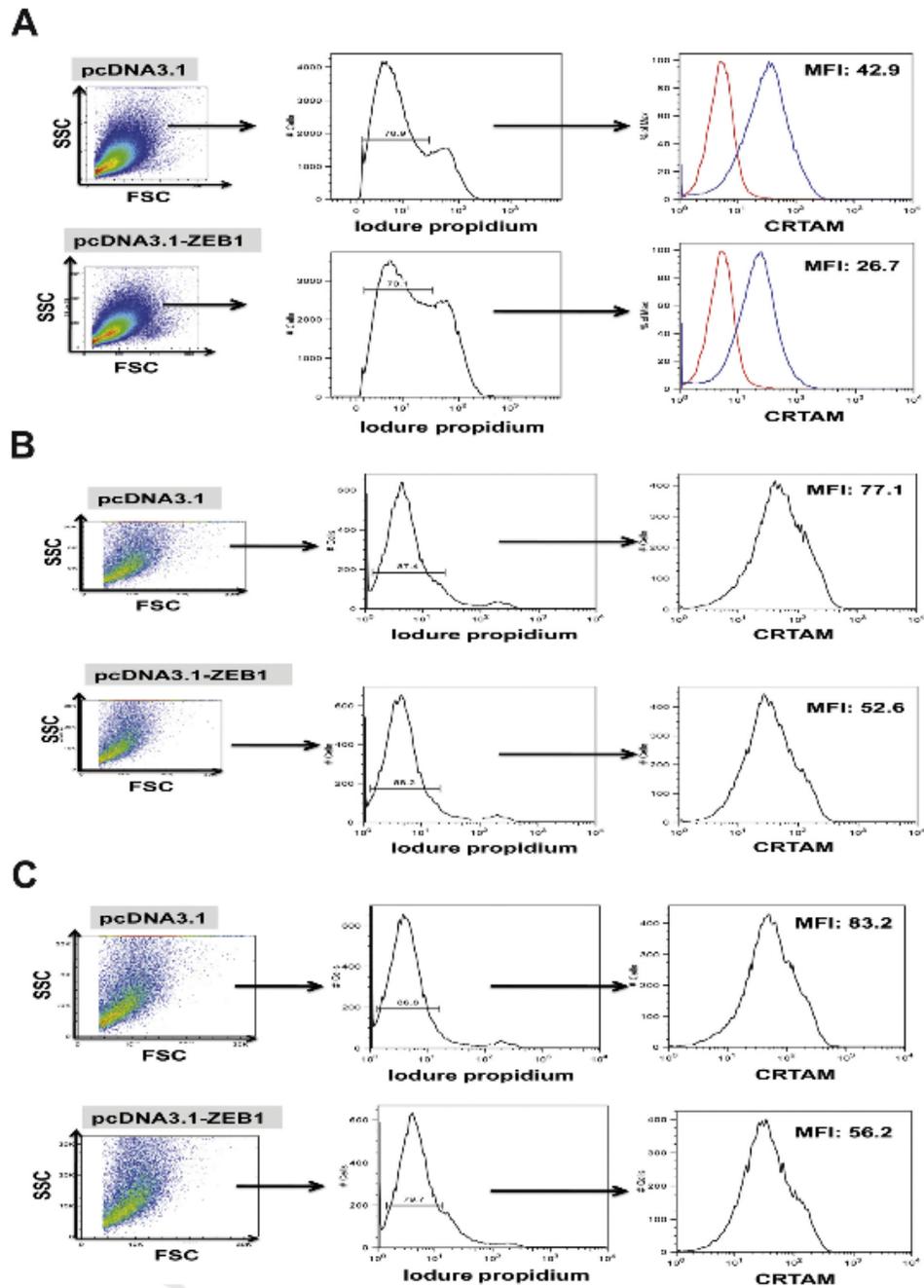


Fig. 6. ZEB1 overexpression downregulates CRTAM. Flow cytometry analysis of CRTAM expression in Jurkat T cells overexpressing ZEB1 and stimulated with PMA and ionomycin. (A) CRTAM expression in Jurkat cells transfected with pcDNA3.1-ZEB1 for 48 h and then activated for 12 h. (B) Flow cytometry analysis for CRTAM on surfaces of Jurkat T cells transfected and activated for 12 h. (C) Analysis of CRTAM expression levels in Jurkat cells stimulated for 3 h, transfected with pcDNA3.1-ZEB1 or pcDNA3.1, and then incubated for 12 h. Results representative of three independent experiments are shown.

