

PARTICIPACION DE FACTORES DE TRANSCRIPCION EN LA REGULACION DE LA DIFERENCIACION LINFOCITARIA

RICARDO A. MARGNI

IDEHU - Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET - UBA), Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Resumen Los cambios citomorfológicos y la expresión de determinados marcadores en los distintos estadios de la diferenciación linfocitaria son bien conocidos. Los estudios sobre patrones de expresión de genes específicos de las células linfoides y los mecanismos de su regulación, han llevado últimamente a clarificar los mecanismos fundamentales del desarrollo y activación de estas células. Se han profundizado los conocimientos sobre los "enhancers" y promotores, elementos regulatorios de esos genes, y de los factores de transcripción que se unen a esos elementos. En el trabajo que se presenta se hace un análisis de estos componentes y de la participación de algunos de ellos, como los PU.1, Ikaros, Aiolos, GATA-3, Egf-1, E2A, EBF-1, PAX-5 (BSAP), TFE-3, Oct-1, Oct-2 y NF- κ B en la regulación de los estadios de diferenciación de las series linfoides B y T.

Abstract *Participation of transcriptional factors in the regulation of lymphocyte differentiation.* The cytomorphological changes as well as the expression of certain markers in the different stages of lymphocyte differentiation are well known. Studies carried out on expression patterns of specific genes in lymphoid cells and their regulatory mechanism have led to the identification of the fundamental mechanism of cell development and activation. A great deal of knowledge has accumulated concerning enhancers and promoters, the regulatory elements of those genes and the transcriptional factors to which they bind. The present paper analyzes these components and the participation of some of them such as PU.1, Ikaros, Aiolos, GATA-3, Egf-1, E2A, EBF-1, PAX-5 (BSAP), TFE-3, Oct-1, Oct-2 and Nf- κ B in the regulation of the differentiation stages of cells belonging to the B and T lymphoid lineages.

Key words: transcriptional factors, lymphocyte differentiation

En todo individuo, el mecanismo más importante para su defensa contra agentes agresores externos como lo son las bacterias, parásitos, virus, proteínas extrañas, genéricamente denominados antígenos, es la respuesta inmune. En ella participan dos tipos de células: las *inmunocompetentes* y las *accesorias*. Estas últimas intervienen en los mecanismos de captación, procesado y presentación adecuada del antígeno, en tanto que las células inmunocompetentes reconocen a éste a través de sus receptores específicos, se activan, y ponen en marcha los mecanismos biológicos que llevan a la degradación, depuración y eliminación del agente agresor real o potencial.

Todas las células del sistema inmune se diferencian durante la hematopoyesis, proceso por el cual a partir de células hematopoyéticas pluripotentes, indiferenciadas o

"stem cells" y en función del microambiente que las rodea y de factores regulatorios, pueden diferenciarse en células de las líneas linfoides (linfocitos), mieloides (granulocitos, monocitos), megacariocitos y eritrocitos.

Al comienzo del desarrollo embrionario las primitivas células indiferenciadas desarrollan a partir del mesénquima, y con la evolución del embrión se las encuentra en el saco vitelino, hígado fetal, bazo y médula ósea. Durante el desarrollo óseo las células mesenquimales se diferencian en osteoblastos y osteoclastos, que participan en el mantenimiento de la matriz ósea, y en células hematopoyéticas indiferenciadas multipotentes. Estas células se dividen en células hijas, algunas de las cuales subsisten como células indiferenciadas, en tanto que otras se diferencian en las distintas líneas celulares del sistema hematopoyético, dependiendo ello del microambiente, de la posibilidad de que ciertas moléculas de adhesión como CD44 puedan unirse a matrices ricas en hialuronato, y a la presencia de ciertas moléculas libres, entre ellas la IL-7.

Otras moléculas que juegan un rol importante en la migración y fijación de estas células son los componen-

Recibido: 7-VII-1999

Aceptado: 7-IX-1999

Dirección postal: Dr. Ricardo A. Margni, IDEHU, Junín 956, 4° P, 1113 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4964-0024

E-mail: ramargni@ffybu.uba.ar

tes de la familia de las integrinas, glucoproteínas heterodiméricas constituyentes de los receptores de adhesión. Una de sus isoformas, la VLA, pueden actuar como receptor para laminina, fibronectina y colágeno¹.

