



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

*“Identificación de los complejos proteicos asociados a beta-
catenina en linfocitos T CD8 de adultos y neonatos humanos”*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

GERSON NEY HERNANDEZ ACEVEDO

DIRECTOR DE TESIS

Dra. MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2019



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias

**DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada "Identificación de los complejos proteicos asociados a beta-catenina en linfocitos T CD8 de adultos y neonatos humanos" que presenta el alumno Gerson Ney Hernández Acevedo (5920120508) para obtener el título de Doctor en Ciencias.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Jesús Martínez Barnetche Instituto Nacional de Salud Pública	Aprobado	
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz FM-UAEM	Aprobado	
Dra. Victoria Pando Robles Instituto Nacional de Salud Pública	Aprobado	
Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama FM-UAEM	Aprobado	
Dra. Claudine Liliane Irlés Machuca FM-UAEM	Aprobado	
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC-UNAM	Aprobado	
Dra. Verónica Narváez Padilla CIDC-UNAM	Aprobado	

Índice

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 El Sistema Inmune	7
1.1.1 Linfocitos T CD8 ⁺ o CTL citotóxicos	9
1.2 Sistema inmune neonatal	11
1.3 Vía de WNT	12
1.3.1 Vía canónica de Wnt	14
1.3.2 Fosforilación de β -catenina/ Degradación por el complejo de degradación	15
1.3.3 Receptores de Wnt: Frizzled y LRP5/6	16
1.3.4 Dishevelled	17
1.3.5 APC	17
1.3.6 Axina	18
1.3.7 Casein kinase 1a (CK1a)	19
1.3.8 Glycogen synthase kinase (GSK3)	19
1.3.9 Antagonistas y agonistas de Wnt	20
1.3.10 Translocación al núcleo de β -catenina	21
1.3.11 LEF/TCF	22
1.3.12 Coactivadores asociados a β -catenina	22
1.3.13 Estudios fosfoproteomicos de la asociación de CBP y P300 con β -catenina	24
2. ANTECEDENTES	26
2.1 Señalización de Wnt en la auto-renovación de células madre hematopoyéticas	27
2.2 La vía de señalización de Wnt en la proliferación y diferenciación celular: Papel de dos coactivadores	27
2.2.1 Participación de Wnt en HSCs y en el desarrollo de timocitos	31
2.3 Influencia de Wnt en linfocitos T maduros	32
2.4 MPEC y SLEC	34
3. HIPÓTESIS	36
4. OBJETIVO GENERAL	37
4.1 Objetivos específicos	37
5. MATERIALES Y MÉTODOS	38
5.1 Desarrollo experimental:	38
5.1.1 Colecta de las muestras	38
5.1.2 Purificación de linfocitos T CD8 ⁺	38
5.1.3 Evaluación de pureza por tinción de marcadores de superficie celular	40
5.1.4 Estimulación de linfocitos con Wnt3a	40
5.1.5 Evaluación de las proteínas β -catenina, CBP y P300 por tinción intracelular con metanol	40
5.1.6 Citometría de flujo	41
5.1.7 Lisis celular	41
5.1.8 Inmunoprecipitación de β -catenina, CBP y P300	42
5.1.9 Electroforesis y transferencia de proteínas para inmunoblots	42
5.1.10 Inmunodetección	42
5.1.11 Espectrometría de masas	43
5.1.12 Diseño de oligos	44
5.1.13 Inmunoprecipitación de cromatina	45
5.1.14 PCR en tiempo real	47
5.1.15 Análisis estadístico	48
5.2 Equipos, marca y modelo	48
Agitador Enviro-Genie®; model S1-1200	48
Balanza analítica Denver Instrument Company; model TR-104	48
Rotador IKA® Loopster digital	49
5.3 Reactivos con especificaciones (marca, modelo y lote)	49

5.4 Disoluciones y composición	50
5.5 Programas	51
6. RESULTADOS	53
6.1 Purificación de Linfocitos T CD8⁺ vírgenes	53
6.1.1 Purificación de linfocitos T CD8 ⁺ de adultos y neonatos	53
6.2 Evaluación de β-catenina, CBP y P300 en linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos.....	53
6.3 Inmunoprecipitación de β-catenina en linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos.....	56
6.4 Proteómica	59
6.4.1 Identificación de cambios en las vías de Wnt.....	62
6.4.2 Análisis del interactoma	63
6.4.3 Expresión de genes diferenciales que participan en la formación de los complejos proteicos.	67
6.4.4 Enriquecimiento de β -catenina en regiones promotoras de una selección de genes.....	68
7. DISCUSIÓN	72
8. ARTÍCULO EN REVISIÓN	77
9. RECOMENDACIONES	78
10. AGRADECIMIENTOS.....	93
11. ANEXOS.....	94
Anexo 1. Cebadores empleados en el PCR Tiempo-Real.....	94
Anexo 2. Identificación de proteínas asociadas a β -catenina en células T CD8 ⁺ basales	95
Anexo 3. Identificación de proteínas asociadas a β -catenina en células T CD8 ⁺ estimuladas con wnt3a	96
12. BIBLIOGRAFÍA.....	99

Tabla de Figuras

Figura 1. Vías no canónica de Wnt.....	14
Figura 2. Vía canónica de Wnt.....	16
Figura 3. Proteínas que interaccionan con β -catenina.....	23
Figura 4. Modelo de uso del coactivador.....	28
Figura 5. Modelo propuesto del papel de TCF/ β -catenina/CBP y TCF/ β -catenina/CBP300	30
Figura 6. Pureza de linfocitos T CD8 ⁺ de adultos y neonatos.....	54
Figura 7. Citometría de flujo de linfocitos T CD8 ⁺ de adultos y neonatos.....	56
Figura 8. Inmunoprecipitación de β -catenina en linfocitos T CD8 ⁺	58
Figura 9. Identificación de proteínas en linfocitos T CD8 ⁺ de adultos y neonatos basales.....	60
Figura 10. Identificación de proteínas en linfocitos T CD8 ⁺ de adultos y neonatos estimulados ..	61
Figura 11. Proteínas asociadas a β -catenina analizadas en KEGG PATHWAY.	64
Figura 12. Complejos proteicos asociados a β -catenina.....	66
Figura 13. Validación de genes por qPCR.....	68
Figura 14. Enriquecimiento de β -catenina en promotores de genes.....	69
Figura 15. Transcripción de genes.....	71

Dedicatoria

A mi madre que es sagrada para mí, a mi padre por su inteligencia. A la Dra. Santana por enseñarme y a los amigos por brindarme su tiempo y amistad.

Resumen

Los neonatos son una población en alto riesgo de contraer infecciones, que pueden dejar secuelas serias en su salud. Esto contrasta con la pobre información que se tiene sobre inmunidad neonatal, en particular en seres humanos. La respuesta inmune neonatal tiene características únicas que reflejan la transición del nacimiento y la adaptación del infante a su medio ambiente. En la vida intrauterina, tanto la madre como el feto deben evitar el rechazo aloinmune, mientras que después del nacimiento, el neonato va a enfrentar dos posibles tipos de antígenos: los que constituyen parte de un medio ambiente no nocivo al que se debe de adaptar y patógenos potenciales. Se debe permitir la colonización primaria por los microorganismos que constituirán la microbiota de piel y mucosas y a la vez contender con posibles organismos patogénicos, evitando el establecimiento de respuestas proinflamatorias, potencialmente nocivas. Parte de la protección del recién nacido es conferida por los anticuerpos maternos, pero no existe inmunidad celular pasiva durante el período neonatal, por lo que el recién nacido depende de su propio sistema inmunológico para enfrentar agentes patógenos intracelulares.

En los neonatos, la inmunidad adaptativa se encuentra en un estado de tolerancia, determinado desde la etapa de gestación del feto. Los linfocitos T CD8⁺ neonatales se caracterizan por tener un alto umbral de activación y estar en un estado de quiescencia y auto-renovación. En consecuencia, los neonatos son individuos vulnerables a infecciones por patógenos intracelulares. Los mecanismos por los cuales se establecen estas características en los linfocitos y otras células del sistema inmune, aún no se conocen por completo. Sin embargo, la vía de señalización canónica de Wnt, dependiente de β -catenina, podría estar involucrada, ya que la vía es antagónica a la del receptor de células T. Se conoce que la vía canónica de Wnt participa en el desarrollo de los timocitos, pero también juega un papel fundamental en la biología de los linfocitos T. Esta vía posee la particularidad de regular dos procesos celulares antagónicos: auto-renovación y diferenciación. En ensayos epigenéticos del genoma de linfocitos T CD8⁺ vírgenes neonatales, se identificó en el laboratorio que la vía de Wnt se encuentra más activa en las

células neonatales.

En el presente trabajo, evaluamos por espectroscopía de masas los complejos proteicos que se asocian con β -catenina durante la activación de la vía canónica de Wnt. Encontramos que, aunque muchas proteínas de los complejos formados en las células T CD8⁺ de adultos y neonatos son compartidas, existe una serie de proteínas que sólo se encuentran en las células neonatales y otras que sólo se encuentran en las células de adultos. Estas proteínas diferencialmente reclutadas pueden establecer complejos que llevan a funciones biológicas distintas. En las células neonatales, complejos proteicos están asociados con ciclo celular, remodelación de la cromatina y metabolismo, mientras que en las células de adultos, los complejos proteicos participan en la regulación de la respuesta inmune y de MAP cinasas. También evaluamos el enriquecimiento de β -catenina sobre los promotores de genes de auto-renovación, señalización y diferenciación. Encontramos que la β -catenina está más enriquecida en los promotores de genes asociados con autorenovación en las células neonatales y con diferenciación en los genes de las células de adultos. Además, fue muy relevante encontrar que hubo una mayor asociación de β -catenina con P300 en las células de adultos al estimular con wnt3a a diferencia de las células de neonatos que obtuvo una mayor asociación por la proteína CBP. En conjunto, nuestro trabajo aportó nuevos conocimientos a la inmunobiología de los linfocitos T CD8 neonatales, que pueden contribuir al mejor manejo y comprensión de la población neonatal humana.

1. Introducción

1.1 El Sistema Inmune

El conjunto de órganos, tejidos, células y moléculas que son responsables de proteger al organismo contra patógenos es conocido como el sistema inmune. El buen funcionamiento del sistema inmune está en montar una respuesta adecuada, que permita la protección contra patógenos y células disfuncionales. Esto se logra mediante dos ramas de la respuesta, que se conocen como inmunidad y tolerancia inmunológica. Esta última debe establecerse evidentemente hacia los antígenos propios y del medio ambiente, pero también contra una respuesta exacerbada que ponga en riesgo la integridad del organismo. Se requiere de un fino balance entre la respuesta inmune y la tolerancia inmunológica para establecer un adecuado estado de homeostasis en un individuo. La defensa contra los microorganismos está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y la respuesta tardía de la inmunidad adquirida. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa y consta de mecanismos de defensa celulares y bioquímicos que existen antes de la infección y que pueden responder con rapidez a ella. Los principales componentes de la inmunidad innata son: barreras físicas y químicas como el epitelio y las sustancias químicas antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales; células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos), células dendríticas y linfocitos citotóxicos naturales (NK); proteínas sanguíneas, incluidos miembros del complemento y otros mediadores de la inflamación. Sus mecanismos son específicos frente a estructuras que son comunes de patógenos o grupos de microbios relacionados y no distinguen diferencias ligeras entre microbios. Sin embargo, esta respuesta no desarrolla memoria inmunológica ni posee un elevado número de especificidades. Por otra parte, el sistema inmune adaptativo se compone principalmente de linfocitos B y T. La inmunidad adaptativa es capaz de generar memoria inmunológica y posee una alta diversidad para el reconocimiento de agentes infecciosos o antígenos. Dado que este tipo de inmunidad se desarrolla en respuesta a una infección y adapta la respuesta contra la infección, se le ha llamado inmunidad adaptativa (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2011).

Esta clasificación no simboliza una brecha entre el sistema inmune innato y el adaptativo

o que sus componentes realicen procesos aislados e independientes uno del otro, de hecho ambos se interconectan estrechamente. El sistema inmune innato es el encargado de despertar al sistema inmune adaptativo, ya que le provee de señales que son requeridas para la activación de este último. Estas señales son necesarias para la proliferación y diferenciación de linfocitos B y T vírgenes antígeno-específicos. Al mismo tiempo, el sistema inmune adaptativo potencia y vuelve más eficientes a las células del sistema innato durante su fase efectora, mediante la secreción de moléculas (comunicación paracrina), pero también a través de cambios en la expresión de moléculas de superficie celular. En la inmunidad adaptativa, la respuesta que se dará frente a diversos patógenos depende principalmente de si se trata de patógenos intracelulares o extracelulares. La respuesta que se da ante patógenos intracelulares es llamada celular y ante patógenos extracelulares es llamada humoral. La activación del tipo de respuesta inmune, se debe a receptores de reconocimiento de patógenos en la célula presentadora de antígeno, en particular las células dendríticas. Estas células contienen receptores que reconocen patrones moleculares en los patógenos y generan citocinas al momento que presentan el antígeno, las cuales son dirigidas hacia los linfocitos T. Los tres tipos principales de células presentadores de antígeno son las células dendríticas (DC), los monocitos-macrófagos, y las células B. En las dos últimas, la presentación de antígeno tiene funciones efectoras. Las principales moléculas de superficie celular que interaccionan en el proceso de presentación son el MHC (complejo principal de histocompatibilidad, también llamado HLA en humanos) y el CD11a en el caso de la presentación de antígenos lipídicos (CD se refiere a cluster differentiation) por parte de las células dendríticas y el TCR (receptor de célula T). Existen además otras moléculas accesorias que permiten la activación adecuada de los linfocitos, entre ellas CD28 y el CD4 o CD8.

Las células T son las células encargadas de coordinar la respuesta inmune adaptativa y guardar la memoria inmunológica. Su función es organizar y dirigir a las demás células del sistema inmune en la respuesta específica que un patógeno requiere y determinante para la resolución de la enfermedad (Crane & Forrester, 2005). Las células T tienen varios estados de diferenciación una vez que se encuentran maduras y en la circulación sanguínea. A estas células que nunca han visto un antígeno se les llama células vírgenes. Una vez que se activan por el encuentro con un antígeno se diferencian en células efectoras y células de

memoria. El perfil de citocinas secretadas por las células T es determinante sobre el tipo de inmunidad que se desarrolla. Las células efectoras se clasifican en Th1, Th2 y Th17. Las células Th1 secretan IFN γ e inducen una respuesta mediada por macrófagos, células NK y linfocitos T citotóxicos. Las células Th2, secretan IL-4, IL-5 e IL-13 que inducen a los linfocitos B a producir anticuerpos neutralizantes y a la activación de células cebadas y eosinófilos (Santana & Esquivel-Guadarrama, 2006). También inducen la secreción de moco y movimientos peristálticos que ayudan a la eliminación de parásitos. Las células Th17, son pro-inflamatorias por la secreción de IL-17A, IL-17F, IL-22 y G-CSF (Dong, 2008), pero también pueden inducir tolerancia, mediante la co-secreción de IL-27 (Awasthi et al., 2007). Además de las células T efectoras, existen células reguladoras, cuya función es inhibir y controlar la respuesta inmune (Jonuleit & Schmitt, 2003). Existe inhibición mutua entre las distintas poblaciones celulares por las citocinas que producen. Dicho esto, es importante recalcar que el dogma Th1 vs Th2 de la inmunología clásica está siendo cambiado por el descubrimiento de un número cada vez mayor de poblaciones efectoras de linfocitos T y por la naturaleza plástica de las células T (Wan, 2010)(Annunziato & Romagnani, 2009)(Jimeno et al., 2012)(Vock, Hauber, & Wegmann, 2010). Una vez activadas las células T, estas se expanden, esto es llamado expansión clonal, ya que solo las clonas que responde al antígeno presentado van a expandirse. Esta expansión depende de la función autócrina de la IL-2 (citocina que induce división celular) que es producida por los mismos linfocitos T, e induce en ellos mismos la expresión en su superficie del receptor de alta afinidad, el CD25. Los linfocitos T se clasifican en células CD4⁺ y células CD8⁺, que tienen mayoritariamente funciones como cooperadoras las primeras (Th) y citotóxicas (Tc) las segundas. Las células T CD4⁺ dirigen y potencian las repuestas de otras células, entre ellas, los macrófagos, los linfocitos B y los granulocitos. Las células T citotóxicas dependen del interferón gamma (IFN- γ) para ejercer su función citotóxica. Los linfocitos Th17 eliminan bacterias extracelulares y hongos y potencian la actividad de los fagocitos, en particular los neutrófilos.

1.1.1 Linfocitos T CD8⁺ o CTL citotóxicos

Las células T CD8⁺ maduran en el timo y expresan el receptor de células T (TCR). Se caracterizan por carecer de la molécula CD4 y expresar el correceptor dimérico CD8, compuesto por una cadena CD8 α y otra CD8 β . Las células T CD8⁺ reconocen péptidos

unidos a moléculas MHC de clase I, las cuales se encuentran en todas las células nucleadas. El heterodímero CD8 se une a una porción conservada (la llamada región $\alpha 3$) de la molécula de MHC durante la interacción de presentación antigénica entre células T y las APC. También conocidos con el nombre de linfocitos T citotóxicos, o CTLs, son una importante herramienta contra patógenos intracelulares, como bacterias o virus y para la vigilancia de las células tumorales. Una vez que la célula T CD8⁺ ha reconocido su antígeno y se ha activado, posee tres mecanismos para eliminar las células infectadas o malignas. La primera es mediante la secreción de citocinas, como TNF α e IFN- γ , con efectos antitumorales y antimicrobianos a través de la activación de los macrófagos. La segunda función es la producción y liberación de gránulos citotóxicos. Estos gránulos, que también se encuentran en las células NK, contienen dos familias de proteínas, perforinas y granzimas. Las perforinas forman un poro en la membrana de la célula diana, similar al complejo de ataque a la membrana del complemento. Este poro permite que las granzimas entren en las células infectadas o malignas. Las granzimas son serina-proteasas que procesan caspasas en el interior celular, bloqueando la producción de proteínas virales y, finalmente, provocando la apoptosis de la célula diana. Los gránulos citotóxicos se liberan únicamente en la dirección de la célula, lo cual se consigue a través de las llamadas sinapsis inmunológicas. De esta manera se evitan daños inespecíficos a otros tejidos sanos circundantes. Una vez que ha “matado” a una célula, pueden ir por la siguiente y empezar de nuevo, en un proceso llamado eliminación seriada.

La tercera modalidad de destrucción es vía interacción de Fas/FasL. Las células T CD8⁺ activadas expresan FasL en su superficie, lo que permite la unión a su receptor, Fas, que se expresa en la superficie de las células diana. Esta unión provoca que la molécula Fas de la superficie trimerice, iniciando así una cascada de señalización. Las moléculas implicadas en esta cascada promueven la activación de caspasas, lo que trae consigo la apoptosis de la célula. Ya que las células T CD8⁺ pueden expresar tanto FasL como Fas, se pueden destruir entre sí en un proceso llamado fratricidio, favoreciendo así la eliminación de células efectoras durante la fase de contracción en la etapa final de la respuesta inmunitaria. A pesar de su papel en la lucha contra virus, bacterias intracelulares y tumores, estos linfocitos también pueden contribuir a un exceso de respuesta inmune causando enfermedades autoinmunes (Wissinger, n.d.)(Abbas et al., 2011).