Please cite this article in press as: Rojas-Marquez, C., et al., CRTAM is negatively regulated by ZEB1 in T cells. Mol. Immunol. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.253>

and HEB for DNA binding (Brabletz et al., 1999). Also, ZEB1 is able to bind an E box element and establish a machinery of repression from the binding site, for example, the NRE-A element in the IL-2 promoter (Wang et al., 2009). This is apparently the case for the CRTAM promoter. Notably, the core sequence from the ZEB1Dr element is identical to that found in the NRE-A element from the IL-2 promoter (Williams et al., 1992). We show that a construct lacking a ZEB1 binding ZEB1Dr site (Fig. 1) or carrying a mutated ZEB1Dr site (Fig. 4) produced significant reporter gene expression in non-activated Jurk at cells. These results indicate that in resting T lymphocytes, ZEB1 binding to the ZEB1Dr site is sufficient to repress CRTAM expression.

We also established that ZEB1 overexpression influences CRTAM levels (Fig. 6A-C) and that this repression activity is dependent upon the amount of DNA used in transfection experiments (Fig. 2A and B). Interestingly, the unstimulated Jurk at T cell line has low ZEB1 expression (Hidaka et al., 2008), but a basal CRTAM expression level (Valle-Rios et al., 2009). Contrastingly, unstimulated human T lymphocytes have a basal ZEB1 expression level, but no CRTAM expression (data not show). It seems like two different mechanisms are involved in ZEB1-mediated repression in CRTAM promoter. The mechanism that acts in non-stimulated cells suggests that ZEB1 expression is sufficient for CRTAM repression. ZEB1 binding to the NRE element in the IL-2 promoter disrupts the formation of a stable transcription complex, thereby inhibiting IL-2 expression. It has been shown that ZEB1 strongly interacts with CTBP2 and HDAC1, a corepressor complex, to suppress IL-2 expression upon antigenic activation (Wang et al., 2009). It will be of interest to evaluate whether this molecular mechanism is also involved in CRTAM repression by ZEB1 after T cell activation.

ZEB1 has been shown to control the exact temporal and spatial expression of specific genes during muscle differentiation (Takagi et al., 1998). Additionally, experiments targeting the disruption of the C-terminal ZEB region in mice indicated that ZEB1 is also regulating gene transcription during T cell differentiation (Higashi et al., 1997). The mouse model described by Higashi et al. shows a severe defect in T cell differentiation, resulting in up to a 500-fold reduction of thymocytes. We previously showed that during T cell development, thymocytes express CRTAM, and blocking CRTAM-Ned2 interaction impairs thymus growth, thus impacting the structural maintenance of the thymic lobes (Medina-Contreras et al., 2010). This result suggests that CRTAM expression in thymocytes is regulated by different transcriptional factors than ZEB1. In this context, when we analyze the mouse CRTAM promoter, we notice the presence of four E box elements with at least 80% score from an E box consensus site (unpublished data). The presence of more E box elements in the mouse promoter with regard to the human CRTAM promoter opens up the possibility of additional regulatory mechanisms. In this respect, it is established that ZEB1 loses repression by the presence of active competition by bHLH transcriptional factors such as Gata-3, E2A, HEB, AP4, zinc finger proteins (like Ikaros) or a Kruppel-like factor (like ThPOK). All of these participate during T cell development (Elmeier et al., 2013). It would be of interest to determine the regulation mechanism in the CRTAM promoter during T cell development.