Las células inmunocompetentes o linfocitos derivan de las células indiferenciadas, y en los mamíferos entre el 0.5 y 10% de las células producidas diariamente son células de este tipo, de las que existen dos poblaciones funcionalmente distintas (linfocitos T y linfocitos B), hecho relacionado con el órgano linfoide primario en el que han adquirido competencia inmunológica (timo y médula ósea, respectivamente).

Ultimamente se ha demostrado, especialmente en el ratón, que en la diferenciación linfocitaria hay regulación transcripcional de la expresión de genes de marcada influencia en el desarrollo de los estadios de la maduración celular, de la expresión en sus membranas de moléculas proteicas que intervienen en procesos de reconocimiento y migración, y de secreción de productos biológicamente activos. Estos estudios han sido desarrollados analizando, en líneas celulares, el efecto de factores de transcripción sobre determinados genes, y en ratones que presentan ruptura y delección de genes codificantes de factores de transcripción, las modificaciones observadas en el desarrollo de las células linfoides y de otros componentes del sistema hematopoyético².

Normalmente los linfocitos B y T experimentan una serie ordenada de etapas de maduración, durante las cuales reordenan los genes que codifican sus receptores antigénicos, y la expresión de genes que cumplen funciones primordiales en los procesos de diferenciación. Entre otros, los genes RAG-1 y RAG-2 (genes activantes de la recombinación V-D-J en los linfocitos B y T), mb-1 y B-29 (codificantes de las cadenas Ig α e Ig β que acompañan a la IgM de membrana y participan en la transducción de señales), CD3, CD4 y CD8^{3, 5}.

En la expresión de estos genes juegan un papel importante las secuencias de ADN aumentadoras de la transcripción o "enhancers", las que incrementan la transcripción de "promotores" vecinos, secuencias de ADN donde la ARN-polimerasa inicia la transcripción. Se ha demostrado que diferentes proteínas codificadas por sus respectivos genes actúan como factores de transcripción, los que al activar "enhancers" y promotores participan en la diferenciación celular y la expresión en membrana de proteínas funcionales o marcadores.

El factor de transcripción PU.1, perteneciente a la familia ets, proteínas de unión a ADN del tipo "helix-loop-helix", inicialmente caracterizada como un factor de regulación que se une a elementos ricos en purina (5'-GAGGAA-3'), es indispensable para el desarrollo de las líneas linfoides y mieloides a partir de las "stem cells". El desarrollo eritrocitario, en cambio, no es inhibido. PU.1 se expresa exclusivamente en células hematopoyéticas, con altos niveles en linfocitos B, monocitos, granulocitos,

megacariocitos y mastocitos. Niveles bajos han sido detectados en eritrocitos maduros. No se expresa en linfocitos T maduros^{6, 7}.

El gen que codifica PU.1 está localizado en el cromosoma 11 en el hombre y en el cromosoma 2 en el ratón⁸.

Dentro de la proteína PU.1 hay un dominio de unión de ets-ADN de 85 aminoácidos localizado próximo a la región C-terminal de la proteína y una secuencia repetitiva octamérica ("octamer motif"), habiéndose demostrado que son las más importantes para la actividad promotora célula-tipo específica. Ambas se combinan para mediar una alta actividad en los linfocitos B, en tanto que en los macrófagos es el sitio de unión ets el que confiere predominantemente la acción promotora⁹.

La expresión de los genes de las cadenas pesadas (H) y livianas (κ y λ) son reguladas por la proteína PU.1, al igual que la de algunos receptores involucrados en la fagocitosis y el desarrollo celular¹⁰.

La proteína Ikaros, tres de cuyas isoformas Ik-1, Ik-2 e Ik-3, que incluyen un dominio N-terminal tipo "dedo de zinc" capaz de unirse con alta afinidad a sitios de ADN que contienen GGGA-motif, no influye en el desarrollo de células mieloides y eritrocitos, pero su ausencia impide la diferenciación de los linfocitos B y T¹¹.