1.2 Sistema inmune neonatal

Acercarse a las características del sistema inmune neonatal es posible a través de observar las peculiaridades del desarrollo fetal; las que a su vez influyen en el desarrollo de su sistema inmune. La gestación del feto se lleva a cabo en un ambiente en el que, por lo general, no existe contacto con antígenos extraños, sin embargo, aun así el feto debe cumplir con un diverso conjunto de demandas inmunológicas. Entre ellas están la protección contra infecciones por patógenos de la interface madre-feto y la evasión de una respuesta inmune inflamatoria que pudiera provocar un parto prematuro. El nacimiento mismo entraña la transición de un medio estéril a un ambiente colmado de antígenos extraños. Estas demandas inmunológicas son responsables de establecer un sistema inmune determinado, que en el caso particular de los recién nacidos, está predispuesto a un estado de tolerancia, caracterizado por un sesgo hacia la producción del tipo celular Th2 (Mellor & Munn, 2000) (Levy et al., 2006) (Adkins, 2005) (Marchant & Goldman, 2005) (Ndure & Flanagan, 2014). Lo anterior sitúa al neonato bajo un riesgo de infección por patógenos intracelulares. No obstante, en condiciones de estimulación y coestimulación altas, los neonatos reaccionan de manera eficiente, similar a los adultos, por lo que se menciona que los linfocitos neonatales poseen un alto umbral de activación.

Cuatro millones de niños menores de 6 meses mueren al año por infecciones en todo el mundo (UNICEF, WHO, World Bank, 2018). La alta mortalidad en neonatos se debe a una situación aparentemente paradójica: los neonatos presentan una respuesta inflamatoria aumentada acompañada de una pobre citotoxicidad hacia las células infectadas. Estudios de transcriptoma de linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos realizados en el laboratorio mostraron que los linfocitos T CD8⁺ neonatales tienen un perfil de expresión particular, en el cual se expresan más moléculas pro-inflamatorias y características de la inmunidad innata y tienen una disminución en la expresión de los genes característicos de la respuesta citotóxica (Galindo-Albarrán et al., 2016). Esto pudiera ser responsable de la alta sensibilidad de los neonatos a infecciones virales y bacterianas, sepsis y síndrome inflamatorio estéril, que pueden llegar a la muerte. (Ghazal, Dickinson, & Smith, 2013) (Melvan, Bagby, Welsh, Nelson, & Zhang, 2010) (Verboon-Macielek, Krediet, Gerards, Flier, & Loon, 2005).

El alto umbral de activación de las células T CD8⁺ neonatales llevó a la idea de que es el

ambiente neonatal el responsable de la baja respuesta inmune de las células T. En este sentido, se han reportado altas concentraciones de adenosina (Haskó & Cronstein, 2004)(Levy et al., 2006) y arginasa (Elahi, 2014) en el suero neonatal, que tienen efectos tolerigénicos. Además, la leche materna contiene ligandos de TLR y otras proteínas que inducen un estado tolerante en las células inmunes neonatales de los intestinos (Chatterton et al., 2013)(Levy, 2007). Esto no excluye que las células neonatales tienen características intrínsecas que hacen a los neonatos particularmente sensibles a las infecciones. Se reportó que los promotores de los genes de las citocinas IL-12 e IFN- γ característicos de la inmunidad celular contra células infectadas, se encuentran silenciados debido a hipermetilación de sus elementos reguladores (Goriely et al., 2001)(Melvin et al., 1995)(Vanden Eijnden et al., 2006). Por el contrario, el locus humano de IL-13 se encuentra en cromatina abierta y es resistente a la condensación de la cromatina, lo que hace a los neonatos e infantes particularmente susceptibles a desarrollar enfermedades alérgicas (Webster et al., 2007). En respuesta a la activación por el receptor de células T (TCR), solo una proporción de las células neonatales se diferencia en los fenotipos efectores clásicos, mientras que la mayoría de las células T (de neonatos de término y pre-término) responde al estímulo con la producción de la quimiocina IL-8 (CXCL8), que lleva al reclutamiento de neutrófilos y células T gamma-delta (Deena Gibbons et al., 2014). El grupo de Ghazal encontró, en un análisis masivo de sangre de neonatos sanos y con sepsis, que los neonatos desarrollan una respuesta desbalanceada, con un metabolismo celular alterado, una alta respuesta inflamatoria y una limitación en las respuestas clásicas de los linfocitos T (Smith et al., 2014). Estos estudios añaden evidencias a nuestro trabajo, en tanto a que los linfocitos T CD8⁺ son deficientes en su respuesta citotóxica y pudieran participar en la alta respuesta inflamatoria de los neonatos. Esto en su conjunto explicaría por qué los neonatos son particularmente sensibles a desarrollar situaciones inflamatorias graves y a la vez presentan una baja respuesta citotóxica, que los hace susceptibles a sepsis e infecciones por patógenos intracelulares.

1.3 Vía de WNT

La señalización iniciada por moléculas la familia de Wnt es uno de los mecanismos fundamentales que llevan a la proliferación directa de células, polaridad celular y

determinación del destino celular (Logan & Nusse, 2004). Las mutaciones en proteínas que participan en la vía Wnt a menudo están vinculadas a defectos humanos de nacimiento, cáncer y otras enfermedades (Clevers, 2006). Las vías de señalización dependientes de Wnt se agrupan en dos tipos: vía canónica y vías no canónicas.

La vía canónica depende de la estabilización de β -catenina, a través del desensamblaje del complejo de degradación y de la asociación de β -catenina con complejos proteicos y finalmente con los factores transcripcionales de la familia de LEF y TCF. Las vías no canónicas se dividen en dos grandes tipos, las de polaridad planar (PCP por sus siglas en inglés) y la vía de Wnt/ Ca^{2+} como se muestra en la **Figura 1**. Dentro de la vía no canónica PCP, entran varias vías, entre ellas Wnt/RAP1, Wnt/ROR2, Wnt/PKA, Wnt/GSK3-MT, Wnt/aPKC, Wnt/RYK y Wnt/mTOR (Semenov, Habas, Macdonald, & He, 2007). La expresión de coreceptores de LRP5 y LRP6 no es necesaria para la señalización Wnt no canónica. La vía de la PCP a menudo se inicia por Wnt5A y Wnt11 a través del receptor Frizzled (Fr), Dishevelled (DVL) y podría implicar proteínas G (Semenov et al., 2007). DVL en asociación con DAAM (Dishevelled-associated activator of morfogenesis) activa la vía de RHOA (RAS homologue gene-family member, ROCK (RHO-associated coiled-coil-containing protein kinase) mediando la reorganización del citoesqueleto. DVL también activa a dos GTPasas (RhoA y RAC1), activando la cinasa Jun N-terminal (JNK) y la vía de respuesta al estrés. La vía de la polaridad planar influye en el citoesqueleto y de ese modo en la forma celular. Además, la vía PCP podría inhibir la señalización de Wnt canónica en los linfocitos mediante la regulación negativa de los niveles de la proteína β -catenina. (Liang et al., 2003)(Liang et al., 2007). Varias vías descendentes de DVL regulan el citoesqueleto de actina y la polaridad celular, aunque esto no se ha demostrado aún en las células del sistema inmune (Wu et al., 2012).

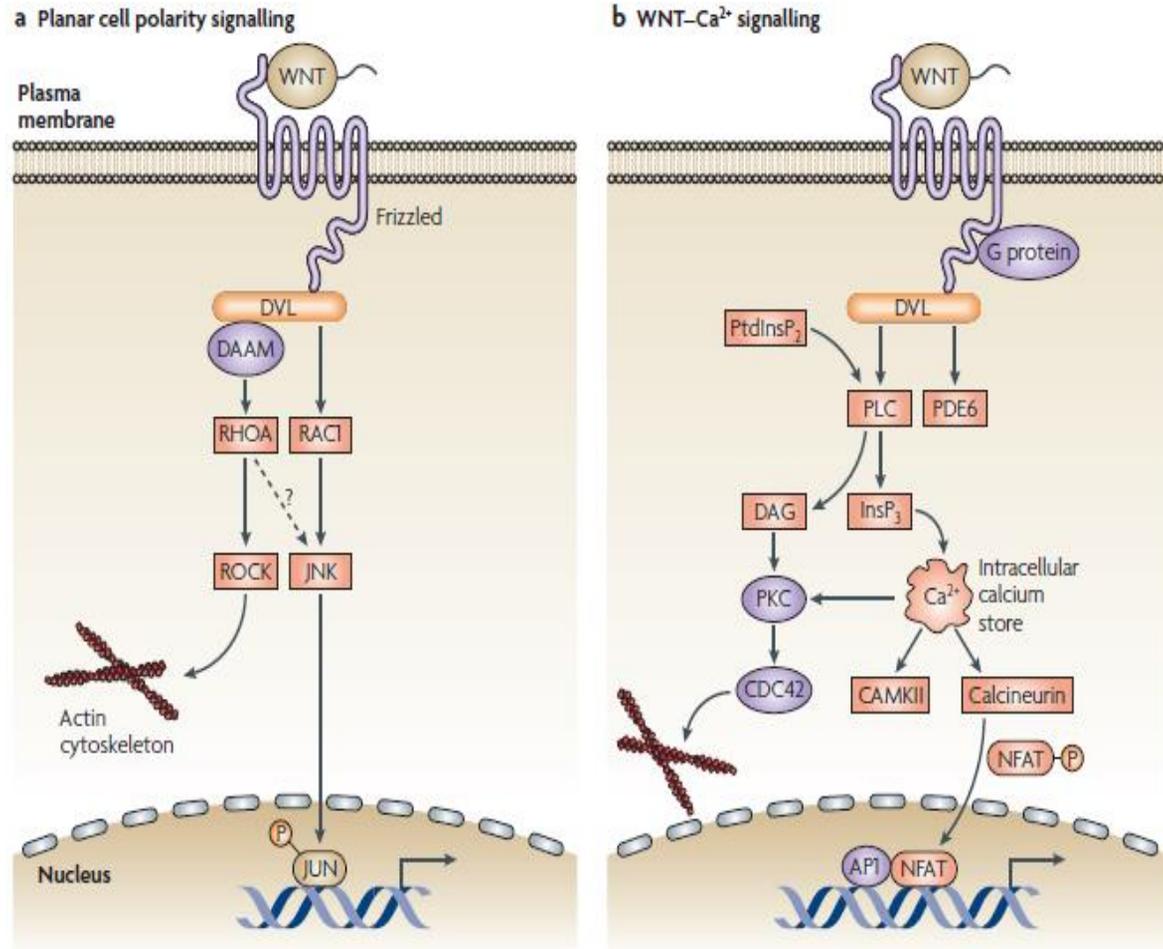


Figura 1. A) Polaridad celular planar de señalización (PCP) que no implica β -catenina. B) La señalización de Wnt- Ca^{2+} que está mediada por proteínas y fosfolipasas G y conduce a aumentos transitorios de calcio libre citoplasmático que posteriormente activan las PKC y la activación de cofactores transcripcionales como NFAT.

1.3.1 Vía canónica de Wnt

La vía canónica de señalización de Wnt, es una de las más estudiadas. Revisaremos los ligandos de Wnt, sus agonistas, antagonistas, las interacciones con los receptores Wnt, el complejo de degradación de β -catenina en el citosol, el control de su estabilidad y la maquinaria nuclear de los factores transcripcionales asociados a β -catenina. También se destacaran las enfermedades relacionadas con la vía Wnt/ β -catenina como malformaciones congénitas, cáncer, osteoporosis y las implicaciones terapéuticas de la vía.

La β -catenina está constantemente degradándose por el complejo de degradación compuesto por la proteína de andamiaje Axina, el factor supresor tumoral *Adenomatous polyposis coli* (APC), la caseína cinasa 1 (CK1) y la glicógeno sintasa cinasa 3 (GSK3). CK1 y GSK3 fosforilan a β -catenina en la región N-terminal y es la señal para el

reconocimiento por β -Tcrp, una subunidad E3-ubiquitina ligasa, que permite ubiquitinar a β -catenina para ser degradada en el proteosoma. Esta eliminación continua de β -catenina permite que en el núcleo sean reprimidos los genes de la vía por las proteínas de la familia GROUCHO, que se asocian con los factores transcripcionales de *T cell factor* (TCF) y los *lymphocyte-enhancer-binding factor* (LEF) que poseen sitios de unión a DNA **Figura 2A**.

1.3.2 Fosforilación de β -catenina/ Degradación por el complejo de degradación

En 1997 (Huber, Nelson, & Weis, 1997) publicaron un estudio en el cual muestran la estructura de la β -catenina. La estructura primaria de β -catenina se compone de una parte NH₂-terminal de aproximadamente 130 aminoácidos, una región central de 550 aminoácidos que contiene 12 repeticiones de secuencia de 42 aminoácidos, conocidos como brazo armadillo y una región COOH-terminal de 100 aminoácidos. Las 12 repeticiones armadillo forman una superhélice que cuenta con un surco largo, cargado positivamente. Aunque no relacionadas en secuencia, las regiones de unión a β -catenina de cadherinas, TCF y APC son ácidas y se proponen como sitios de interacción con esas proteínas. Las tres regiones de la β -catenina tienen distintas distribuciones de carga. El PI (punto isoeléctrico) calculado de β -catenina murino es 4,4 para el dominio NH₂-terminal (residuos 1-140); 8,3 para el grupo de repeticiones (residuos 141-664) y 4,3 para el dominio COOH-terminal. La β -catenina es fosforilada en la serina 45 por CK1 α y en la treonina 41, serina 33 y serina 37 por GSK3. Estas últimas fosforilaciones son las señales para la ubiquitinación y su posterior degradación (Huber et al., 1997).

La GSK3 y la CK1 también fosforilan a la APC y la Axina, aumentando la asociación de la APC y Axina con la β -catenina. Existen dos abundantes fosfatasa de serina/treonina, PP1 y PP2A, ambas asociadas con Axina y APC, contrarrestan la acción de GSK3 y CK1 en el complejo de Axina. Por lo tanto, PP1 desfosforila la Axina y promueve el desmontaje del complejo de Axina (Luo et al., 2007), mientras que PP2A desfosforila la β -catenina (Su et al., 2008).

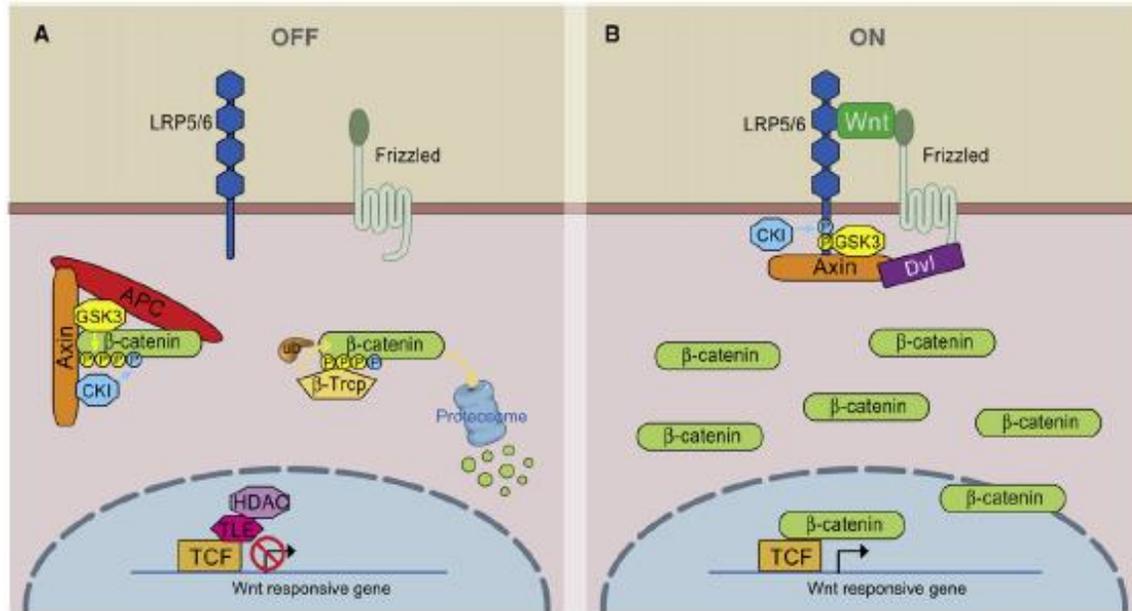


Figura 2. A) En ausencia de Wnt, la β -catenina citoplasmática forma un complejo con Axina, APC, GSK3 y CK1 y es fosforilada por CK1 (azul) y posteriormente por GSK3 (amarillo). β -catenina es fosforilada y es reconocido por el E3 ubiquitina ligasa b-TrCP, que conduce a la β -catenina para la degradación proteosomal. Esto permite que los genes Wnt sean reprimidos. **(B)** En presencia de ligando de Wnt un receptor de formas complejas entre Fz and LRP5/6. El reclutamiento de Dvl por Fz conduce la fosforilación de LRP 5/6 y el reclutamiento Axina. Esta fosforilación y degradación de β -catenina, permite que la β -catenina se acumule en el núcleo, donde sirve como un coactivador de TCF para activar los genes de respuesta a Wnt.

1.3.3 Receptores de Wnt: Frizzled y LRP5/6

Las proteínas Wnt son glicoproteínas ricas en cisteínas de aproximadamente 3500- 4000 aminoácidos que contienen en el N-terminal un péptido señal de secreción. Son ampliamente conservadas y poseen 19 ligandos. La interacción de estas proteínas con receptores y correceptores, pueden dar lugar a la activación de las vías canónicas y no canónicas. La proteína Wnt más estudiada para la activación de la vía canónica es Wnt3a. En la membrana de la célula, las proteínas Wnt de la vía canónica se unen al receptor de Frizzled y el co-receptor de baja densidad de lípo-proteína 5 (LRP5) o LRP6 para activar la cascada de señalización. Después de que Wnt se une a su receptor, la formación del complejo Frizzled-LRP5/LRP6-DVL (Dishevelled, homólogo en mamífero de *Drosophila*) **Figura 2B** promueve la fosforilación de LRP5 o LRP6 por CK1 y GSK3, las mismas cinasas que están implicadas en el complejo de degradación de β -catenina. La fosforilación de LRP5 o LRP6 permite el acoplamiento de AXIN1 (Staal, Luis, & Tiemessen, 2008). Existen dos familias de receptores críticos para la vía de Wnt/ β -catenina. Frizzled que es una familia de receptores que cruzan siete veces la membrana. En mamíferos existen 10

genes para este receptor. Tienen capacidad variable de activar a la vía cuando se asocian con los correceptores LRP5/6. El LRP6 juega un papel crucial en la embriogénesis y el LRP5 es indispensable en la embriogénesis pero es crítico en la homeostasia de médula de adultos. Existen datos y estudios “in vitro” de que la unión de Fz-LRP5/6 es suficiente para activar la vía de señalización de β -catenina (He, Mikhail, Keiko, & Xin, 2004). Wnt puede activar la vía β -catenina y la no canónica en dependencia del receptor al que complementa y del miembro de la familia Wnt. Existen modelos “in vivo” de que el complejo Fz-LRP5/6 antagoniza con la vía no canónica siendo una posible vía competitiva para ligandos de Wnt, aunque los mecanismos aún se desconocen (MacDonald, Tamai, & He, 2009).

1.3.4 Dishevelled

Los ligandos de Wnt que son glicoproteínas secretadas, inician la señalización mediante la interacción con receptores de superficie celular Frizzled (Fz) y las lipoproteínas de baja densidad de receptores relacionados proteína de 5/6 (LRP5/6). Estas, a su vez, reclutan a Dishevelled a la superficie celular y de ese modo desensamblan el complejo de degradación proteolítica constitutiva de β -catenina. Estudios recientes arrojan una nueva luz sobre esta vía. Se ha demostrado que la unión de Wnt conduce a un agrupamiento de los receptores Fz y LRP6 para formar polímeros con la ayuda de Dvl. Se identificó originalmente sobre la base del fenotipo de desorientación en el cuerpo y las alas en *Drosophila*. Tres homólogos Dsh (Dvl1, 2 y 3) se han identificado en humanos y ratones, y las proteínas se componen de alrededor de 750 aminoácidos y muestran una secuencia con alta homología. Se ha demostrado que Dvl puede interactuar con una amplia gama de proteínas asociadas. Esta característica de Dvl permite la convergencia de las señales extracelulares y la divergencia de los resultados intracelulares generados (Gao & Chen, 2010).