There is little information or evidence that can be used to elucidate the mechanism governing CRTAM expression. Our goal in this study was to discover factors critical to CRTAM regulation. This is important because CRTAM is an essential molecule in immune system regulation and epithelial cell adhesion (Garay et al., 2010). Indeed, T cells from CRTAM KO mice show reduced IFN γ , IL-22, and IL-17 production (Yeh et al., 2008). A fundamental understanding of the mechanism that delineates and regulates CRTAM expression in T cells is important as this may assist in the discovery of novel targets for the development of innovative therapeutics.

Uncited references

Huang et al. (2004), Leiden (1992), Ramirez-Velazquez et al. (2014), Shabgah et al. (2014), Smale et al. (1998, 2008), Staal and Clevers (2001) and Zaidi and Merlino (2011).

Acknowledgegements

This work was supported by Grant CB2005-01-48963 (to V.O.N.) and 155518 (to E.L.B.) from CONACYT. CRM was supported by CONACYT scholarship 210135. The authors wish to acknowledge Victor Rosales for his help with the flow cytometry and Dr. Miriam Huerta for her help with the EMSA assays.

References

- Boles, K.S., Barthelemy, W., DiCorleto, T., Cella, M., Colonna, M., 2005. The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood* 106 (3), 779-786.
- Brabletz, T., Jung, A., Hilgert, F., Lohberg, C., Meller, J., Suchy, U., Kirchner, T., 1999. Negative regulation of CD4 expression in T cells by the transcriptional repressor ZEB1. *Int. Immunol.* 11 (10), 1701-1708.
- Chan, C.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J., 2012. Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 24 (2), 246-251.
- Elmeier, W., Haus, L., Tschiemarow, R., 2013. Transcriptional control of CD4 and CD8 coreceptor expression during T cell development. *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (23), 4537-4553.
- Garay, E., Patino-Lopez, G., Islas, S., Alarcon, L., Canche-Pool, E., Valle-Rios, R., Medina-Contreras, O., Granados, G., Chavez-Munguia, B., Juanita, E., Ortiz-Navarrete, V., Gonzalez-Mariscal, L., 2010. CRTAM: a molecule involved in epithelial cell adhesion. *J. Cell. Biochem.* 111 (1), 111-122.
- Genetta, T., Ruzinski, D., Kadesch, T., 1994. Displacement of an E-box-binding repressor by basic helix-loop-helix proteins: implications for B-cell specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 14 (9), 6153-6163.
- Giroldi, L.A., Bringer, P.P., de Weljert, M., Jansen, C., van Bokhoven, A., Schalken, J.A., 1997. Role of E boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241 (2), 453-458.
- Higashi, Y., Moribe, H., Takagi, T., Sekido, R., Kawakami, K., Kikutan, I., Kondoh, H., 1997. Impairment of T cell development in deltaEPI mutant mice. *J. Exp. Med.* 185 (8), 1467-1479.
- Huang, Y.H., Li, D., Wamoto, A., Robey, E.A., 2004. Distinct transcriptional programs in thymocytes responding to T cell receptor, Notch, and positive selection signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (14), 4936-4941.
- Isakov, N., Altman, A., 2002. Protein kinase C θ in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 761-794.
- Leiden, J.M., 1992. Transcriptional regulation during T-cell development: the alpha-TCR gene as a molecular model. *Immunol. Today* 13 (1), 22-30.
- Medina-Contreras, O., Soldovilla, G., Patino-Lopez, G., Canche-Pool, E., Valle-Rios, R., Ortiz-Navarrete, V., 2010. Role of CRTAM during mouse early T lymphocytes development. *Dev. Comp. Immunol.* 34 (2), 196-202.
- Patino-Lopez, G., Hevez, P., Lee, J., Whitte, D., Verge, G.M., Lechner, S.M., Ortiz-Navarrete, V., Zlotnik, A., 2006. Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8+ T lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* 171 (1-2), 145-155.
- Postigo, A.A., Sheppard, A.M., Muench, M.L., Dean, D.C., 1997. c-Myb and Bts proteins synergize to overcome transcriptional repression by ZEB. *EMBO J.* 16 (13), 3924-3934.
- Ramirez-Velazquez, C., Berstein-Guarrubias, N., Ortiz-Navarrete, V., 2014. Peripheral blood T cells and neutrophils from asthma patients express class-I MHC-restricted T cell-associated molecule. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 10, 46.
- Remacle, J.E., Kraft, H., Lerchner, W., Wuytens, G., Collart, C., Verschuere, K., Smith, J.C., Huybreck, D., 1999. New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEPI family members bind with two hands to two target sites. *EMBO J.* 18 (18), 5073-5084.
- Shabgah, G.A., Fattahi, E., Zare, S.F., 2014. Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Postepy Dermatol. Alergol.* 4, 256-261.
- Smale, S.T., Carey, F.M., Peterson, L.M., 2008. Transcriptional Regulation in Eukaryotes: Concepts, Strategies, and Techniques, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Smale, S.T., Jain, A., Kaufmann, J., Emami, K.H., Lo, K., Garraway, L.P., 1998. The initiator element: a paradigm for core promoter heterogeneity within metazoan protein-coding genes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63, 21-31.
- Staal, F.J., Clevers, H.C., 2001. Regulation of lineage commitment during lymphocyte development. *Int. Rev. Immunol.* 20 (1), 45-64.
- Takagi, T., Moribe, H., Kondoh, H., Higashi, Y., 1998. DeltaEPI, a zinc finger and homeodomain transcription factor, is required for skeleton patterning in multiple lineages. *Development* 125 (1), 21-31.
- Takuchi, A., Itoh, Y., Takumi, A., Ishihara, C., Arase, N., Yokoi, A., T. Koseki, H., Yamasaki, S., Takai, Y., Miyoshi, J., Ogasawara, K., Saito, T., 2009. CRTAM confers