Ratones con mutaciones homocigotas del gen Ikaros (-/-) sufren múltiples defectos del sistema linfoide. Los heterocigotas (+/-), en cambio, invariablemente desarrollan procesos malignos mediados por células T, especialmente leucemias¹².

Una segunda familia de los Ikaros son los Aiolos, los que se expresan tempranamente, a bajos niveles, en las células B y T precursoras y progresan en estadios de diferenciación posteriores como lo son los linfocitos Pre-B y las células T doble positivas. Esta expresión aumenta en las células B periféricas y llegan al máximo en los linfocitos B recirculantes.

En ratones con mutaciones homo y heterocigotas en ambos genes, se ha demostrado que estos factores se potencian, y que Ikaros y Aiolos trabajan en forma conjunta, interviniendo en mecanismos de control de la proliferación de las células B y T mediada por la unión antígeno-receptor¹³.

Dentro de la familia ets, a la que pertenece PU.1, existe otra proteína, la Ets1, la que si bien no es requerida para el desarrollo de los linfocitos B y T maduros, es indispensable para el desarrollo y supervivencia de las células NK¹⁰.

Los factores de transcripción GATA-3, con estructura "helix-loop-helix", y Lef-1 y Tcf-1 codificados por genes que contienen HMG-box, interfieren en el desarrollo de los linfocitos T en sus primeros estadios de diferenciación, y parecen estar relacionados con distintas funciones como la transducción de señales que llevan a la expresión de receptores en la membrana celular, reconocimiento de ligandos externos, y la transcripción de genes

específicos en el núcleo. GATA-3 regula la expresión de las citoquinas Th2 y la diferenciación de las células co-operadoras (helper) CD4+ "naive" a células Th2. Los factores de transcripción NFAT, Stat4 y Stat6 son proteínas que juegan un importante rol en el mantenimiento del balance de las respuestas Th1/Th2. Está demostrado que las dos últimas se activan a través de señales mediadas por IL-4¹⁴.

Egr-1, proteína con un dominio en "dedo de zinc", es un factor de transcripción que interactúa a nivel de células T CD8⁺, CD4⁺, llevando a la expresión del doble estado positivo CD8⁺, CD4⁺¹¹. La proteína LKLF, con características similares a la anterior y cuyo gen no ha sido aun identificado, parecería jugar un rol importante en la transición células CD4⁺, CD8⁺ a células CD4⁺ y células CD8⁺¹⁵.

Otro factor de transcripción es la proteína E2A, con estructura "helix-loop-helix". La falta de expresión de esta proteína detiene el desarrollo de las células B al comienzo de la diferenciación, cuando sólo expresan en membrana CD43 y CD45. Las células con delección del gen E2A no reordenan los genes de los loci de inmunoglobulinas y no expresan la mayoría de los genes específicos de los linfocitos B, como mb-1, B-29, RAG-1, RAG-2. La diferenciación celular es detenida en un período muy temprano. Las células linfoides de linaje T y las células de origen mieloide y eritroide se diferencian normalmente^{16, 17}.

EBF-1 es un factor regulador de los linfocitos B; en su ausencia sólo se detectan células muy inmaduras al estado de Pro-B temprano (CD45⁺, CD43⁺, CD72⁻) y se

inhibe la transcripción del gen mb-1, que codifica la cadena Igα¹⁷.

PAX-5 (BSAP) es una proteína con un dominio "homeobox apareado", que no interfiere en el desarrollo de los linfocitos T, mielocitos y eritrocitos, pero su ausencia inhibe el desarrollo de los linfocitos B en un estadio ligeramente posterior al originado por E2A y que se continúa hasta el linfocito B maduro, pero no en la célula plasmática, producto final de la diferenciación^{18, 19}.