1.3.5 APC

La proteína Adenomatous polyposis coli (APC) es un regulador negativo que controla la concentración de β -catenina. APC es una proteína con múltiples dominios, codificada en el cromosoma 5q21-22, capaz de interactuar con moléculas tan diversas como los componentes de la vía WNT, microtúbulos, reguladores del citoesqueleto (EB1 y IQGAP1) o Asef1 (factor intercambiador de nucleótidos de guanina). APC es parte integral del

mecanismo de señalización de Wnt, pero también juega un papel de interés en la adhesión celular, estabilidad microtubular del citoesqueleto, regulación del ciclo celular y posiblemente en la apoptosis. Además de con β -catenina, APC interacciona y es fosforilada por GSK3 β en su región central, lo que a su vez permite una mejor unión de APC a β -catenina (Fearnhead, Britton, & Bodmer, 2001). Para la regulación de β -catenina, APC construye un complejo con GSK-3 β y Axina. Este complejo es capaz de unir β -catenina en el citoplasma que se fosforila por CK1 y GSK-3 β etiquetando β -catenina para su degradación. Axina parece actuar como proteína de andamiaje en la formación de un complejo de multiproteínas con APC β -catenina, para luego facilitar la fosforilación de APC (Hart et al., 1999) y β -catenina por GSK3 β . La fosforilación de APC resulta en la unión de β -catenina (Rubinfeld B et al., 1996) y resultando en el aumento de APC mediado por la fosforilación de GSK3 β y la subsecuente de β -catenina (Kawahara et al., 2000).

1.3.6 Axina

Axina es una proteína de anclaje del complejo de degradación de β -catenina. Su fosforilación es esencial para su estabilidad, siendo GSK3 β responsable de dicha fosforilación. En humanos se conocen dos genes Axina1 y Axina 2 o conductina, que a su vez es un gen diana de la propia vía WNT. Axina1 es un componente constitutivo del complejo de degradación de β -catenina, ejerciendo un papel de regulador negativo de la vía al mantener los niveles de β -catenina bajos en el citoplasma. Axina2 es un elemento de expresión inducible con un papel inhibitorio por retroalimentación (Lustig et al., 2002). Por otro lado, axina es capaz de moverse entre el núcleo y el citoplasma gracias a sus secuencias NES y NLS (Nuclear Export Signal y Nuclear Localization Signal) pudiendo regular la localización celular de β -catenina junto a APC, aunque dados los bajos niveles de axina, la acumulación de β -catenina, puede llegar a sobrepasar los límites de regulación de axina (Cong et al., 2004).

Axina actúa como regulador negativo dentro de la vía de señalización de Wnt mediante la reducción de la cantidad de β -catenina disponible para la activación transcripcional (Sakanaka et al., 1998). En ausencia de señal de Wnt, se produce la fosforilación de Axina mediada por GSK3 β y el enlace a APC y β -catenina. La activación de la señal de Wnt es transducida por la proteína citoplásmica Dishevelled (Dvl) (Li et al., 1999). Dvl forma un

complejo con Axina (Fagotto et al., 1999) e induce su desfosforilación. Esto reduce la capacidad de Axina para formar complejos con APC y β -catenina, dando como resultado la acumulación de β -catenina y su activación transcripcional. La modulación de este efecto vía arriba es debido a la presencia de un sitio de unión PP2A en Axina (Hsu et al., 1999). El complejo Axina PP2A muestra APC desfosforilado en sitios previamente fosforilados por GSK3 β y la reducción del nivel de β -catenina (Ikeda et al., 2000).

1.3.7 Casein kinase 1a (CK1a)

CK1 es una de las cinasa responsables de la fosforilación de β -catenina. CK1 constituye una familia de serina/treonina cinasas monoméricas presentes en células eucariotas. En mamíferos se han descrito hasta 7 componentes: α , β , γ 1, γ 2, γ 3, δ y ϵ , cuyos dominios cinasa comparten una identidad de entre el 53 y el 98%. El sitio de fosforilación es pS/T-X-X-X-(S/T), siendo este último residuo el punto diana de fosforilación. Cada una de las isoformas tiene diferentes proteínas diana, y por tanto, diferentes efectos. En la vía WNT, CK1 ϵ es un regulador positivo mientras que CK1 α actúa como regulador negativo. Sin embargo, existen datos de que otras isoformas puedan participar en la fosforilación de β -catenina. Así se ha descrito que tanto CK1 α , como las isoformas ϵ y δ pueden fosforilar a β -catenina en presencia de axina (Amit et al., 2002). Por otra parte, CK1 ϵ puede fosforilar a APC (regulando negativamente de la vía, (Rubinfeld et al., 2001) y Dsh con un incremento de la señalización por β -catenina (Hino et al., 2003)(Bryja et al., 2007). Finalmente CK1 α , γ y ϵ pueden fosforilar al correceptor LRP6, favoreciendo así la activación de la vía (Zeng et al., 2005).

1.3.8 Glycogen synthase kinase (GSK3)

GSK-3 (Glycogen synthase kinase) es una serina/treonina cinasa identificada en 1980 por Embi [95]. En mamíferos se encuentran dos isoformas GSK-3, α (51 kDa) y β (47 kDa), las cuales están codificadas por genes diferentes conocidos como *gsk3 α* y *gsk3 β* respectivamente. Ambas isoformas se expresan de manera ubicua y funcionalmente redundante en diversas vías de señalización incluyendo la vía de Wnt/ β -catenina (Watts & Neve, 2005).

GSK-3 β es uno de los moduladores negativos más importantes de la señalización mediada

por Wnt, y junto con β -catenina, es fosforilado por numerosos factores de transcripción (Vidal et al., 2010), factor de activación nuclear de células T (NFAT) (Zhang, 2009), neurogenina 2 (Mato et al., 2010), Smad1 (Nestler et al., 1989), y c-Jun (Alfonso et al., 2006). Todos ellos juegan un papel importante en la expresión génica, plasticidad neuronal y supervivencia celular (Morley-Fletcher et al., 2011). GSK-3 β produce además la inhibición de cAMP en respuesta a la unión a CREB (Dowlatshahi et al., 1998). Además de la expresión génica, GSK-3 β está implicada en la morfogénesis celular a través de la regulación de la actividad de varias proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (Dowlatshahi et al., 1999).

La actividad de las cinasas GSK-3 es regulada por el estado de fosforilación de residuos de serina y tirosina (Vidal et al., 2009). La actividad disminuye con la fosforilación de Ser9 y aumenta por la fosforilación de Tyr216. La regulación de GSK-3 β por elementos de la vía Wnt/ β -catenina actúa principalmente a través de dos mecanismos diferentes. Uno es el modelo de inhibición directa en el cual LRP5/6 inhibe GSK-3 β vía interacción proteína-proteína secuestrando su sustrato sin afectar la actividad cinasa per se (Yamada et al., 2003). El otro mecanismo regulador importante es el mediado por la inhibición de GSK-3 β que conduce a la desestabilización y degradación de Axina y resultando en estabilización de β -catenina (Odagaki et al., 2001). Además, avances recientes indican que GSK-3 β también desempeña un papel positivo en la transducción de señales Wnt por fosforilación del receptor LRP5/6 (Yamada et al., 2003). La actividad de GSK-3 β es regulada también mediante Akt, que es activado por diferentes moléculas conocidas como PI3K y proteínas G, produciendo la inactivación de GSK-3 β por fosforilación del residuo de serina en el dominio Nt (Laifenfeld et al., 2005).

1.3.9 Antagonistas y agonistas de Wnt

Existen dos clases de inhibidores de la vía de Wnt, los que pertenecen a la familia de los Dickkopf (DKK) y los de la familia de los WISE/SOST. De la familia de los DKK tenemos ejemplificados los DKK1 que son ligandos agonistas de los receptores LRP5/6 y son considerados inhibidores específicos de la vía porque destruyen el complejo de Fz-LRP5/6. WISE y SOST son otros ligandos antagonistas de este complejo LRP5/6. Wise se une a LRP6 a través de uno de los tres bucles formados por el nudo de cistina bloqueando la

interacción de este receptor. SOST antagoniza con la señalización de Wnt mediante la unión al dominio extracelular de los correceptores LRP5 y LRP6, interrumpiendo la formación del complejo Frizzled-LRP inducida por Wnt (Semënov, Tamai, & He, 2005). La proteína Shisa es otro inhibidor ya que atrapa al receptor Fz en el retículo endoplásmico y no deja que sea traficada a la superficie celular. La proteínas Norrin y R-spondin son dos de las proteínas de las familias agonistas de la vía Wnt/ β -catenina. Norrin es un ligando específico para FZD4 y actúa a través de unión con FZD4 y LRP5/6 durante la vascularización de la retina (Q. Xu et al., 2004). Las proteínas de la familia R-spondin en los vertebrados son agonistas de la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Estas proteínas tienen aproximadamente 35 kDa, y se caracterizan por dos repeticiones de tipo furina amino-terminales, que son necesarias y suficientes para la potenciación de la señal de Wnt por su interacción con el receptor y correceptor Fzd/LRP (Nam et al., 2006)(de Lau et al., 2012)

1.3.10 Translocación al núcleo de β -catenina

Aunque β -catenina carece de cualquier señal de localización nuclear (NLS) o de exportación nuclear (NES) en su secuencia, β -catenina presenta diferentes mecanismos de translocación al núcleo. Uno de ellos es la interacción del C-terminal de β -catenina con complejos de los poros nucleares (NPCs) que median la importación y exportación de β -catenina nuclear (Wesołowska, 2008). Una vez que β -catenina alcanza el núcleo puede activar la transcripción génica de sus genes diana. Entre los principales genes diana destacan ciclina D1, c-MYC y MMP-7 (Matrix Metalloproteinase 7) entre otros. En el núcleo, β -catenina no se une directamente a la hebra de ADN, sino que lo hace a través de los factores transcripcionales LEF/TCF (Lymphocyte enhancer factor-1/ T-Cell Factor). En el estado Wnt “apagado” TCFs interactúan con represores transcripcionales de Groucho previniendo de este modo la transcripción génica ; (Cavallo et al., 1998)(Roose et al., 1998). En el estado “encendido” la asociación de β -catenina convierte a TCF transitoriamente en un activador transcripcional de genes diana, con la modulación adicional de la fosforilacion de TCF. (Hikasa et al., 2011)(Lee & Son, 2011).

1.3.11 LEF/TCF

La familia de factores de transcripción de TCF/LEF unidas al ADN es el sitio principal de unión de la β -catenina nuclear. TCF reprime la expresión de genes mediante la interacción con el represor Groucho (TLE1 en humano), que promueve la desacetilación de histonas y la compactación de la cromatina. Tenemos en esta familia TCF7 también conocida como TCF-1, TCF7L1 también conocida como TCF-3, TCF7L2 también conocida como TCF-4 y LEF1. En sí mismas son deacetilasas de histonas y por lo tanto cierran el DNA. En ausencia de señalización Wnt, los TCF funcionan como represores transcripcionales. Todos los TCF/LEF contienen una caja de HMG, dominio de alta movilidad altamente conservada y un pequeño motivo peptídico de residuos básicos "cola básica" que junto a la caja HMG y la cola básica comprenden el dominio de unión al ADN. Su interacción causa que el ADN tenga una flexión significativa que puede alterar la estructura de la cromatina local. El modelo de cambio transcripcional para la regulación de la actividad de TCF/LEF por la señalización Wnt/ β -catenina propone que en ausencia de señalización, TCF/LEF recluta los corepresores a la cromatina del gen diana como por ejemplo Groucho. Tras la asociación de β -catenina con TCF/LEF, estos corepresores se desplazan o inactivan, y se reclutan diversos coactivadores mediante interacciones con β -catenina. La lista de correguladores transcripcionales involucrados en este cambio es grande (Schuijers, Mokry, Hatzis, Cuppen, & Clevers, 2014)(Hrckulak, Kolar, Strnad, & Korinek, 2016)(Cadigan & Waterman, 2012) .

1.3.12 Coactivadores asociados a β -catenina

Varios coactivadores asociados a β -catenina han sido identificados. Estos complejos multiprotéicos identificados incluyen a BCL9 y Pygo (un mediador para el inicio de la transcripción), P300/CBP y TRRAP/TIP60 que son acetyl-transferasas de histonas (HAT), los complejos remodeladores de la cromatina SWI/SNF, a MLL1/2, que son metil-transferasas de histonas (HMTs) y a PAF1, que forma parte del complejo de elongación de la transcripción y modificación de histonas (MacDonald et al., 2009)(Cadigan & Waterman, 2012) **Figura 3** podemos visualizar como se asocian estos complejos proteicos con β -catenina. El brazo repetitivo del centro de β -catenina se asocia con TCF, el brazo repetitivo amino-terminal se une a BCL9 y la mayoría de los complejos de coactivadores

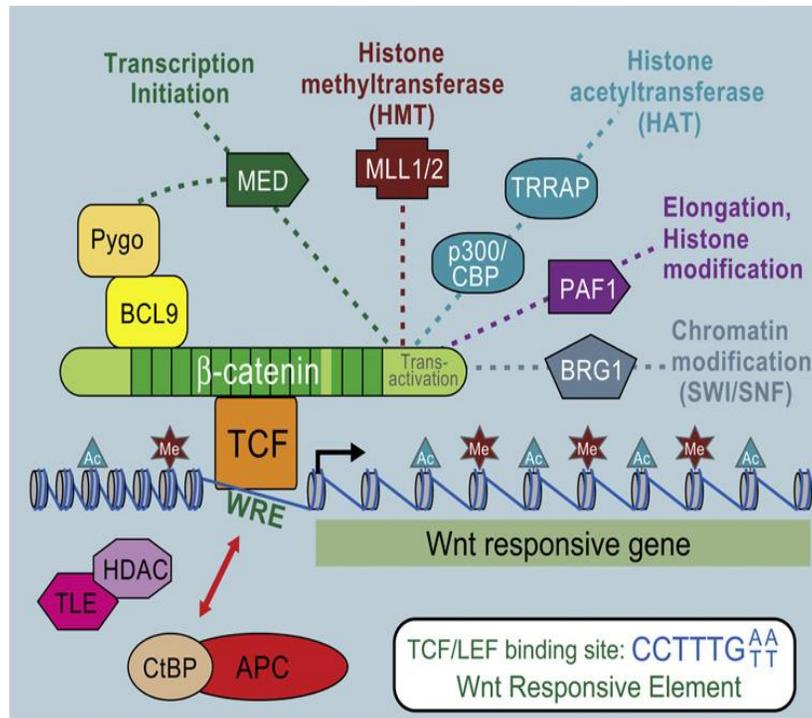


Figura 3. Por simplicidad se ilustran sólo unas proteínas que interaccionan con β -catenina o entre complejos. Permitiendo la transcripción de genes de Wnt. APC promueve el intercambio entre β -catenina/coactivadores con corepresores CtBP, TLE y HDAC de manera cíclica (de doble punta de flecha roja), mientras TCF permanece unida a la WRE. Ac and Me simbolizan modificaciones de las histonas, es decir, la acetilación y metilación, respectivamente. (MacDonald et al., 2009)

interactúan con la porción carboxilo terminal de la β -catenina.

CBP y P300 son co-activadores transcripcionales con pesos moleculares de 265 y 289 kDa, respectivamente. Son reguladores centrales de la expresión genética en células de metazoarios. CBP es abreviatura de CREB Binding Protein y se descubrió asociada al factor transcripcional CREB en respuesta al cAMP (Chrivia et al., 1993). P300 se descubrió asociada a la proteína E1A de adenovirus (Whyte et al., 1989). Son proteínas con un alto porcentaje de homología que comparten dominios de histona acetil transferasa (HAT), tres dominios ricos en cisteína (CH1, CH2 y CH3), y un dominio KIX capaz de interactuar con β -catenina. Por el contrario, un estudio de truncamiento indica que los aminoácidos 1-111 del N-terminal de la CBP y P300, presentan un menor grado de homología. Siendo el fragmento mínimo requerido para la unión a β -catenina en ambas proteínas (Xia, Guo, & Ma, 2011). Posen además un dominio de interacción con el receptor de esteroides (SID) y un bromodominio. Estos dominios tienen funciones en la interacción con proteínas y el bromodominio reconoce los lisinas acetiladas en histonas y otras proteínas. Pueden interactuar con histonas, con la RNA polimerasa II, con factores transcripcionales del

inicio de la transcripción y otras proteínas, que suman en total alrededor de 400 proteínas y pueden acetilar alrededor de 70 blancos. Debido a sus múltiples dominios de interacción con proteínas, tienen una función de andamiaje en la apertura del DNA para la transcripción de potenciadores y genes. La ocupación de potenciadores (enhancers) por CBP y P300 se ha utilizado para la identificación de los mismos (Chrivia et al., 1993). Mutaciones en cualquiera de estas proteínas se han asociado con múltiples enfermedades, indicando que la dosis de estas proteínas es esencial para la diferenciación, crecimiento y homeostasis de las células humanas (Kalkhoven, 2004). Su afinidad por las distintas proteínas y la actividad HAT y FAT (factor acetil transferase, descrito para P300), pueden ser regulados por múltiples sitios de acetilación, sumoilación, ubiquitinación, degradación y fosforilación. Las cinasas Akt y p38 pueden fosforilar a P300, y estas fosforilaciones controlan su afinidad por β -catenina. También su distribución está regulada con precisión (Chen & Li, 2011)(Kalkhoven, 2004)(Chen & Li, 2011; Kalkhoven, 2004). Aunque la ocupación del genoma y varias de las funciones son compartidas por CBP y P300, existen reportes que indican claras diferencias en sus funciones (Kalkhoven, 2004).