- late-stage activation of CD8+ T cells to regulate retention within lymph node. *J Immunol.* 183 (7), 4220-4228. 457
- Valle-Rios, R., Patiño-Lopez, G., Medina-Contreras, O., Canche-Pool, E., Reclinas-Targa, F., Lopez-Baygñen, E., Zlotnik, A., Ortiz-Navarrete, V., 2009. Characterization of CRTAM gene promoter. AP-1 transcription factor control its expression in human T CD8 lymphocytes. *Mol. Immunol.* 46 (16), 3379-3387. 458
- Wang, J., Lee, S., Teh, C.E., Bunting, K., Ma, L., Shannon, M.F., 2009. The transcription repressor, ZEB1, cooperates with CtBP2 and HDAC1 to suppress IL-2 gene activation in T cells. *Int. Immunol.* 21 (3), 227-235. 459
- Williams, T.M., Moolten, D., Burlein, J., Romano, J., Bhaerman, R., Godillot, A., Mellon, M., Rauscher 3rd, F.J., Kant, J.A., 1991. Identification of a zinc finger protein that inhibits IL-2 gene expression. *Science* 254 (5039), 1791-1794. 460
- Yang, G.H., Pestka, J.J., 2002. Vomitoxin (deoxynivalenol)-mediated inhibition of nuclear protein binding to NRE-A, an IL-2 promoter negative regulatory element, in EL-4 cells. *Toxicology* 172, 169-179. 461
- Yasui, D.H., Genetta, T., Kadesch, T., Williams, T.M., Swain, S.L., Tsui, L.V., Huber, B.T., 1998. Transcriptional repression of the IL-2 gene in Th cells by ZEB. *J Immunol.* 160 (9), 4433-4440. 462
- Yeh, J.H., Sidhu, S.S., Chan, A.C., 2008. Regulation of a late phase of T cell polarity and effector functions by Crtam. *Cell* 132 (5), 846-859. 463
- Zaidi, R.M., Merlino, G., 2011. The two faces of Interferon- in cancer. *Clin. Cancer Res.* 17 (19), 6118-6124. 464

UNCORRECTED PROOF