La función de trans-activación de la BSAP está localizada en la región C-terminal rica en Ser/Thr/Prol. Se han identificado varios sitios de unión a BSAP, específicos de células B, incluyendo promotores que codifican CD19, CD20 y Blk, miembro de la familia de las tirosin quinasa Src. BSAP es idéntico a EBB-1, un factor que tiene sitios de unión de promotores de los genes λ5 y VpreB1, que codifican las proteínas ω y ι, componentes de la cadena L sustituta, la que unida a la cadena μ forman en membrana el pre-receptor B (pRCB). BSAP tiene sitios de unión 5' a genes C_{H1}, por lo que no es sorprendente que participe en la regulación del cambio o "switching" del isotipo de inmunoglobulina que sintetizan los linfocitos B²⁰. Recientemente se ha demostrado que el gen PAX-5 humano participa con el locus de IgH en la translocación cromosomal t9-14 (p13, q32), la que es característica de un pequeño grupo de linfomas no-Hodgkin que exhiben diferenciación plasmocitaria²¹.

La ausencia del factor de transcripción TFE-3, perteneciente a la familia de las proteínas bHLH-zip ("basic helix loop helix zipper"), no interfiere en el desarrollo del

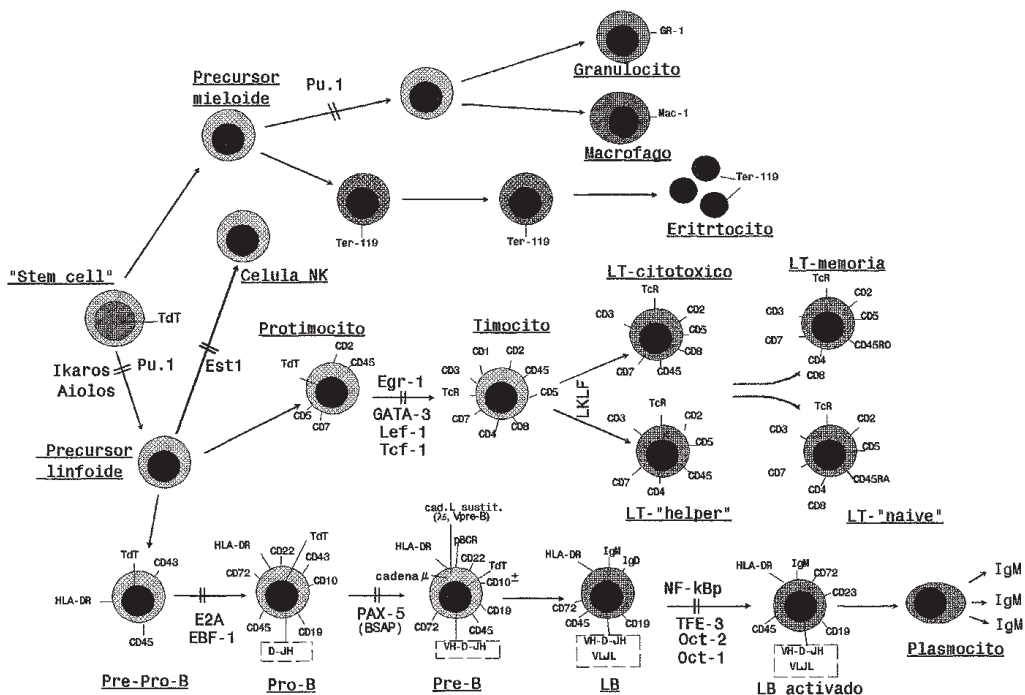


Fig. 1.- Los factores de transcripción en la diferenciación linfocitaria

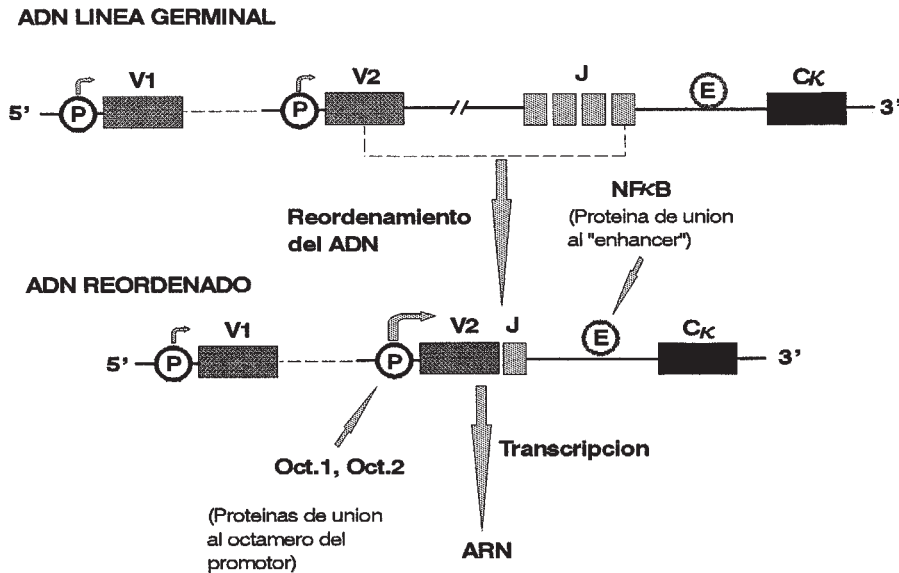


Fig. 2.— Recombinación de los genes V, J y C de una cadena L_{κ} y su ubicación en el genoma de los "enhancer" y promotores y los factores de transcripción que intervienen en cada caso.

linfocito T, mielocitos y eritrocitos. Tampoco interfiere en el desarrollo del linfocito B, pero "in vivo", su ausencia se acompaña de una disminución en la síntesis de inmunoglobulinas (la IgM está reducida 2 veces y la IgG e IgA entre 5 y 20 veces). Se ha observado que las células $CD23^{+}$, $CD72^{+}$ (células activadas) disminuyen, lo que reflejaría el efecto de TFE-3 en los mecanismos de transcripción^{22, 23}.