1.3.13 Estudios fosfoproteómicos de la asociación de CBP y P300 con β -catenina

Se realizó un estudio empleando el método de purificación de péptidos de fosfato por el TiO₂ (Columna de óxido de titanio para el aislamiento de fosfopéptidos) seguido de análisis de masas LC-MS/MS (Cromatografía Líquida y espectrometría de masa en tandem) y la fragmentación por CID (Collision-Induced Dissociation) que permite asignar de forma inequívoca los sitios de fosforilación de CBP. Se concluyó que el sitio de fosforilación de Ser92 de CBP es crítico para la interacción con β -catenina. La alineación de aminoácidos comparativa de CBP y P300 mostró que el residuo Ser92 de CBP es distintivo y no se encuentra en la región correspondiente de P300. La β -catenina es también una fosfoproteína, sin embargo, es poco probable que la propiedad de unión selectiva se adquiera a través de la fosforilación de β -catenina porque ambos CBP y P300 se unen al mismo dominio (C-terminal) de la proteína. El hecho de que el tratamiento específico del inhibidor PD98059 (que inhibe a MEK1/2), inhibió la interacción de CBP/ β -sugirió que la vía de MEK/ERK participa en la formación de los complejos de CBP/ β -catenina (Xia et al., 2011). Knockout de genes de CBP y P300 en ratones reveló funciones distintas en el

desarrollo de las células T y en el porcentaje de T CD8⁺ que se incrementaron en gran medida en los ratones mutantes de CBP y no se observó crecimiento en mutantes de P300. Tales actividades divergentes pueden ser debido al acoplamiento diferencial con β -catenina. Para detectar la interacción de P300 endógeno con β -catenina, se realizó una serie de ensayos de co-inmunoprecipitación. SB202190 es un inhibidor de p38 MAPK y previene la diferenciación terminal de mioblastos (Kook et al., 2008). En contraste, PD98059 posee una doble función y es un reactivo que inhibe la función de MEK1/2 (MAPK/ERK 1/2), una cinasa río arriba de ERK1/2 y activa la MAPK p38 (Al-Shanti & Stewart, 2008). En conjunto, estos hallazgos indican un papel crítico de p38 MAPK en la fosforilación de la Ser12 de p300 permitiendo la unión P300/ β -catenina que se ve reforzada significativamente a medida que los mioblastos se someten a diferenciación terminal. La fosforilación en Ser12 sólo está presente en P300 con respecto a CBP. El hallazgo, sin duda, abre nuevas perspectivas para un mayor refinamiento de las funciones de P300 y una mejor comprensión del mecanismo molecular de la regulación de la transcripción en el contexto de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina. Estos resultados proporcionan no solo una explicación mecanicista de cómo se regula únicamente la interacción P300/ β -catenina, sino también qué funciones divergentes posee la vía Wnt/ β -catenina (CBP/ β -catenina vs P300/ β -catenina) y que pueda entenderse. Sin embargo, aún es incierto si Ser12 es fosforilada exclusivamente por p38 MAPK. La fosforilación en este sitio puede ser ejecutada por otras proteínas cinasas, por ejemplo PI3K (phosphoinositide 3-cinasa)/AKT, PKC y caseína cinasas (Carlo et al., 2009)(Johnson, Wang, Hardy, Taparowsky, & Konieczny, 1996), se ha informado durante la diferenciación miogénica. (Ma, Guo, Shan, & Xia, 2012)

2. Antecedentes

Nuestro grupo de investigación tiene experiencia previa en el sistema inmune neonatal y hay resultados que anteceden a este proyecto. Estudios mostraron que los linfocitos T CD8 neonatales tienen un transcriptoma particular, con una alta expresión de genes asociados a inflamación y auto-renovación así como una pobre expresión de genes asociados a actividad citotóxica, necesaria para la eliminación de células infectadas. En estudios de transcriptoma de células T CD8⁺ de células de neonatos se encontraron una serie de factores transcripcionales llamados firmas sobre expresados en las células T CD8⁺ neonatales, entre los que destacan los genes de TCF y LEF1, que medían la respuesta a la vía de señalización por wnt/ β -catenina. Se encontró que esta vía está enriquecida en las células neonatales en los análisis epigenéticos de cromatina abierta que se realizaron en las células T CD8⁺ de neonatos y adultos (A. O. Galindo-Albarrán, 2014). La vía de señalización de Wnt/ β -catenina es antagónica a la vía del receptor de células T (TCR) (Driessens et al., 2011) y pudiera ser responsable del alto umbral de activación de las células neonatales y de la expresión particular de genes asociados a un fenotipo inmaduro y auto renovación sin diferenciación, que se observa en los linfocitos T CD8⁺ neonatales (Galindo-Albarrán et al., 2016). Esto pudiera ser responsable de la alta sensibilidad de los neonatos a infecciones virales y bacterianas, sepsis y síndrome inflamatorio estéril, que pueden llegar a la muerte (Ghazal et al 2013, Melvan et al 2010, Piantino 2013, Verboon-Macielek et al 2005). Sin embargo, existen resultados controversiales que indican que la vía de la β -catenina puede también inducir la diferenciación de células T CD8 humanas en células efectoras con mayor capacidad citotóxica, diferenciación en células de memoria y protección a muerte celular (Schenkel, Zloza, Li, Narasipura, & Lena Al-Harhi, 2010)(Zhao et al., 2011). La vía de Wnt/ β -catenina puede inducir una activación diferencial de genes responsivos a la acumulación de β -catenina dependiendo del tipo celular (Lien & Fuchs, 2014). De esta vía se explicó en la sección de introducción y a continuación explicaremos antecedentes de esta vía en artículos científicos.

2.1 Señalización de Wnt en la auto-renovación de células madre hematopoyéticas

Las células madre hematopoyéticas (HSCs) tienen la capacidad de renovarse y dar origen a todos los linajes de células de la sangre; sin embargo, las señales que regulan la auto-renovación del HSC siguen sin estar claras. Reya y colaboradores publicaron el papel de la vía de Wnt en este proceso. La señalización de Wnt puede inducir la proliferación de HSC e inhibir su diferenciación lo que resulta en una auto-renovación funcional. Las HSC transducidas con β -catenina dan lugar a una reconstitución sostenida de los linajes mieloide y linfoide *in vivo* previamente irradiadas, cuando se trasplantan en números limitantes. Encontraron que la señalización de Wnt es necesaria para el crecimiento de las HSC en condiciones normales. Además, la activación de la señalización de Wnt en las HSC induce una mayor expresión de HoxB4 y Notch1, genes previamente implicados en la auto-renovación y otras señales que aumentan la proliferación de HSC incluyendo la vía de Notch y Hedgehog. Concluyeron que la vía de señalización de Wnt es crítica para la homeostasis de las HSC normales *in vitro* e *in vivo* (Reya et al., 2003).

2.2 La vía de señalización de Wnt en la proliferación y diferenciación celular: Papel de dos coactivadores

Teo y Kahn en el 2010 publicaron una revisión centrándose en la comprensión actual de la señalización de Wnt y en concreto en los coactivadores CBP y P300, que forman parte de la red de señalización de proteínas Wnt. La señalización de Wnt mediada por β -catenina conduce a la regulación de la actividad transcripcional de TCF/LEF, que dirige procesos de destino de la célula, como la proliferación y la diferenciación. Los coactivadores transcripcionales CBP y P300 son reguladores claves de la transcripción mediada por la ARN polimerasa II. A pesar de su alto grado de homología y patrones similares de expresión, las proteínas CBP y P300 desempeñan papeles únicos y diferentes en la regulación de genes, en particular en la regulación mediada por β -catenina. Theo y Kahn desarrollaron un modelo que establece que la transcripción mediada por CBP/ β -catenina es crítica en el mantenimiento de células HSC. Mientras que en la transcripción mediada

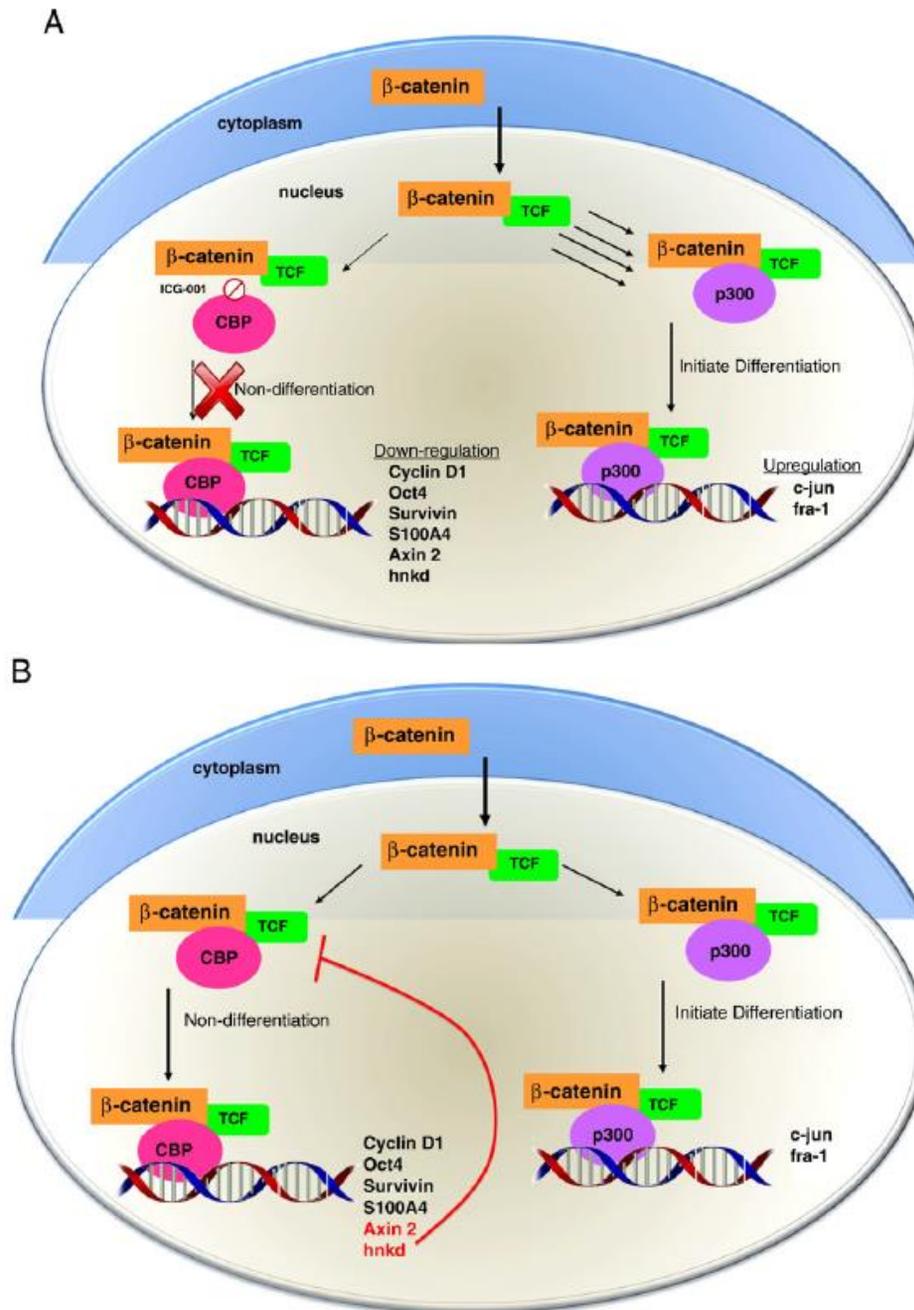


Figura 4. A) Modelo de uso del coactivador. Antagonizar la interacción CBP/ β -catenina conduce a la inhibición de los genes que son críticos para el mantenimiento de células de células madre/progenitoras y la proliferación (brazo izquierdo de la vía). Esto también empuja a la célula utilizar p300 como coactivador. El cambio a la transcripción p300/ β -catenina es el primer paso fundamental para iniciar un programa de diferenciación. **B)** un subconjunto del casete de expresión del gen que está regulado por el brazo CBP/ β -catenina que es crítica para el mantenimiento de la potencia y la proliferación (por ejemplo, Oct4, survivin, etc. Otros genes que están regulados de manera similar por CBP/ β -catenina (por ejemplo hNkd y AXIN2) están involucrados en la retroalimentación negativa de este brazo de la vía, e iniciar la diferenciación a través de un interruptor para el brazo p300/ β -catenina.

P300/ β -catenina representa un paso crítico para iniciar la diferenciación con la concomitante disminución en la proliferación celular. Esto fue posible usando ICG-001 un antagonista selectivo de la interacción CBP/ β -catenina (que se identificó utilizando un enfoque de genómica química). La fosforilación de la Ser89 de P300, por PKC aumenta la afinidad de P300 para la β -catenina tanto *in vitro* como *in vivo*. El bloqueo de la fosforilación de Ser89 de P300, ya sea con inhibidores o por mutagénesis dirigida al sitio (Ser89Ala) reduce la afinidad de la β -catenina por P300. Permitiendo analizar por separado el papel de cada cofactor en la vía, **Figura 4** (Teo & Kahn, 2010).

En otro estudio fueron seleccionadas células esqueléticas de ratón y estudiaron cómo es la miogénesis para mutantes de CBP AT⁻ y P300 AT⁻ (AT sitio de acetiltransferasa). El rol que presentaba en la diferenciación muscular se evaluó midiendo la expresión de los genes MyoD y Myf5, que son genes que codifican para proteínas con un importante papel de diferenciación miogénica). La actividad AT resultó necesaria para la función de P300 pero en caso de CBP no fue relevante durante la miogénesis. En ese informe, se ofrece la primera evidencia *in vivo* del papel que desempeña P300 en la diferenciación celular de la miogénesis esquelética. Células embrionarias de ratón que llevan una mutación monoalélica inactivante de P300 AT, presentan actividad alterada en la miogénesis y en la expresión de MRF (myogenic regulatory factor). En contraste, las células embrionarias con una mutación equivalente en CBP no manifestaron defectos en el músculo. Estos resultados sugieren que la actividad de AT de P300 es distinta a la de CBP, en particular establecen la función esencial de la actividad de P300 AT en la especificación del destino celular miogénico (Roth et al., 2003).

La señalización de β -catenina promueve la auto renovación en una variedad de células madre tisulares, incluidas las células madre neuronales. La inhibición de la vía Wnt/ β -catenina impidieron la diferenciación de las células precursoras neuronales. La presenilina-1 (PS-1) es una proteína politópica compuesta de seis a ocho dominios transmembrana. PS-1, forma parte del "complejo de γ -secretasa" y se requiere para la proteólisis intramembrana tanto de la proteína precursora de amiloide (APP) como de Notch. Además, a través de la interacción con β -catenina, PS-1 se asocia con la modulación de la vía de Wnt/ β -catenina. En su estudio que fue realizado en células PC-12

de diferenciación neuronal que expresan PS-1 y con un mutante para esta misma proteína (L286V) propusieron un modelo

Figura 5 mediante el cual TCF/ β -catenina/CBP media la transcripción para la proliferación de células progenitoras de células madre, mientras que un cambio a TCF/ β -catenina/P300 es fundamental para iniciar un programa de diferenciación y una más limitada capacidad proliferativa.

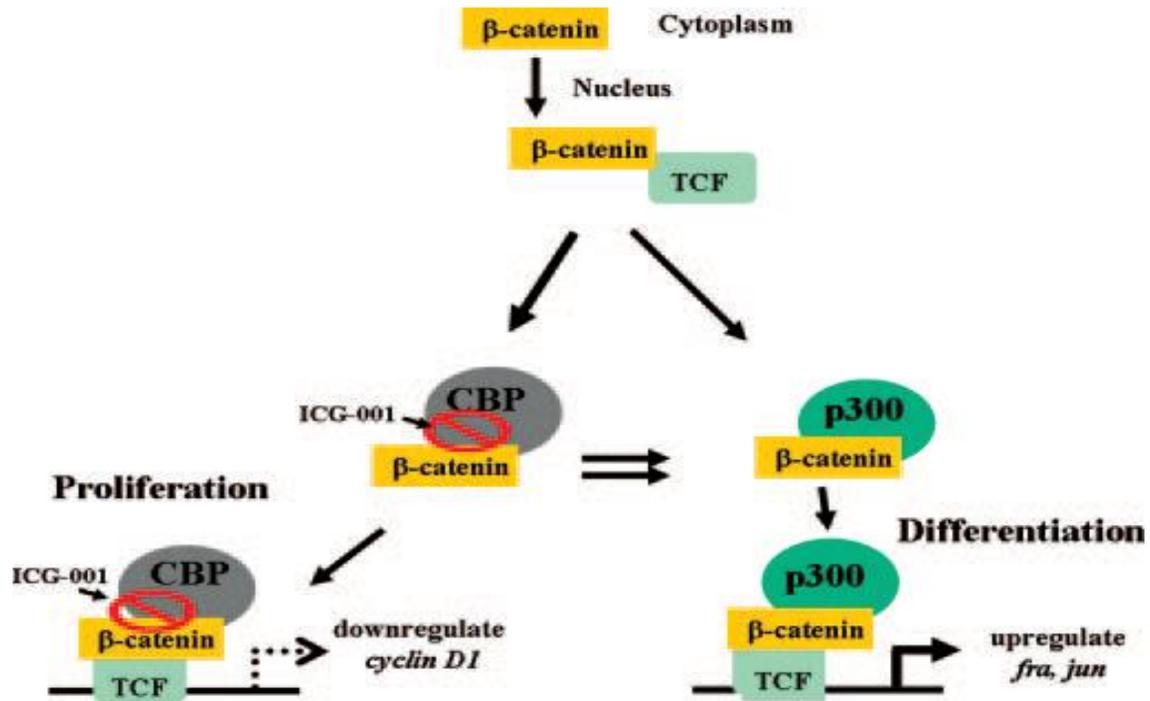


Figura 5. Modelo propuesto del papel de TCF/ β -catenina/CBP media la transcripción de genes de proliferación y TCF/ β -catenina/CBP media la transcripción de genes de diferenciación.

Kawasaki et al. encontraron que P300, pero no CBP, es absolutamente necesario para la diferenciación de F9 inducida por el ácido retinoico (Kawasaki et al., 1998). Publicación que corrobora parte del modelo descrito anteriormente.

En estudios de cáncer colorectal, en los que la vía de Wnt juega un papel importante en la proliferación y malignidad de los tumores, se encontró que CBP promueve la proliferación de células de colon, mientras que p300 promueve su diferenciación (Bordonaro & Lazarova, 2016).

2.2.1 Participación de Wnt en HSCs y en el desarrollo de timocitos

Es bien conocido que la vía de Wnt/ β -catenina tiene un papel regulatorio determinante en el desarrollo de varios tipos celulares y de tejidos. Entre los múltiples procesos que regula esta vía se encuentran la hematopoyesis y la linfopoyesis. Se ha observado que la vía de Wnt/ β -catenina-TCF/LEF está activa en células madre hematopoyéticas (HSCs). En estudios de trasplantes de HSCs a ratones que se les aplicó una dosis de radiación (para inducir un ambiente linfopénico), se observó que la deficiencia de Wnt3A en las HSCs conduce a una disminución severa en su capacidad de auto-renovación y el número de HSCs es cinco veces menor al de ratones trasplantados con células normales (Luis et al., 2009). Adicionalmente, en ensayos in vitro donde se estimularon HSCs utilizando el ligando Wnt3A o utilizando una transfección de β -catenina constitutivamente activa, se observó que el tratamiento aumenta en gran medida la capacidad proliferativa de las células en cultivos de largo plazo. Cuando las células transfectadas se trasplantaron en ratones irradiados, la población de HSCs se reconstituye hasta alcanzar niveles normales y se observó que estas células activan la expresión del gen reportero de GFP bajo un promotor al cual se unen TCF/LEF (Reya et al., 2003). En contraste, cuando se empleó el mismo modelo de ratones para trasplantar HSCs que expresan Axina mediante una construcción retroviral, se observó que disminuye la capacidad de reconstituir la población de HSCs (Scheller et al., 2006).

Sin embargo, existen reportes que sugieren que la vía de Wnt/ β -catenina carece de un papel fundamental durante la hematopoyesis. Un ejemplo de ello son los experimentos realizados por F. Radtke et al. Los autores generaron HSCs γ -catenina^{-/-} y con el gen de β -catenina silenciado, las cuales fueron trasplantadas en ratones letalmente irradiados y observaron que tanto la hematopoyesis como la linfopoyesis ocurren de manera normal en los roedores (Koch et al., 2008). A pesar de lo anterior, en experimentos posteriores donde se utilizó un gen reportero bajo el promotor al cual se unen LEF/TCF en células madre hematopoyéticas, se documentó que aún en ausencia de β - y γ -catenina, LEF y TCF llevan a cabo su actividad transcripcional ya que ocurría la expresión del gen reportero (Jeannet et al., 2008). Estos datos sugieren la participación de proteínas adicionales tipo β -catenina que compensan a las proteínas originales en las HSCs.

Los primeros informes de la importancia de la señalización Wnt en el sistema inmune

surgen a partir de estudios de señalización Wnt en el contexto del desarrollo de las células T en el timo. En los seres humanos y los ratones, la diferenciación de timocitos se produce a través de etapas sucesivas definidas por la expresión de los co-receptores CD4 y CD8. La diferenciación inicia por células CD4⁻CD8⁻ (doble negativas, DN), después células CD4⁺CD8⁺ (doble positivas, DP) y finalmente en las células simple positivas, ya sean CD4⁺CD3⁺ o CD8⁺CD3⁺ (SP). El subconjunto DN puede ser aún más subdividido en cuatro etapas en ratones y seres humanos. Varios estudios han demostrado que la señalización de Wnt es importante en la transición de DN a DP de desarrollo de los timocitos. La expresión de ICAT (inhibitor of β -catenin and TCF-4), que inhibe la señalización de Wnt mediante la prevención de la unión de β -catenina a factores TCF y LEF, bloquea esta transición, pero no afecta etapas posteriores del desarrollo. Del mismo modo el DKK1, inhibidor de Wnt que bloquea la unión de Wnt con el co-receptor LRP requerido, inhibe la diferenciación de timocitos en la etapa de DN de una manera dependiente de la dosis, de tal manera que altos niveles de DKK1 permiten la inhibición del desarrollo de células T en la primera etapa de DN. Varias líneas de evidencia indican que la señalización de Wnt también regula los aspectos de la selección positiva y la selección negativa así como la transición DP a SP, aunque la cascada de la vía canónica de Wnt es menos activa en la señalización en esta etapa del desarrollo. La expresión de CD4 por timocitos DP está regulada en parte por la señalización de β -catenina-TCF. Ratones con deficiencia de TCF1 expresan niveles bajos de CD4 en DP y de células CD4⁺ en SP. Sin embargo, una serie de experimentos mostraron que la sobreexpresión de una β -catenina estable regula la selección positiva de timocitos; generando timocitos CD4⁺ y CD8⁺ SP totalmente seleccionados simultáneamente.

2.3 Influencia de Wnt en linfocitos T maduros

Con el conocimiento de la relación que existe entre la vía de Wnt y los timocitos, surgió la idea de que esta misma vía pudiera estar también involucrada en la regulación de la activación, proliferación o diferenciación de los linfocitos una vez que han completado su maduración y se han diferenciado hacia el linaje T CD4⁺ o T CD8⁺. Desde 1999 ya se tenía conocimiento de que la vía de transducción de señales mediada por Wnt/ β -catenina era completamente funcional en linfocitos T, sin embargo no se conocía con detalle su impacto sobre estas células. Fue hasta el 2006 cuando aumentaron los estudios y experimentos para

investigar acerca de la participación de la vía canónica de Wnt en los linfocitos T. Hasta la fecha, la gran mayoría de estos estudios han generado resultados que indican que la vía de Wnt interviene directamente en los procesos de diferenciación hacia células efectoras y de memoria, así como en el mantenimiento y potenciación de la supervivencia y de las actividades efectoras de linfocitos de memoria y reguladores. Cuando se activa la vía de Wnt/ β -catenina mediante la estimulación de los receptores Fz, o mediante la inhibición de GSK3- β , se observa que ocurre un bloqueo en el desarrollo de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de humano. Este bloqueo está acompañado de una disminución de su capacidad proliferativa, a consecuencia de una baja expresión del receptor de la interleucina pro-proliferativa IL-2 (IL-2R α) (Gattinoni et al., 2010). Adicionalmente, los linfocitos vírgenes presentan un bloqueo parcial en su transición hacia linfocitos efectores, y se disminuye la degranulación y la producción de IFN- γ en respuesta a la activación mediada por el TCR, lo cual altera su funcionalidad (Muralidharan et al., 2011). A pesar de lo anterior, al ser activada la señalización mediada por Wnt, se promueve la generación de células denominadas Tscm CD8⁺ (stem cell-like memory) con capacidades proliferativas, e incluso anti-tumorales, aumentadas en comparación con linfocitos de memoria producidos de la manera convencional (Gattinoni et al., 2010).

Gattinoni en el 2010 encontraron que la inducción de Wnt/ β -catenina usando un inhibidor de la GSK3 β , el TWS119 o mediante el empleo de cloruro de litio se detuvo el desarrollo de células T CD8⁺ en las células efectoras. Mediante el bloqueo de la diferenciación de células T, estimularon las células T CD8⁺ de ratones transgénicos marcadas con CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) en presencia de dosis tituladas de TWS119 y analizaron la expresión de los marcadores de diferenciación CD44 y CD62L. Se sabe que la expresión de CD44 aumenta con la diferenciación de las células T, mientras que CD62L se pierde progresivamente. TWS119 aumentó la frecuencia de células T que retienen la expresión de CD62L en una forma dependiente de la dosis, lo que indica que se inhibió la diferenciación de células T CD8⁺ (Gattinoni et al., 2010).

Driessen en 2011 observó que la β -catenina era constitutivamente degradada en las células T primarias. La introducción de una β -catenina estabilizada, inhibe la activación de células T a través de una afectación en el mecanismo de activación de los linfocitos. Esta afectación es por la fosforilación de LAT defectuoso en la tirosina 136, lo que se asoció con una

defectuosa fosforilación de PLC γ 1 y una baja movilización de calcio. Esto se asoció con la inhibición funcional de la producción de IL2 y diferenciación de las células efectoras. En esta publicación se sugiere que β -catenina es un regulador negativo de la activación de células T periféricas (Driessens et al., 2011).

2.4 MPEC y SLEC

Los linfocitos T CD8⁺ vírgenes al ser activados se diferencian en linfocitos T citotóxicos (CTL), que se encargan de las funciones efectoras de sistema inmune adaptativo y en linfocitos T de memoria. Las células efectoras citotóxicas, migran al lugar donde se encuentra la infección para eliminarla. La interacción inicial con las células presentadoras de antígeno en los órganos linfoides centrales conduce a una diferenciación dirigida a producir un número suficiente de células efectoras para realizar el trabajo sin producir agotamiento clonal. Sólo las células T que reconocen el antígeno específico que reconocen en un contexto de alarma inmunológica pasan por múltiples rondas de replicación para generar enormes cantidades de progenie CTL efectora (Chang et al., 2011).

En el pico de la respuesta primaria al patógeno, la población de células T CD8⁺ inducidas por antígeno es fenotípica y funcionalmente heterogénea, ya que encontramos células precursoras de memoria (MPEC: memory precursor effector cells y las primeras células efectoras que contendrán con el reto antigénico, las llamadas células efectoras de corta vida (SLEC: short-lived effector cells). Estas últimas forman la mayoría de la población, pero mueren en su mayor parte cuando se elimina la infección, mientras que las células precursoras de memoria, sobreviven y contribuyen preferentemente a la población de memoria central. Algunas células SLEC pueden diferenciarse a su vez en memoria efectora, aunque existen varios modelos que explican la secuencia de diferenciación de estas distintas poblaciones (Bevan, 2004)(Stipdonk et al., 2003).

Se ha mostrado que un linfocito CD8⁺ virgen puede diferenciarse en una población diversa de células efectoras y de memoria. Sallusto et al. revelaron la presencia de dos principales subgrupos funcionales dentro de la agrupación de células T de memoria CD45RA⁻ : células de memoria central (T_m), que expresan las moléculas de localización a nodos linfáticos CCR7 y CD62L y tienen funciones efectoras limitadas, y los linfocitos T de memoria efectora (T_{em}), CCR7⁻ CD62L⁻, que preferentemente transitan a tejidos

periféricos y median funciones rápidas efectoras en una segunda exposición al antígeno. Típicamente, los marcadores que diferencian a las células T de memoria de las células vírgenes, son $CD45RO^-CD45RA^+$ para las primeras y $CD45RO^+CD45RA^-$ para las segundas. Sin embargo, una población de células T de memoria son $CD45RO^+CD45RA^+$ se identificó en ratones que expresa altas cantidades de antígeno 1 de células madre (SCA1) y los marcadores de memoria interleucina-2 receptor β (IL-2R β) y quimioquina CXCR3. Estas células se denominaron células Tscm (T Stem cell memory-like) porque se observó que tras transplantarlas eran capaces de sobrevivir y que podían reconstituir la diversidad completa de subconjuntos de células T efectoras y de memoria, manteniendo al mismo tiempo su propia auto-renovación (Y. Zhang, Joe, Hexner, Zhu, & Emerson, 2005). Se sabe que el mantenimiento de la transducción eficiente de la vía canónica de Wnt durante la respuesta inmune primaria preserva la capacidad de las células T CD8 para expandirse a la estimulación secundaria (Boudousquié et al., 2017).

La implicación de la ruta de Wnt- β -catenina en la diferenciación de células T CD8⁺ en MPEC, pero no en células SLEC, se demostró en modelos de ratones adultos *in vivo*. Se mostró claramente que la ruta está activa en células vírgenes, en MPEC y células de memoria, pero se silencia en las células SLEC y efectoras (Boudousquié et al., 2017)(Gattinoni et al., 2010). Además, la activación de la vía canónica de Wnt también induce un fenotipo que se ha denominado "memoria de células madre como (TSCM)". Estas son células T CD8⁺ multi-potentes que se renuevan por sí mismas y que tienen un fenotipo mixto entre la memoria y las células madre, lo que podría ser útil para fines de trasplante de médula ósea y tratamientos para el cáncer mediados por células inmunitarias (Forget et al., 2012)(L Li et al., 2014)(Dormond, Romero, Zhang, & Romero, 2016). El fenotipo TSCM está enriquecido en células neonatales en comparación con las de adultos (Xu et al., 2016).

3. Hipótesis

La vía canónica de wnt/ β -catenina se encontrará más activa en las células neonatales de los linfocitos T CD8⁺ y contendrá complejos proteicos asociados a β -catenina que dan lugar a la expresión de genes que favorecen la proliferación de las células. En cambio en las células de adultos existirán otros complejos proteicos diferentes a los de neonatos asociados a β -catenina permitiendo la expresión de genes asociados a función y diferenciación celular.

4. Objetivo general

Evaluar la composición y posible función de los complejos proteicos asociados con β -catenina en respuesta a las señales del activador de la vía de wnt (wnt3a) en células T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos.

4.1 Objetivos específicos

1. Evaluar la activación a través de wnt3a de la vía canónica de Wnt en las células T CD8⁺ vírgenes de adultos y neonatos humanos.
2. Evaluar los niveles de expresión de β -catenina, CBP y P300 en las células T CD8⁺ de adultos y neonatos por citometría de flujo en condiciones basales y estimuladas.
3. Obtener las proteínas asociadas a β -catenina, e identificar mediante espectrometría de masas la composición de los complejos proteicos asociados a β -catenina en los linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos en condiciones basales y en respuesta a Wnt3a.
4. Evaluar la asociación de CBP y p300 con β -catenina en los linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos en condiciones basales y en respuesta a Wnt3a.
5. Evaluar el reclutamiento de β -catenina a promotores de genes de auto renovación, señalización y diferenciación en los linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos en condiciones basales y en respuesta a wnt3a.

5. Materiales y Métodos

5.1 Desarrollo experimental:

5.1.1 Colecta de las muestras

En el Centro Estatal de Transfusión Sanguínea de Morelos, se recolectaron paquetes de agregados leucocitarios de sangre periférica de individuos adultos sanos. Se obtuvo la sangre de cordón umbilical del Hospital General de Cuernavaca Dr. José G. Parres. Se obtuvo la sangre después del nacimiento y antes de la expulsión de la placenta, para evitar contaminación con la sangre de la madre. Todas las muestras se hicieron bajo consentimiento informado de las madres y sólo se obtuvo sangre de infantes de más de 38 semanas de gestación, de parto natural y apgar arriba de 8. La sangre se procesó el mismo día.

5.1.2 Purificación de linfocitos T CD8⁺

La obtención de las células mononucleares de sangre periférica (CBMC y PBMC), se realizó utilizando la técnica de Ficoll Hypaque, seguida de adherencia a plástico y selección negativa usando el kit de RosetteSep™. El procedimiento fue el siguiente: Se mezclaron 20 mL de sangre con 15 mL de PBS. En un tubo estéril, se colocaron 10 mL de Lymphoprep (Ficoll) y se vertió la sangre manteniendo las fases. Se centrifugó a 1600 rpm, por 30 minutos, sin freno (s/f) a 16 °C. Con este procedimiento los eritrocitos y granulocitos quedan en el fondo del tubo, mientras que las PBMC o CBMC permanecen en la fase intermedia entre el Ficoll y el sobrenadante que contienen las plaquetas y el suero diluido en PBS. Se lavaron las células mononucleares dos veces con PBS. Simultáneamente, de la misma muestra se apartaron 2 mL de la fracción que contiene a los eritrocitos y se colocaron en una caja de cultivo junto con 5 mL de medio RPMI 5% Suero fetal bovino (SFB) para utilizarlos más adelante. Posteriormente, se centrifugaron las células mononucleares a 1400 rpm por 10 minutos a 16 °C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 10 mL de medio RPMI 5% para hacer el conteo de células. Las muestras se llevaron a una concentración de 10×10^6 células/mL y se dejaron en incubación toda la noche a 37 °C

y 5 % de CO₂ en adherencia a plástico en cajas de cultivo con medio RPMI (suplementado con 5% de SFB y 1% de penicilina/estreptomicina. Esto permite eliminar los monocitos, que se adhieren al plástico.

Al día siguiente, se cosecharon las células recuperando el medio y se hizo un lavado con 20 mL de PBS, se centrifugó a 1400 rpm por 10 minutos a 16 °C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 2 mL de medio RPMI 5%. Después, se contaron las células y se agregó el coctel de enriquecimiento de células T CD8⁺ RosetteSep a una concentración de 50 µL/100 x10⁶ células. Al mismo tiempo se agregaron los eritrocitos de la misma muestra aislados del día anterior y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en agitación. El cóctel de enriquecimiento está diseñado para eliminar las células no deseadas por selección negativa mediante complejos tetraméricos de anticuerpos que reconocen a las moléculas CD4, CD16, CD19, CD36, CD56, CD66b, CD123, TCRγ/δ y glicoforina A de los eritrocitos. De esta forma es posible deshacerse de células NK, neutrófilos, macrófagos, linfocitos B, linfocitos T CD4⁺, plaquetas y otras células presentes en la sangre en menor proporción, mediante su asociación con los eritrocitos, que se separan por densidad. Después de la incubación, se agregaron 25 mL de PBS, mientras que en un tubo estéril, se colocaron 10 mL de Lymphoprep y se vertieron las células manteniendo las fases, se centrifugó a 1600 rpm, por 30 minutos, s/f a 16 °C. Las células no deseadas se eliminan junto con los eritrocitos, mientras que los linfocitos T CD8⁺ permanecen en la interface entre el PBS y el Ficoll. Se recuperaron estas células y se les realizó un último lavado con 10 mL de PBS, se centrifugó a 1400 rpm por 10 minutos a 16 °C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 mL de medio RPMI 5%. Finalmente, se hizo el conteo de las células y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂.

Posteriormente se realizó una depleción para eliminar células contaminantes y células de memoria y activadas. Esto con anticuerpos anti-CD45RO, anti-CD44 y anti-B220 (CD45RO: UCHL1; CD44: IM7 and B220: RA3-6B2, Biosciences) acopladas a proteínas A/G de perlas magnéticas (Pierce, 8803, ThermoFischer). La cual por un proceso de separación podemos obtener linfocitos T CD8⁺ vírgenes de adultos y neonatos.

5.1.3 Evaluación de pureza por tinción de marcadores de superficie celular

Se utilizaron 5×10^5 células para la tinción con anticuerpos. A las células se les agregó 1 mL de solución de FACs y se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos. Después se decantó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en seco y se agregaron 20 μ L de anticuerpo α -CD3 (OKT3, 35-0037-T100, Tonbo Biosciences) (dilución 1/400 a partir del patrón de 0.2 μ g/ μ L) acoplado a fluoresceína isotiocianato (FITC) y 20 μ L de anticuerpo α -CD8 (Hit8aOKT8, 50-0089-T100, Tonbo Biosciences) (dilución 1/400 a partir del patrón de 0.2 μ g/ μ L) acoplado a ficoeritrina (PE). Se incubó por 30 minutos a 4 °C en oscuridad. Posteriormente se lavaron las células con disolución FACs y se agregaron 150 μ L de formaldehído (1.5% en PBS) toda la noche para fijarlas. Al día siguiente se agregaron 300 μ L de FacsFlow para la lectura en el citómetro.

5.1.4 Estimulación de linfocitos con Wnt3a

Partiendo de los ensayos de efecto dosis-respuesta y cinética de estimulación, tesis de maestría del Lic. Oscar López Portales, quedaron establecidos los parámetros de estimulación. Los linfocitos T CD8⁺ se dividieron en dos grupos, cada uno con cantidades iguales de células (3×10^6 células en cada grupo como mínimo y un máximo de 10×10^6 células); el primero fue estimulado con 50 ng de proteína humana wnt3a y el segundo fue el grupo control de células no estimuladas. El tiempo de estimulación fue de 12 horas, incubando las células en medio RPMI 5 % SFB a 37 °C y 5 % de CO₂. Pasado el tiempo de estimulación, se recuperaron y transfirieron las células a un tubo eppendorf, se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante, se resuspendieron las células en los volúmenes adecuados que se emplearon para todos los experimentos descritos posteriormente.

5.1.5 Evaluación de las proteínas β -catenina, CBP y P300 por tinción intracelular con metanol

Se utilizaron 1×10^6 células para la tinción con anticuerpos. Se agregó directamente a las células formaldehído (1.5% de concentración final) para fijarlas y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se realizó un lavado agregando 1 mL de disolución FACs y se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos a 4°C. Se decantó el

sobrenadante y se resuspendió la pastilla en seco, se les agregó a las células 1 mL de MeOH 100% frío y se incubaron a 4 °C por 10 minutos. Nuevamente se lavaron las células y se les agregó 20 µL de suero inactivado de sangre de adulto por 10 minutos para bloquear los receptores Fc de las células y evitar un reconocimiento inespecífico del anticuerpo. Posteriormente se añadieron 50 µL de anticuerpo primario α - β -catenina (E-5, sc-7963, Santa Cruz Biotechnology) (dilución 1/300), α -CBP (C-1, sc-7300, Santa Cruz Biotechnology) (dilución 1/300) y α -P300 (C-20, sc-585, Santa Cruz Biotechnology) (dilución 1/300) y se incubó por 30 minutos a 4 °C. Se realizaron dos lavados con disolución FACs para después poder agregar 50 µL de anticuerpo secundario: α -IgG de ratón (821201240, GTX26724, GeneTex) (dilución 1/500) acoplado a fluoresceína isotiocianato (FITC) para los anticuerpos primarios β -catenina y CBP; α -IgG de conejo (E01689-1633, 12-4739-81, E-bioscience) (dilución 1/200) acoplado a Ficoeritina (PE) para el anticuerpo P300. Se dejó incubar por 30 minutos a 4 °C y oscuridad. Finalmente se lavaron las células dos veces con FACs y se dejaron en un volumen final de 400 µL de FacsFlow para la lectura en el citómetro.

5.1.6 Citometría de flujo

El análisis por citometría se realizó en el citómetro FACS Calibur (BD). Se utilizó el programa CellQuest 3.01 para la adquisición de datos y para su análisis se usó el programa FlowJo 7.6.

5.1.7 Lisis celular

A partir de 5×10^6 a 10×10^6 de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de células de adultos y células de neonatos se inicia la lisis celular. Se con 1 mL de PBS y se centrifugaron a 2500-3000 rpm, 5 min a 4 °C. Después de decantar todo el sobrenadante y re-suspender en seco el botón celular, se adicionaron 200 µL de la disolución hipotónica no desnaturalizante (Tris 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 137 mM, Glicerol 10 % y NP-40 o Tritón X-100 1%) y 2 µL de inhibidor de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail for use with mammalian cell and tissue extracts, SIGMA-ALDRICH®). Se vortexearon las células 10s a velocidad 5 y se incubaron en hielo durante 30 min, vortexeando 10 segundos de velocidad máxima cada 10 min. Al finalizar el tiempo de incubación, se vortexeó al máximo de velocidad durante

10 segundos y se centrifugó la suspensión a 16 000 x g durante 5 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C.

5.1.8 Inmunoprecipitación de β -catenina, CBP y P300

El proceso de inmunoprecipitación se inició con el prelavado de 5 μ L de perlas magnéticas (Pierce, 8803, ThermoFisher) a una concentración de 10 mg/mL de concentración que se incuban desde 2 h hasta toda la noche a 4 °C en agitación moderada con los lisados celulares. Se recuperó el sobrenadante, y se centrifugó, eliminando el sedimento para eliminar aquellas proteínas que se unieron a las perlas de manera inespecífica. Al sobrenadante se adicionan los anticuerpos β -catenina, CBP o P300; 2 μ g/ 10×10^6 células, en dependencia de la proteína que se desea inmunoprecipitar. Se incubó desde 2 h hasta toda la noche a 4 °C en agitación moderada. Se adicionaron 10 μ L perlas 10 mg/mL y se incubaron toda la noche a 4 °C en agitación moderada. Centrifugamos, guardamos sobrenadante y las proteínas unidas a las perlas se lavaron 3 veces con PBS y se utilizaron para los experimentos posteriores.