A unos pocos nucleótidos previos al sitio de iniciación de transcripción de todos los genes V_{κ} se halla un octanucleótido conservado, cuya secuencia complementaria se halla en el "enhancer", situado en el intrón que separa el último gen J_{κ} y el gen constante C_{κ} . Estas secuencias son esenciales para la expresión de esos genes, las que les conferirían la especificidad de expresión en tejido linfocítico. Se han identificado las proteínas nucleares que se unen a estas secuencias regulatorias; las llamadas Oct-1 y Oct-2 se unen al octanucleótido²⁴ y $NF-\kappa B$ se une al "enhancer"²⁵, por lo que estos factores de transcripción son de significativa importancia en la síntesis de inmunoglobulinas por las células B. Una proteína de 256 aminoácidos identificada como OBF-1, rica en prolina y con muy poca homología con otras proteínas, parece ser un coactivador de los factores Oct-1 y Oct-2²⁶.

Si bien se conocen algunos de los genes sobre los que los factores de transcripción ejercen su efecto regulatorio en los linfocitos B y T, especialmente en los relacionados con la síntesis de inmunoglobulinas, últimamente los estudios se han intensificado con el objeto de averiguar la completa funcionalidad de estas proteínas, sobre todo por los variados efectos observados cuando se realizan estudios "in vivo" en animales con

deleciones de los genes que codifican estos factores de transcripción.

Los estadios de diferenciación de las células hematopoyéticas, en especial de los linfocitos B, se indican en la Figura 1. En cada uno de ellos se expresan los marcadores de membrana más representativos, momento en que se reordenan los genes de las cadenas pesadas (H) y livianas (L) de las inmunoglobulinas, y los distintos niveles a los que estos factores de transcripción pueden interferir en las etapas de la diferenciación celular.

La Figura 2 esquematiza una recombinación de los genes que codifican para una cadena L_{κ} de inmunoglobulina (V_{κ} , J_{κ} y C_{κ}), la ubicación en el genoma de los "enhancers", promotores y factores de transcripción que intervienen en cada caso.