5.1.9 Electroforesis y transferencia de proteínas para inmunoblots

Alicuotas de 20 μ g de proteínas fueron desnaturalizadas hirviéndolas en disolución de carga (SDS 12 %, Tris base 0.6 M pH 6.8, Azul de bromo fenol 1.2 μ g/mL y β -mercaptoetanol 5 %) y separadas mediante electroforesis de geles de poliacrilamida-SDS al 12 % en Tampón-Tris Glicina. La electroforesis se resolvió a 60 V durante 1:30 h con el sistema “mini-protean” de BioRad. Finalizada la electroforesis se equilibraron los geles para su posterior transferencia a una membrana de PVDF, mediante transferencia húmeda mediante el sistema mini-tranblot de BioRad en tampón de transferencia Tris-Glicina-Metanol (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 40 % Metanol y 0.1% SDS). La transferencia se realizó a 400 mA a temperatura ambiente durante 4 horas.

5.1.10 Inmunodetección

Para la inmunodetección se bloquearon las membranas en leche sin grasa (5 % de leche Svelty[®], 0.05 % de Tween 20 en TBS pH 7.6). Se incubaron con uno de los siguientes anticuerpos primarios 1:1000 en TBST: anti- β -catenina (E-5), anti-CBP (C-1), anti-P300

(C-20) y anti- β -actina (C-11), (sc-7963, E1713; sc-7300, C130; sc-585, E150; sc-1615-R, D2905; Santa Cruz Biotechnology), durante dos horas a temperatura ambiente. Luego de realizar los lavados para eliminar pegado inespecífico, se incubaron con anticuerpos secundarios 1:5000 en TBST, ya sea anti-rabbit IgG-HRP 1:5000 (L0204, sc-2301, Santa Cruz Biotechnology) o anti-mouse IgG-HRP (D080, sc-2302, Santa Cruz Biotechnology) en dependencia del origen del anticuerpo primario. La detección se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia *Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate* (PE191121, 32132, Pierce® ECL Plus) y la impresión se realizó en film fotográfico *Medical X-ray General Purpose Blue* (825 024, Ref 604 0331, Kodak).

5.1.11 Espectrometría de masas

Para la identificación de las proteínas de interés, las bandas se extrajeron manualmente utilizando un bisturí de los geles unidimensional de las electroforesis de gradiente 4-13 % de Tricine y teñidos con azul de coomassie. Las bandas se lavaron dos veces con agua omnisol y otros dos lavados con una mezcla 1:1 (v/v) de NH_4HCO_3 /acetonitrilo (CH_3CN). Finalizamos este paso agregando acetonitrilo 100 % y removiendo todo el líquido secado al vacío. Las muestras se redujeron con ditiotreitól ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$) en bicarbonato amónico (NH_4HCO_3) y posteriormente fueron alquiladas con iodoacetamida ($\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$), un inhibidor irreversible de todas las cisteína-peptidasas (mediante el mecanismo de alquilación de los residuos catalíticos de la cisteína), en bicarbonato amónico incubando 30 min en oscuridad. Finalmente, las muestras fueron digeridas con 12.5 ng/ μL de tripsina (Promega®) en 25 mM de bicarbonato de amonio (pH 8.5) a 37 °C durante toda la noche. La tripsina utilizada es una enzima peptidasa de origen porcino, modificada mediante metilación, que hidroliza específicamente los enlaces peptídicos del extremo carboxilo de los residuos lisina (Lys) y arginina (Arg). Su actividad máxima se establece a un pH entre 7 y 9 y se inactiva de forma reversible a un pH de 4. Tras la digestión, los péptidos se extrajeron del gel mediante una solución de ácido fórmico (CH_2O_2) al 5% y acetonitrilo 50% y 100%. Los extractos se secaron al vacío. Se le agregaron 6 μL de ácido fórmico al 0.1 % para la corrida en la trampa iónica.

Los péptidos se analizaron por espectrometría de masas como se describe (García Montes de Oca, LY Cabellos, GI Picón, Chagoya-López, A González, de la Vara L Delgado,

Buenrostro NL Chirino-López, & Gómez-Lojero, C Gutiérrez-Cirlos, 2016). Los péptidos se separaron en un sistema nanoflow LC de nanoAcquity (Waters Corp. Milford, MA, EE.UU.). Primero se atraparón en una precolumna (Symmetry® C18.5 μm , 180 μm x 20 mm, Waters) y luego se separaron en una columna UPLC capilar de 10 cm (tamaño de partícula BEH-C18 de 1.1 μm de 100 μm de ID) (Ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo) en el disolvente a (0.1% de ácido fórmico en agua) durante 30 minutos, 50-85 % de B (1 min), 85 % B (7 min) y 3 % B (22 min). Los péptidos separados se sometieron a electronebulización directa en un espectrómetro de masas LTQ Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania), equipado con una fuente de iones de nanoelectrificación y controlado por el software Xcalibur 2.1. Este espectrómetro se operó en modo de adquisición dependiente de los datos, alternando automáticamente un espectro de exploración completa (m/z 400-2000) con un espectro de disociación inducido por colisión (CID) de los iones peptídicos más abundantes. Los datos fueron analizados usando una maquinaria de búsqueda de X!Tandem en la plataforma de Trans Proteome Pipeline (Deutsch et al., 2011) y los resultados fueron validados con los programas PeptideProphet y ProteinProphet. Los espectros de fragmentación se compararon con dos bases de datos *Homo sapiens* Refseq que se obtuvieron de NCBI: con secuencias de proteínas relacionadas con proteínas implicadas en la vía de señalización de Wnt y linfocitos T. Se utilizaron los siguientes parámetros de búsqueda: modificaciones constantes, C carbamidometilado, modificaciones variables y M metionina oxidado. La tolerancia de masa iónica fueron 4 Da para los iones precursores y 2 Da para los productos de fragmentación. Se consideraron positivamente identificadas proteínas con una probabilidad de ProteinProphet > 0.95 y al menos cuatro péptidos únicos identificados correspondiente a la proteína.

5.1.12 Diseño de oligos

Se diseñaron 16 pares de oligos (CCND1, BIRC5, POU5F1, S100A4, cJUN, FRA1, FOS, AXIN2, GZMB, PRDM1, NKD1, SFRP1, MAP3K7, WNT11, AXIN1, PSEN1) **Anexo 1**. Once oligos se diseñaron para obtener amplificación en regiones promotoras de genes de interés, con motivos de unión a TCF/LEF, los factores transcripcionales que se asocian con β -catenina y median la respuesta a la vía canónica de wnt. Esto se hizo primero descargando la secuencia en formato FASTA de la región promotora, de la base de datos “Eukaryotic

Promoter Database” (EPD; <http://epd.vital-it.ch/>) desde la posición -100 a 100 de Humano. Posteriormente con la herramienta “MatInspector”²⁷ de www.genomatix.de, a través de una biblioteca de matrices de sitios de unión a factores transcripcionales para localizar coincidencias en las secuencias de DNA, se buscaron sitios de unión para los factores transcripcionales TCF-1/LEF-1. Se seleccionaron regiones con un valor de coincidencia de 0.95. Los resultados arrojados nos mostraron la posición del motivo de unión en nuestra secuencia. Tomamos 150 pb río arriba y río debajo de la posición del motivo de unión. Con la secuencia seleccionada procedimos a hacer el diseño de los oligos mediante la herramienta de la base de datos de NCBI “Primer-Blast” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)²⁶, como parámetros para generar los oligos, especificamos que nos arrojara 10 oligos con un producto PCR de entre 100-300 pb, una T_m mínima de 60 y máxima de 61, y que se basara en el Genoma Homo sapiens (taxid: 9606). Para seleccionar los oligos, elegimos el par que tuviese un T_m igual o con diferencia de 0.5, no tuviese valores altos de auto complementariedad, y amplificara un producto específico. Cada oligo seleccionado se puso a prueba mediante MFE-primer 3.0 (<http://mfeprimer.igenetech.com>) para evaluar la generación de dímeros y “hairpins”, así como confirmar el producto del amplicón (Qu & Zhang, 2015)(Qu et al., 2012). Los restantes 12 pares de oligos, fueron diseñados para amplificar en regiones correspondientes al RNA mensajero, para medir expresión genética de genes de interés. Se diseñaron con Primer-Blast. Todos los oligos y se mandaron a sintetizar con Sigma-Aldrich.

5.1.13 Inmunoprecipitación de cromatina

Se lavaron las células dos veces PBS y se resuspendieron en 1 mL de PBS. Se añadieron 100 µL de buffer de entrecruzamiento, y se dejaron incubando en el rotador a temperatura ambiente durante 20 min. Pasado este tiempo se añadieron 220 µL de glicina 1.25 M, y se dejaron en el rotador durante 5 min para detener el entrecruzamiento. Se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. Posteriormente se hicieron dos lavados con PBS frío, centrifugando a 3500 rpm por 5 min. En el segundo lavado, resuspendimos el sedimento en seco y añadimos 1 µL de coctél inhibidor de proteasas (P8340-1ML; Protease Inhibitor Cocktail; Lot #095M4022V; SIGMA). Resuspendimos en 1 mL de buffer de lisis 1 e incubamos 1 h en rotación. Terminada la incubación se centrifugó a 3500 rpm por 5 min, se decantó, se

resuspendió en seco y se añadieron 1.5 μ L de coctel inhibidor de proteasas. Se resuspendió todo en 1.5 mL de buffer de lisis 2, incubando 30 min en rotación a 4°C. Se volvió a centrifugar a 3500 rpm durante 5 min, se resuspendió en seco y se añadieron 1 μ L de coctel inhibidor de proteasas junto con 1.5 mL de buffer de lisis 3, se dejó incubando durante 1 h en rotación a 4°C. Pasada la incubación se procedió a sonicar durante 20 min con pulsos de 10 segundos y pausas de 10 segundos a 60% de amplitud (todo se realizó en hielo con etanol). A la cromatina sonicada se le añadieron 150 μ L de Tritón X-100, y se centrifugó a 13500 rpm por 10 min. Nos quedamos con el sobrenadante y desechamos el sedimento. A 250 μ L de cromatina le añadimos 170 μ L de buffer de elución (preparar en fresco) y lo dejamos incubar toda la noche a 65 °C, para Input (cromatina total no inmunoprecipitada) y confirmar la sonicación. El resto lo guardamos a -80 °C.

La fracción input al día siguiente se le realizaron incubaciones con RNAsa A (0.2 mg/mL concentración final) y proteinasa K (0.2 mg/mL concentración final) a 37°C durante 1h. Después de este procedimiento se utilizó fenol: cloroformo: isoamilalcohol (25:24:1; pH 8) para tener una muestra enriquecida en cromatina, la cual se purificó utilizando las columnas y el kit de purificación Expin PCR SV. El DNA obtenido se empleó posteriormente en ensayos de electroforesis en gel de agarosa al 1%, para verificar la sonicación y en ensayos de PCR para obtener las curvas estándar de los oligos diseñados para ChIP-PCR.

Posteriormente se prepararon los anticuerpos para la inmunoprecipitación de la cromatina (la porción almacenada a -80°C). Para cada muestra se incubaron con 15 μ L de Anticuerpo anti- β -catenina que fueron acoplados previamente a 7 μ L de perlas magnéticas (Protein A/G magnetic beads; Pierce® Protein A/G Magnetic). Se hicieron 3 lavados con FACs en gradilla magnética a las perlas previo a agregar el anticuerpo, durante una incubación de 12 h en rotación a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, se hicieron 3 lavados con FACs a las perlas acopladas al anticuerpo en la gradilla magnética, posterior a esto, la cromatina se descongeló y se le añadió 1 μ L de coctel inhibidor de proteasas. Enseguida añadimos la cromatina a las perlas acopladas al anticuerpo y se dejó en incubación durante 12 h en rotación a 4°C. Terminada la incubación, la cromatina se colocó durante 3 min en la gradilla magnética, y se le realizaron los siguientes lavados por 5 min en una rueda de rotación a temperatura ambiente: 1 lavado con 400 μ L ChIP de wash buffer, seguido de 2 lavados con

400 μ L de ChIP wash 2 y finalmente 2 lavados con 400 μ L de ChIP wash 3 (entre cada paso se centrifugó, se colocó la muestra en la gradilla magnética por 1 min y se le retiró el sobrenadante). Una vez que se removió el último buffer de lavado, agregamos 150 μ L de buffer de elución. Incubamos durante 20 min en rotación a temperatura ambiente. Centrifugamos las perlas y las colocamos en la gradilla magnética durante 1 min, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL, se volvió a repetir la adición de buffer de elución a las perlas, con la misma cantidad y las mismas condiciones de incubación, y el sobrenadante obtenido se juntó con el que se transfirió al tubo eppendorf de 1.5 mL. Al sobrenadante acumulado se le añadieron 12 μ L de NaCl 5M, 3 μ L de proteinasa K y 3 μ L de RNAsa. Todo se dejó incubando a 50°C durante 12 horas. Finalmente concluida la incubación se procedió a extraer DNA mediante las columnas y el protocolo de Expin™ PCR SV. El DNA obtenido se amplificó por qPCR (ChIP-PCR).

5.1.14 PCR en tiempo real

Se llevó a cabo en el termociclador StepOne (Applied Biosystems) del Laboratorio de Inmunología Celular, utilizando el kit de Maxima SYBR Green/ROX (2X). Las condiciones de la reacción establecidas en el termociclador fueron las siguientes: 50°C por dos minutos, seguido de 95°C por diez minutos, seguido de 40 ciclos: 95°C diez segundos y 60°C un minuto. Para las curvas estándar de cada par de oligos del **Anexo 1** (Secuencia de los oligos diseñados para los ensayos con cDNA) se realizaron diluciones seriales 1:2 de cDNA empleando cuatro puntos por triplicado; y para cada par de oligos de la **Anexo 1** (Secuencia de los oligos diseñados para los ensayos con gDNA) se hicieron diluciones seriales 1:3 de DNA empleando cuatro puntos por triplicado. Esto permitió generar las ecuaciones de la recta que describen la amplificación y la eficiencia de la reacción de cada par de oligos. Para cada reacción de PCR, se utilizaron tiras de tubos grado óptico para PCR. En cada pozo se colocaron 3.5 μ L de SYBR, 1.25 μ L de mezcla de oligos sentido y antisentido (300 nM concentración final), el equivalente en volumen de 20 ng de cDNA, o bien 21 ng de gDNA, y agua libre de nucleasas c.b.p. 7.5 μ L, a excepción de aquellos pozos que se usaron para el control negativo (NTC) en donde se agregó agua en lugar de DNA. Para los ensayos de transcripción se empleó 1ng de cDNA de cada muestra por duplicado. El valor de la amplificación obtenido para cada gen se introdujo en la ecuación de la recta

correspondiente y se normalizó con respecto a los valores obtenidos del gen GAPDH para tener como resultado un valor de expresión relativa del gen comparado entre las muestras estimuladas y las muestras control. En los ensayos de ChIP-PCR se empleó 0.5ng de DNA de cada muestra por duplicado. El valor de la amplificación obtenido para cada gen en las muestras de inmunoprecipitación se introdujo en la ecuación de la recta correspondiente y se normalizó con respecto a los valores obtenidos en las muestras input para tener como resultado un valor de enriquecimiento de la proteína β -catenina en el promotor del gen.

5.1.15 Análisis estadístico

Se empleó la prueba no paramétrica pareada Wilcoxon en el programa GraphPad Prism 5 para analizar las diferencias entre las poblaciones basales y estimuladas de adultos y neonatos. Empleamos la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney no pareada para analizar las diferencias entre adultos y neonatos bajo condiciones basales y estimuladas. La generación de las gráficas de expresión de β -catenina, CBP y P300 se generaron en el programa GraphPad Prism 5.

5.2 Equipos, marca y modelo

Agitador Enviro-Genie®; model S1-1200

Balanza analítica Denver Instrument Company; model TR-104

Balanza de doble patillo DOUBLE BEAM BALANCE; MB-2000

Baño Seco felisa® modelo FE-403

Cámara de electroforesis Biorad, Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell; 170-3930

Campana de extracción NUAIRE; Class II Type 2

Centrifuga tubos eppendorf 1.5 mL Sigma; model 1-15

Centrifuga tubos falcon 50 mL BECKMAN COULTER™; Allegra™X-22R; P/N 392252 5X4250

Centrifuga tubos PCR BECKMAN COULTER™; Microfuge®R; model TR-104

Citómetro de flujo BD FACSCalibur™

Espectrómetro de masas Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania; LTQ Velos

Fluorómetro Qubit® 2.0; Invitrogen; model Q32866

Incubadora para células BINDER

Parrilla eléctrica CORNING Stirrer/Hot Plate; Model PC-420

PH meter pH 211 Microporcessor pH Meter; HANNA instruments

Rotador IKA® Loopster digital

Sonicador SONICS Vibra Cell™; model VCX130

Termociclador Applied Biosystems; StepOne Real-Time PCR System

5.3 Reactivos con especificaciones (marca, modelo y lote)

Anti-Human CBP (C-1) Mouse monoclonal IgG; Lot# C130; Santa Cruz Biotechnology

Anti-Human CD11b Clone: ICRF44; TONBO biosciences

Anti-Human CD3 FITC Clone: OKT3; TONBO biosciences

Anti-Human CD45RO Clone: UCHL1; TONBO biosciences

Anti-Human CD45RO FITC Clone: UCHL1; TONBO biosciences

Anti-Human CD8 PE Anti-Human CD8a FITC; clone: Hit8a; TONBO biosciences

Anti-Human p300 (C-20) Rabbit polyclonal IgG; Lot#E150; Santa Cruz Biotechnology

Anti-Human β -catenina (E-5) Mouse monoclonal IgG; Lot#E1713; Santa Cruz Biotechnology

Anti-Human/Monckey CD45R (B220) Clone: RA3-6B2; TONBO biosciences

Anti-Human/mouse CD44 Clone: IM7; TONBO biosciences

Anti-mouse IgG-HRP D080, sc-2302; Santa Cruz Biotechnology

Anti-rabbit IgG-HRP L0204, sc-2301; Santa Cruz Biotechnology

Anti- β -Actin (C-11) Rabbit polyclonal IgG; Lot# D2905; sc-1615-R, Santa Cruz Biotechnology

Cocktail Inhibidor de proteasas P8340-1ML; LOT 095M4022V; SIGMA-ALDRICH®

F(ab')₂-Donkey anti-Rabbit IgG Secondary Antibody, PE E01689-1633, 12-4739-81; eBioscience™.

Fenol:cloroformo:isoamilalcohol Sigma-Aldrich

Film fotográfico Medical X-ray General Purpose Blue 825 024, Ref 604 0331, Kodak

Human recombinant Wnt3a rhWnt3A 5036-WN; 200 µg/mL; RD Systems

Kit Expin PCR SV GeneAll

Kit Qubit dsDNA HS; Invitrogen

Kit Qubit RNA HS Invitrogen

Kit Revert-Aid reverse transcriptase Thermo Scientific

L-Glutamina 100X

Lymphoprep™ (Ficoll) LOT 12IFS11

Máxima SYBR Green / Rox Qpcr Master Mix 2X Thermo Scientific

Medio RPMI Gibco

Mouse IgG antibody GeneTex; GTX26724, 821201240

Oligos Sigma-Aldrich

Penicilina-Estraptomicina GIBCO 10000 unidades/mL

Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate PE191121, 32132, Pierce® ECL Plus

Protein A/G magnetic beads Pierce® Protein A/G Magnetic

Proteinasa K Proteinase K from Tritirachium album; P2308-25MG; LOT SLBQ8805V; SIGMA-ALDRICH

Ribonucleasa A Ribonuclease A from bovine pancreas; R6513-10MG; LOT SLBR3419V; SIGMA

RosetteSep™ Cat# 15023C.2; STEM CELL Technology

Suero Fetal Bovino 100X Inactivado, REF. 16000-044; GIBCO

TRIzol® Reagent REF 15596018; LOT 117306; ambion®

5.4 Disoluciones y composición

Buffer de elución SDS 10%; NaHCO₃ 1M; H₂O miliQ

Buffer de entrecruzamiento Formaldehido 11%; NaCl 100mM; EGTA 0.5 mM; H₂O miliQ; EDTA 0.001M; HEPES 50mM

Buffer de lisis 1 HEPES 50mM; NaCl 140mM; EDTA 1mM; Glicerol 10%; NP-40 0.75%; TritónX-100 0.25%; H₂O miliQ

Buffer de lisis 2 NaCl 200mM; EDTA 1mM; EGTA 0.5Mm; Tris 10Mm; H₂O miliQ

Buffer de lisis 3 EDTA 0.001mM, EGTA 0.0005M; Tris 10mM; NaCl 100mM; Na-

Deoxicolato 0.7%; H2O miliQ

ChIP wash 1 EDTA 2 mM; Tris 20mM; Triton X-100 1%; SDS 0.1%; NaCl 150 mM;
H2O miliQ

ChIP wash 2 EDTA 2 mM; Tris 20mM; Triton X-100 1%; SDS 0.1%; NaCl 500 mM;
H2O miliQ

ChIP wash 3 EDTA 1mM; Tris 10mM; H2O miliQ

Disolución de Acrilamida/Bis 30% de Acrilamida y 0.8% de Bis-acrilamida. Proteger de la luz

Disolución de carga SDS 12 %, Tris base 0.6 M pH 6.8, Azul de bromofenol 1.2 µg/mL y β-mercaptoetanol 5 %

Disolución hipotónica no desnaturizante Tris 20 mM, EDTA 2 mM, NaCl 137 mM, Glicerol 10 % y NP-40 o Tritón X-100 1%

FACs PBS; 2% SBF; NaN₃ 0.01M

FacsFlow NaCl 0.7M; KH₂PO₄ 0.009 M, NaHPO₄ 0.8M; KCl 0.2M; EDTA 0.006M; LiCl 0.05M

Gel concentrador 4X (Upper) Tris 0.5M a pH=6.8

Gel separador 4X (Lower) Tris 1.5 M a pH=8.8

Leche 5% TBS-T, pH =7.6

PBS NaCl 13.7M; KCl 2.7M; Na₂HPO₄ 1.8M

Running buffer 1X 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS

SDS 10 %

TBS-T 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH=7.6-7.7

5.5 Programas

CellQuest 3.01

Cytoscape 3.5.1

DAVID Bioinformatics Resources 6.8

FlowJo 7.6.

GraphPad Prism 5

ImageJ®

Matinspector

MFE-primer 3.0

PeptideProphet

Primer-Blast

ProteinProphet

STRING 10.5

Trans Proteome Pipeline

Xcalibur 2.1

6. Resultados

6.1 Purificación de Linfocitos T CD8⁺ vírgenes

6.1.1 Purificación de linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos

Para todos los ensayos realizados de este proyecto se utilizaron muestras de sangre tanto de adultos como de neonatos. Cada muestra contenía entre 40-50 mL de concentrados leucocitarios por muestras de adultos (provenientes de 500 ml de sangre) o de sangre de cordón umbilical, obtenida después del nacimiento del neonato y antes de la expulsión de la placenta). Mediante el protocolo de purificación con el kit de RosetteSep, indicado en la sección de *Materiales y métodos*, se obtuvieron rendimientos de 12 a 30 millones de linfocitos T CD8⁺ totales. Para el análisis comparativo de estas poblaciones de adultos y neonatos se utilizaron células vírgenes, que son negativas a CD45RO (células de memoria). Empleando depleciones con anticuerpos CD45RO y CD44⁺ para los linfocitos de adultos totales, nos quedamos con rendimientos de 8 a 12 millones de linfocitos vírgenes de adulto y de 6 a 10 millones de linfocitos vírgenes de neonatos. Después de obtener estas células, se apartó una fracción de éstas para llevar a cabo la tinción de marcadores de superficie y realizar el análisis de pureza por citometría de flujo. Se obtuvieron purezas de linfocitos T CD8⁺ superiores a 94% para los marcadores CD3⁺ CD8⁺ **Figura 6a**. En la figura la pureza se puede apreciar como la selección negativa elimina a las células CD45RO^{hi} en las poblaciones de células vírgenes de adultos **Figura 6b**, mientras que las células de neonatos son prácticamente negativas a CD45RO.

6.2 Evaluación de β -catenina, CBP y P300 en linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos

Para estimular la vía canónica de wnt, dependiente de β -catenina, usamos el activador fisiológico Wnt3a como se describe en *Materiales y Métodos*. Partiendo de linfocitos T CD8⁺ de adultos en condiciones basales y de estimulación con Wnt3a, evaluamos por citometría de flujo el cambio de expresión de β -catenina en adultos y neonatos con tres réplicas experimentales como mínimo **Figura 7A**.

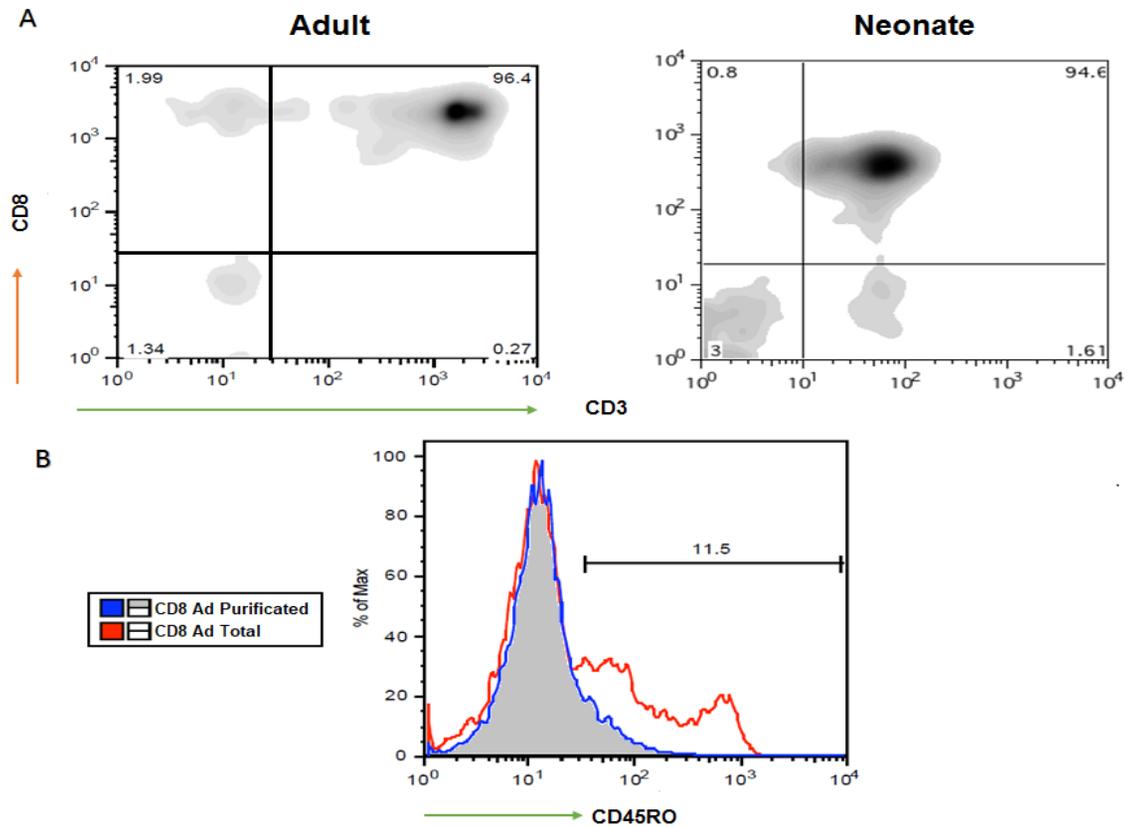


Figura 6. A) Muestras representativas de la pureza de linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos. Se muestran los gráficos de puntos (dot plot) de las poblaciones en cuanto a tamaño y complejidad de las células. En el eje horizontal se muestra la tinción para CD3 FITC (FL1) y en el eje vertical se muestra la tinción para CD8 PE (FL2). El porcentaje mostrado corresponde a la cantidad de células presentes en cada cuadrante pero enfatizamos en el cuadrante superior derecho (dobles positivas). **B)** Se muestra una representación de un histograma de tinción para CD45RO acoplado a FITC, en células de adulto depletadas de estas.

En el histograma de adulto no observamos diferencia en la acumulación de β -catenina después de la estimulación, como se esperaba, en las poblaciones celulares. Analizamos los valores de intensidad media de fluorescencia (MFI siglas en inglés) que representa la media geométrica de la señal de fluorescencia de las células positivas a la β -catenina. La MFI funciona como parámetro para analizar la intensidad de la señal de fluorescencia que se observa entre las poblaciones de células β -catenina positivas en un mismo experimento. Podemos concluir al analizar la gráfica de MFI que no hubo diferencias significativas al estimular con wnt3a ni en los adultos $p=0.403$ ni en los neonatos $p=0.156$. Sin embargo hay una tendencia al aumento en las células de neonatos al estimularlas. Los niveles de acumulación de β -catenina son mayores en las células de neonatos con respecto a las de adultos con un $p=0.004$ para condiciones basales. En condiciones estimuladas de neonatos

con respecto a las de adultos estimuladas también son mayores $p=0.004$. La falta de diferencia en las evaluaciones de β -catenina por citometría de flujo, es que parte de esta proteína está asociada a proteínas de membrana y no está sujeta al complejo de degradación.

Con las mismas condiciones experimentales establecidas previamente en la evaluación de la acumulación de β -catenina en los linfocitos T $CD8^+$ de adultos y neonatos en condiciones basales y de estimulación con wnt3a, medimos los niveles de CBP **Figura 7B**. En el histograma de las células de neonato podemos ver como las señales de células neonatales están más desplazadas hacia la derecha con respecto a las señales de adulto, tanto en condiciones basales, como estimuladas. Se observa que la presencia de CBP en las células neonatales es más positiva ya desde las condiciones basales. En la gráfica donde analizamos varias réplicas podemos concluir que no existe variación alguna en CBP en las células de adultos basales y estimuladas $p=0.50$. Para el caso de los neonatos, se observó una tendencia al aumento en las células de neonatos en condiciones de estimulación, pero no alcanzó una diferencia significativa $p=0.06$. Al comparar las réplicas entre adultos y neonatos encontramos diferencias significativas desde los estados basales $p=0.048$ y se incrementó esta diferencia al estimular en ambas condiciones $p=0.016$.

Para cerrar este grupo de experimentos realizamos la medición de P300 **Figura 7C**. Se realizó con las mismas condiciones experimentales establecidas previamente para evaluar β -catenina y CBP. Hubo diferencia significativa de P300 al estimular los linfocitos T $CD8^+$ de adultos con respecto a las condiciones basales $p=0.031$. Al comparar P300 en células neonatales a nivel basal y estimuladas no hubo diferencias significativas $p=0.50$. Tampoco hubo diferencias entre adultos y neonatos en ninguna de las condiciones a comparar, ni basales $p=0.167$, ni estimuladas $p=0.068$.

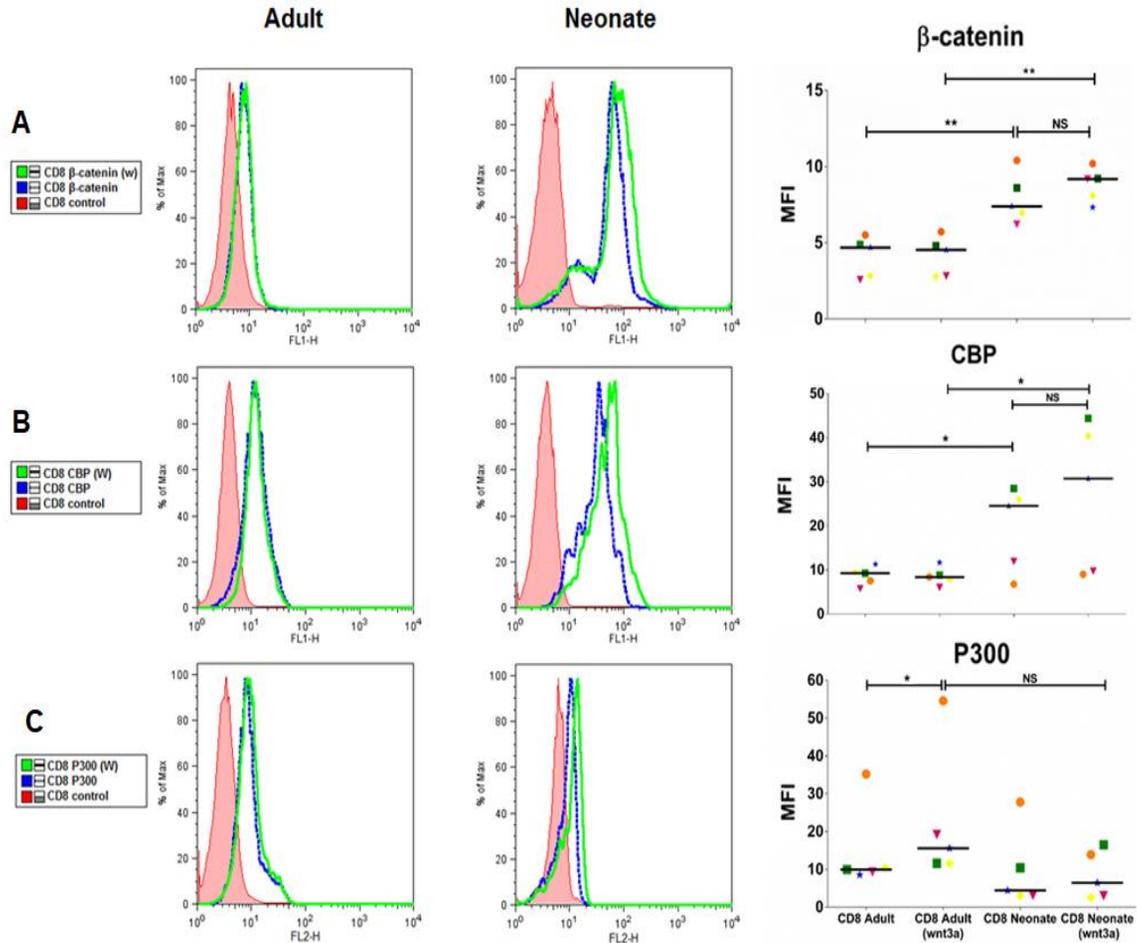


Figura 7. Citometría de flujo, histogramas de los MFI de linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos en condiciones basales y estimuladas con wnt3a. Gráficas comparativas de las MFI de todas las muestras analizadas. A) Histogramas de linfocitos T CD8⁺ de neonatos basales y estimulados con wnt3a. Controles experimentales (Línea roja), condiciones basales (línea azul) y condiciones estimuladas (línea verde). **A)** Evaluación de la acumulación de β -catenina en linfocitos T CD8⁺ de neonatos basales y estimulados con wnt3a **B)** Evaluación de CBP en linfocitos T CD8⁺ de neonatos basales y estimulados con wnt3a. **C)** Evaluación de P300 en linfocitos T CD8⁺ de neonatos basales y estimulados con wnt3a. Los asteriscos muestran una significancia de * p<0.05, ** p<0.01, NS no significativo.

6.3 Inmunoprecipitación de β -catenina en linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos

En este proyecto nos cuestionamos qué proteínas están asociadas a β -catenina formando complejos proteicos en linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos vírgenes, en condiciones basales y cuando estimulamos con Wnt3a. Una condición muy importante en los lisados es el empleo de una disolución tampón de lisis no desnaturalizante para conservar y mantener los complejos proteicos que están interaccionando con β -catenina. En la **Figura 8 (A y B)** se observan ejemplos de inmuoblots para β -catenina, P300, CBP y β -actina como control de carga. Se puede observar mayores niveles de β -catenina en las células neonatales, que

no se alcanzaron a inmunoprecipitar totalmente en las muestras de sangre neonatal (ver carril SN, de sobrenadante), mientras que, en las células de adultos, quedó muy poca proteína en el sobrenadante. Para cuantificar comparativamente varios experimentos y tener una evaluación estadística, realizamos análisis de densidad óptica en los inmunoblots, mediante el programa de ImageJ[®], que nos permitió cuantificar la intensidad de cada banda (DO, densidad óptica) y los valores lo representamos en una gráfica para determinar la acumulación de β -catenina. Podemos observar que, en las células de adulto, la estimulación con Wnt3a no produjo un incremento de β -catenina con significancia estadística, aunque si se observó un ligero incremento con la estimulación **Figura 8C**. En las células neonatales, en cambio, la acumulación de β -catenina en respuesta a la estimulación con Wnt3a fue más significativo **Figura 8D**.

La proteína β -catenina es una proteína que posee la capacidad que formar complejos proteicos. En la introducción describimos el papel de Wnt y los coactivadores CBP y P300 en la auto renovación y diferenciación. Por lo que nos cuestionamos como es la asociación de β -catenina con CBP y P300 en células de adultos y neonatos, tanto en sus condiciones basales como estimuladas con Wnt3a. Para respondernos esta interrogante realizamos co-inmunoprecipitaciones de β -catenina en células de adultos y neonatos tanto en condiciones basales como estimuladas y realizamos un revelado con anticuerpos para CBP y P300. En células de adultos **Figura 8A, blot CBP** y en células de neonatos **Figura 8B, blot CBP** se puede observar un ejemplo de inmunoblot para estas proteínas. Cuantificamos la intensidad de cada banda (DO, densidad óptica) y los valores lo representamos en las gráficas que se muestran en los paneles **Figura 8E y F**. En las células de adultos **Figura 8E** no encontramos diferencias significativas de asociación de β -catenina con CBP después de la estimulación con Wnt3a, de hecho se observó una tendencia a disminuir, aunque este cambio no tuvo significancia estadística. En las células de neonatos, en cambio, aumentó la asociación de CBP con β -catenina al estimular con Wnt3a **Figura 8F**. Al realizar este mismo experimento para P300 resultó lo opuesto **Figura 8G y H**. Observamos que la estimulación con Wnt3a resultó en una mayor asociación de β -catenina por P300 en las células de adulto **Figura 8G** y en las células de neonatos no hubo diferencias significativas en la asociación de β -catenina por P300 **Figura 8H**. Con estos experimentos podemos concluir parcialmente que logramos activar la vía de Wnt/ β -catenina en los linfocitos T