Bibliografía

1. Margni RA. Inmunología e Inmunología. Fundamentos. Cap 2: La respuesta inmune. Buenos Aires: Edit. Médica Panamericana 1996, pp 14-32.
2. Ghosh S. Transcriptional regulation in lymphocyte differentiation. *The Immunologist*, 1995; 3: 168-71.
3. Kitamura D, Kudo A, Schaal S, et al. A critical role of λ_5 protein in B cell development. *Cell* 1992; 69: 823-31.
4. Gong S, Nussenzweig MC. Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig β . *Science*, 1996; 272: 411-14.
5. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, et al. RAG-1 deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 1992; 68: 869-77.
6. Klemsz M, McKercher S, Celada A, Van Beveren C, Maki R. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* 1990; 61: 113-24.

7. Leiden JM. Transcriptional regulation of T cell receptor genes. *Ann Rev Immunol* 1993; 11: 539-70.
8. Lloberas J, Soler C, Celada A. The key role of PU.1/SPI-1 in B cells, myeloid cells and macrophages. *Immunology Today* 1999; 20: 184-9.
9. Crepieux P, Coll J, Stchelin D. The Ets family of proteins: weak modulations of gene expression in guest for transcriptional patterns. *Crit Rev Oncog* 1994; 5: 615-38.
10. Henderson A, Calame K. The transcriptional regulation during B cell development. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 163-200.
11. Cortes M, Wong E, Koipally J, Georgopoulos K. Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Current Opinion in Immunology* 1999; 11: 167-71.
12. Nichogiannopoulou A, Trevisan M, Friedrich C, Georgopoulos K. Ikaros in hemopoietic lineage determination and homeostasis. *Seminars in Immunology* 1998; 10: 119-25.
13. Wang JH, Avitahl N, Cariappa A, et al. Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity* 1998; 9: 543-53.
14. Juo CT, Leiden JM. Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Ann Rev Immunol* 1999; 17: 149-87.
15. Crossley M, Whitlaw W, Perkins A, et al. Isolation and characterization of the cDNA encoding BKKLF/TEF-2 a major CACCC-box binding protein in erythroid cells and selected other cells. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 695-705.
16. Murree C, Bain G, van Dijk MA, et al. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim. Biophys Acta* 1994; 1218: 129-35.
17. Bain G, Murre C. The role of E-proteins in B- and T-lymphocyte development. *Seminars in Immunology* 1998; 10: 143-53.
18. Barberis A, Widenhorn K, Vitelli L, Busslinger M. A novel B-cell lineage-specific transcription factor present at early but not late stage of differentiation. *Genes Dev* 1990; 4: 849-59.
19. Nutt SL, Urbanek P, Rolink A, Busslinger M. Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to DJ recombination of the IgH locus. *Gene Dev* 1997; 11: 476-91.
20. Busslinger M, Urbánek P. The role of BSAP (Pax-5) in the B cell development. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 595-601.
21. Morrinson AM, Stephan LN, Trévenin C, Rolink A, Busslinger M. Loss- and gain- of- function mutations reveals an important role of BSAP (Pax-5) at the start and end of B cell differentiation. *Seminars in Immunology* 1998; 10: 133-42.
22. Henderson AJ, Calame KL. Lessons in transcriptional regulation learned from studies on immunoglobulin genes. *Crit Rev Eukaryot Gene Exp* 1995; 5: 255-80.
23. Artandi SE, Cooper C, Schrivastava A, Calame K. The basic helix-loop-helix-zipper domain of TFE3 mediates enhancer-promoter interaction. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 7704-16.
24. Matthias P. Lymphoid-specific transcription mediated by the conserved octamer site: Who is doing what? *Seminars in Immunology* 1998; 10: 155-63.
25. Bauerle P, Baltimore D. NF- κ B: ten years after. *Cell* 1996; 87: 13-20.
26. Strubin M, Newell JW, Matthias P. OBF-1, a novel B cell-specific coactivator that stimulates immunoglobulin promoter activity through association with octamer-binding proteins. *Cell* 1995; 80: 497-506.

Tanto en la literatura, pintura, música o teatro, como en las ciencias humanas y sociales, se advierte cada vez más el carisma del continente, se siente la circunstancia americana, que da cuenta libremente de una humanidad americana.

Edgar Montiel

Identidad, Integración y Creación cultural en América Latina. El desafío del Mercosur.

Gregorio Recondo. Buenos Aires: Editorial de Belgrano/Unesco, 1997, p 298