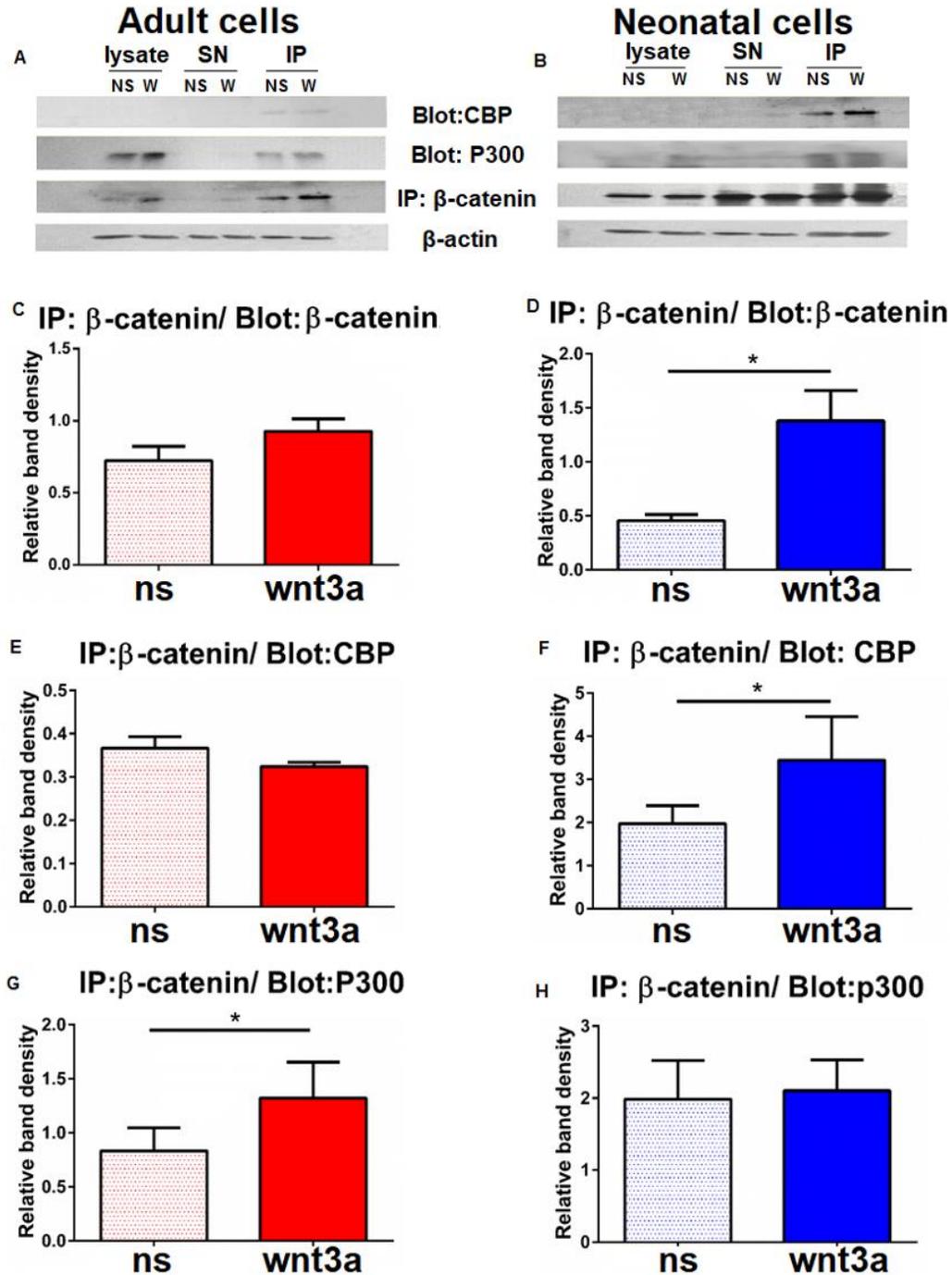


Figura 8. Inmunoprecipitación de β -catenina en linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos en condición basal (NS) y condición estimulada (w o' wnt3a). Asociación de β -catenina con CBP y P300 en linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos estimulados. **A)** Western blot del inmunoprecipitado de β -catenina (panel IP: β -catenin/Blot: β -catenin) en linfocitos T CD8⁺ de adultos y **B)** en linfocitos T CD8⁺ de neonatos. Revelados de CBP (Blot de panel: CBP) y P300 (Blot de panel: P300) posterior a la inmunoprecipitación de β -catenina indicativo de asociación de estas proteínas. Usamos β -actina como control de carga (panel β -actin). Efecto de la estimulación con wnt3a en la acumulación de β -catenina en **C)** adultos y **D)** neonatos. Asociación de β -catenina a CBP en **E)** adultos y **F)** neonatos. Asociación de β -catenina a P300 en **G)** adultos y **H)** neonatos. Los resultados son tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado, y se expresan como un valor de densidad óptica calculado con el software ImageJ. Se sometieron a una cola de la prueba t pareada. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con: significativo * (P <0.05), muy significativo ** (P <0.01) y (NS) no significativo.

CD8⁺ de adultos y neonatos humanos estimulados. Evaluar los niveles de las proteínas β -catenina, CBP y P300 en estas poblaciones ya sea en condiciones basales y estimuladas. Como resultado más relevante obtenido es una mayor asociación de β -catenina con P300 en las células de adultos a diferencia de mayor asociación de β -catenina con CBP en las células de neonatos al estimularlas con wnt3a.

6.4 Proteómica

La vía canónica de señalización de Wnt controla las respuestas antagónicas de la renovación celular y la diferenciación. Los experimentos anteriores señalaron que las proteínas P300 y CBP pudieran participar en establecer respuestas antagónicas en las células de adultos y neonatos. Sin embargo, los complejos que se forman con β -catenina pueden ser mucho más grandes. Por lo mismo, con el fin de obtener conocimientos sobre las proteínas implicadas en las respuestas de las células T CD8⁺ adultas y neonatales, purificamos células T CD8⁺ vírgenes y una fracción la dejamos en condiciones basales y otra fracción las estimulamos con Wnt3a. Hicimos el inmunoprecipitado con un anticuerpo específico de β -catenina y determinamos todas las proteínas asociadas a β -catenina por espectrometría de masas, con y sin separación previa, sólo mediante una concentración de las proteínas en un pre gel de acrilamida al 2%. Sólo en dos de las cuatro réplicas se obtuvo un buen resultado, con cantidades equiparables y comparables de proteínas identificadas. Fueron en aquellas que si realizamos una separación previa mediante electroforesis de gradiente 4-13% de acrilamida. De los datos obtenidos del programa *Trans Proteomic Pipeline* (TPP) seleccionamos como proteínas identificadas positivamente aquellas que cumplieran los siguientes requisitos: i) que la probabilidad de que el péptido fuese la proteína identificada fuese igual o superior a 0.95% ii) que se identificaran al menos 4 péptidos independientes para cada proteína y iii) que las proteínas identificadas se repitieran en las dos réplicas biológicas que tuvieron la misma eficiencia. Resultaron identificadas en células de adultos no estimuladas 101 proteínas y en las neonatales 96 proteínas. De estas proteínas, 61 sólo se identificaron en las células de adulto y 36 en las células neonatales con 40 proteínas comunes **Figura 9A y Anexo 2.**

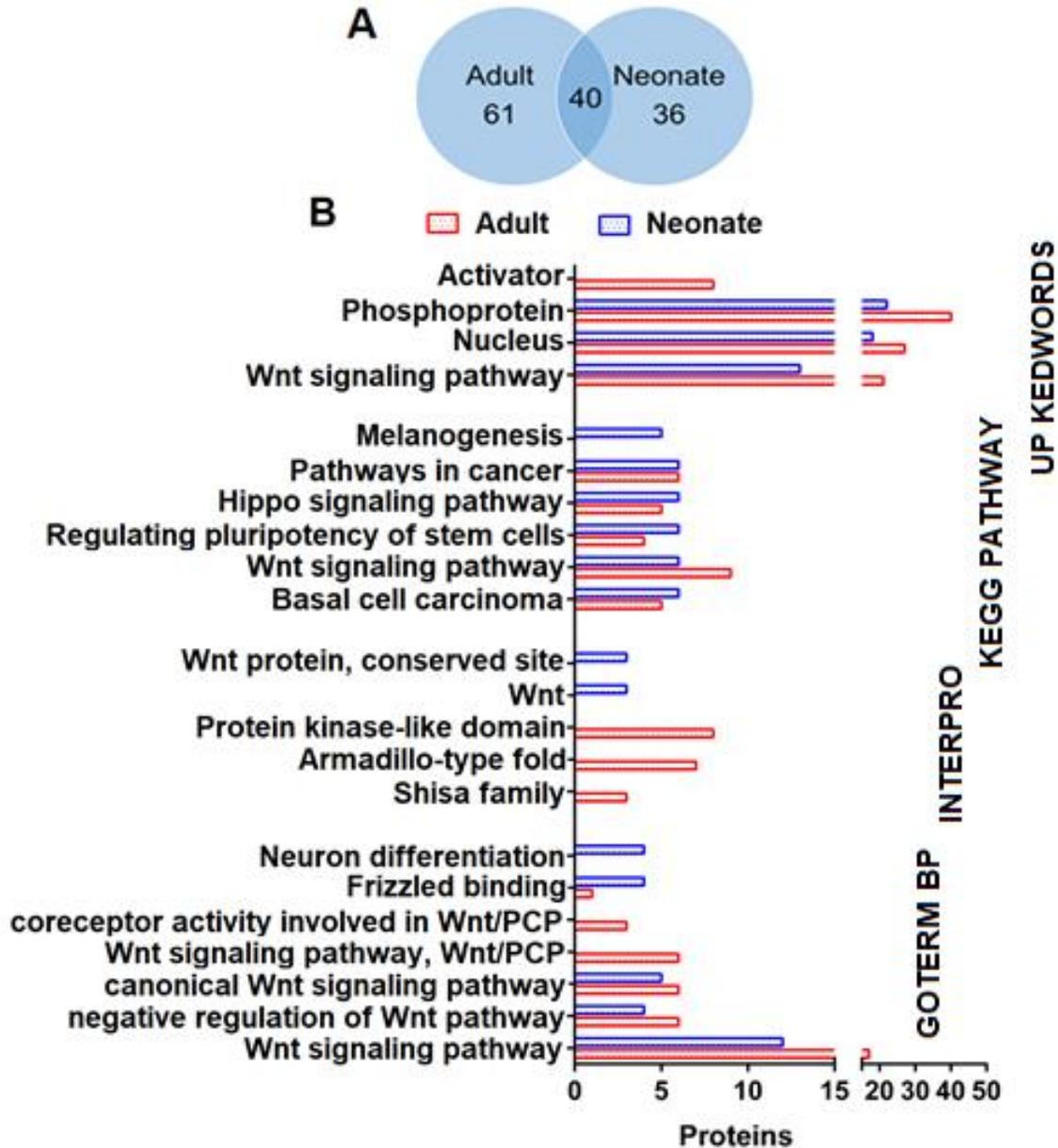


Figura 9. Proteínas identificadas por espectrometría de masas asociadas a beta catenina. **A)** Cantidades de proteínas de linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos basales. **B)** Identificación de las proteínas identificadas en adultos y neonatos en bases de datos.

Las proteínas únicas de cada grupo de edades se sometió a un análisis funcional, usando la base de datos *DAVID Bioinformatics Resources 6.8*, que tiene conexión con otras bases como: GOTERM BP, KEGG PATHWAY, UP KEYWORDS, INTERPROT y otras. De las proteínas reclutadas por β -catenina en células de adultos, se encontraron enriquecimientos en fosfoproteínas, funciones activadoras, vía de Wnt, dominios ricos en cinasas, proteínas con dominios armadillo y Shisa y en la vía de polaridad celular. Los dominios Armadillo son dominios en forma de pliegues que participan en la asociación entre proteínas y que

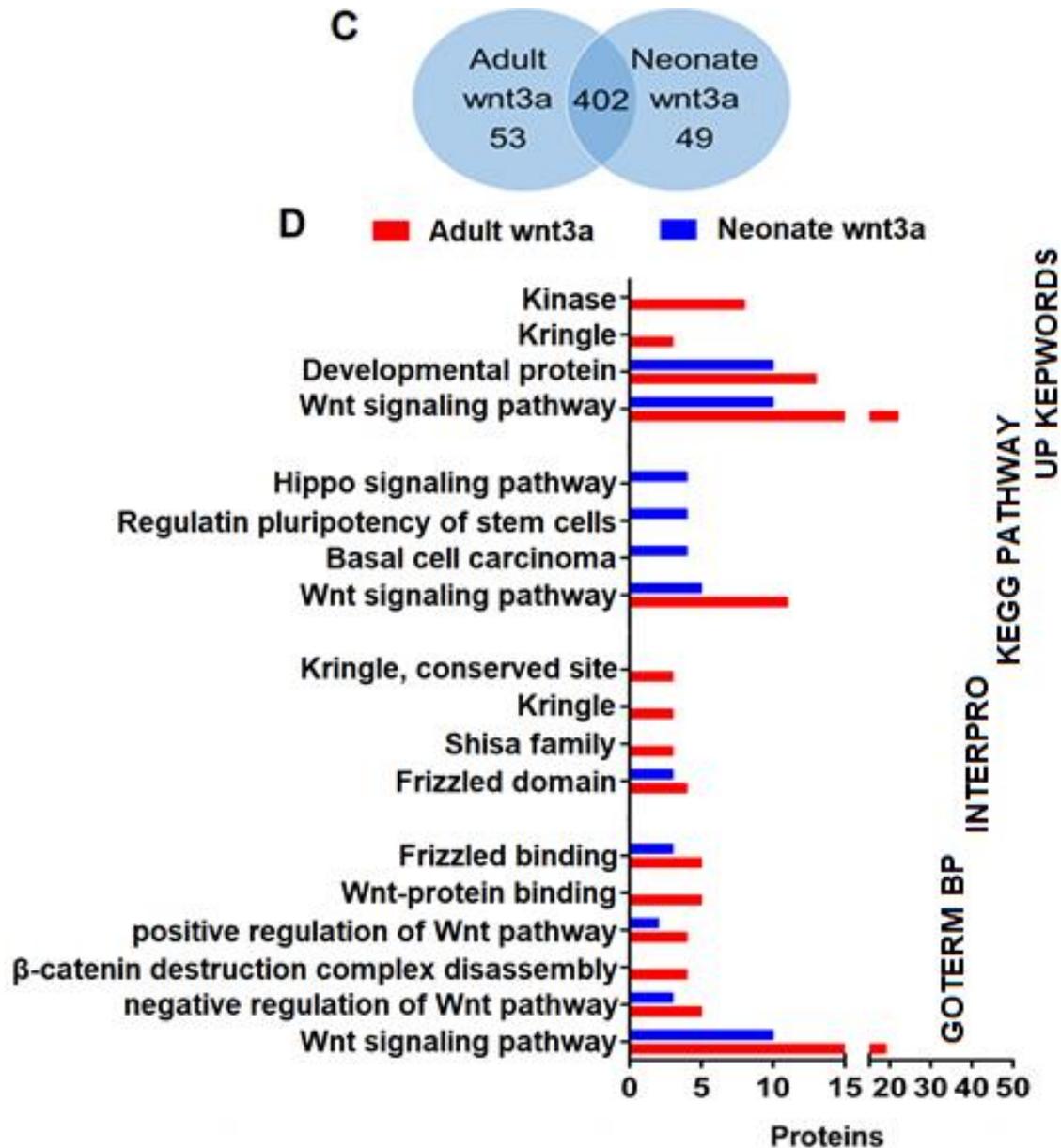


Figura 10. Proteínas identificadas por espectrometría de masa asociadas a beta catenina. **A)** Cantidades de proteínas de linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos estimulados con wnt3a. **B)** Identificación de las proteínas identificadas en adultos y neonatos estimulados con wnt3a en bases de datos

están enriquecidos en la β -catenina y proteínas de las vías de transducción de señales de Wnt. La familia Shisa se refiere a proteínas que controlan la maduración y el tráfico de receptores frizzled a la membrana celular **Figura 9B**. En las células neonatales, las proteínas asociadas con β -catenina se enriquecieron en la vía de la melanogénesis, en la diferenciación neuronal y proteínas de unión a Frizzled. Los receptores frizzled asociados con β -catenina en las condiciones no estimuladas solo se encontraron en las células neonatales. El enriquecimiento en la vía de la Melanogénesis podría estar relacionado con

la alta producción de ROS (*Reactive Oxygen Species*) de las células neonatales (Galindo-Albarrán et al., 2016). La diferenciación neuronal podría referirse al reclutamiento de Presenilin-1 y proteínas asociadas en los inmunoprecipitados neonatales, lo que sugiere una conexión con la vía Notch en estas células.

Después de la estimulación con Wnt3a, el número de proteínas reclutadas aumentó aproximadamente 4 veces, hasta 455 y 451 en células de adultos y neonatales respectivamente, con 402 proteínas comunes **Figura 10A** y **Anexo 3**. Las proteínas identificadas después de la estimulación con Wnt3a en células de adultos **Figura 10B** se asociaron con una actividad más alta de la vía de señalización Wnt y en dominios ricos en proteínas Kringle, Shisa y cinasas. El reclutamiento de cinasas está de acuerdo con una mayor expresión de proteínas de señalización en células T CD8⁺ de adultos (Galindo-Albarrán et al., 2016). Las proteínas con dominios Kringle son mediadores y reguladores de la actividad proteolítica. En las células neonatales, las proteínas reclutadas se asociaron con la proliferación y con la vía de señalización de Hippo que regula la proliferación celular, la apoptosis y las respuestas al estrés. En conjunto, estos resultados sugieren una vía de señalización Wnt madura y altamente controlada en las células T CD8⁺ de adultos. En las células neonatales, sin embargo, nuestros resultados sugieren la participación de esta vía en el ciclo celular y procesos de desarrollo.

6.4.1 Identificación de cambios en las vías de Wnt

Centramos el análisis en las diferencias de las proteínas inmunoprecipitadas con β -catenina entre células T CD8⁺ neonatales y de adultos dentro de la vía de señalización Wnt **Figura 11**. Las proteínas que están en el recuadro de color naranja se refieren a proteínas comunes entre las células de adultos y neonatos. Las proteínas que están en el recuadro de color rojo son proteínas identificadas sólo en las células de adultos y las proteínas en azul, son exclusivas de neonatos. A nivel basal, las diferencias más importantes corresponden a los receptores frizzled, que sólo se encontraron asociados con β -catenina en las células neonatales, así como Axina1. Por otra parte, en las células de adulto se observó el reclutamiento de APC y de los factores transcripcionales TCF, Lef y NFAT5 **Figura 11A**. La presencia de complejos de β -catenina con factores transcripcionales en las células de adultos pudieran estar asociados a una mayor experiencia de estas células con la vía, dada

la larga vida de las células vírgenes en humanos (Staal et al., 2008). También se observaron algunas diferencias en el reclutamiento de proteínas Wnt a nivel basal. En las células neonatales, se identificó a Wnt8a, mientras que en las células de adulto se encontró Wnt9b. Wnt5b se encontró en ambos tipos celulares y está relacionado con la migración celular en las células cancerosas y la diferenciación estrogénica (Yang, desarrollo de Yingzi 2003) (Harada T, *Cancer Sci.* 2017). Poco se sabe sobre Wnt8a y Wnt9, excepto que participan en el desarrollo.

En las células estimuladas con Wnt3a **Figura 11B**, el número de proteínas asociadas con β -catenina aumentó, como se esperaba. En estas condiciones, se encontró reclutamiento de receptores frizzled tanto en células neonatales como en células de adulto, así como todas las proteínas del complejo de degradación de β -catenina y los factores de transcripción TCF y LEF. Solo en células de adulto se reclutaron MAP3K7 (Tak1), FRAT1 y CXXC4, lo que indica la conexión con la vía MAPK y el control de la señalización Wnt. Aunque Axin2 se encontró en ambas poblaciones celulares estimuladas, Axin1 solo se reclutó en las células neonatales, en muestras no tratadas y tratadas con Wnt3a. Se reportó un papel diferencial de Axina1 y Axina2, el último está más asociado con la actividad del complejo de destrucción (Thorvaldsen et al., 2017), mientras que Axina1 participa en el establecimiento de muchos complejos proteicos de señalización, ver más adelante. En las células estimuladas se encontraron diferencias importantes en las proteínas Wnt encontradas. Wnt5a, Wnt10A y Wnt16 se encontraron en los inmuoprecipitados de β -catenina sólo en células neonatales y Wnt11 sólo en las muestras de adultos. Esto sugiere la conexión con dos ramas independientes de las vías de Wnt no canónicas en las células de las dos poblaciones de diferentes edades. Wnt11 induce la polaridad celular y Wnt5a la vía del calcio.

6.4.2 Análisis del interactoma

Como parte del análisis de la interacción de las proteínas identificadas exclusivamente en adultos y neonatos medimos la interacción de las proteínas identificadas. Seleccionamos el código de Uniprot de cada proteína identificada y lo analizamos mediante el programa STRING 10.5. El resultado de las interacciones lo exportamos a Cytoscape 3.5.1 que es una plataforma que nos permite visualizar la interacción entre proteínas y complejos

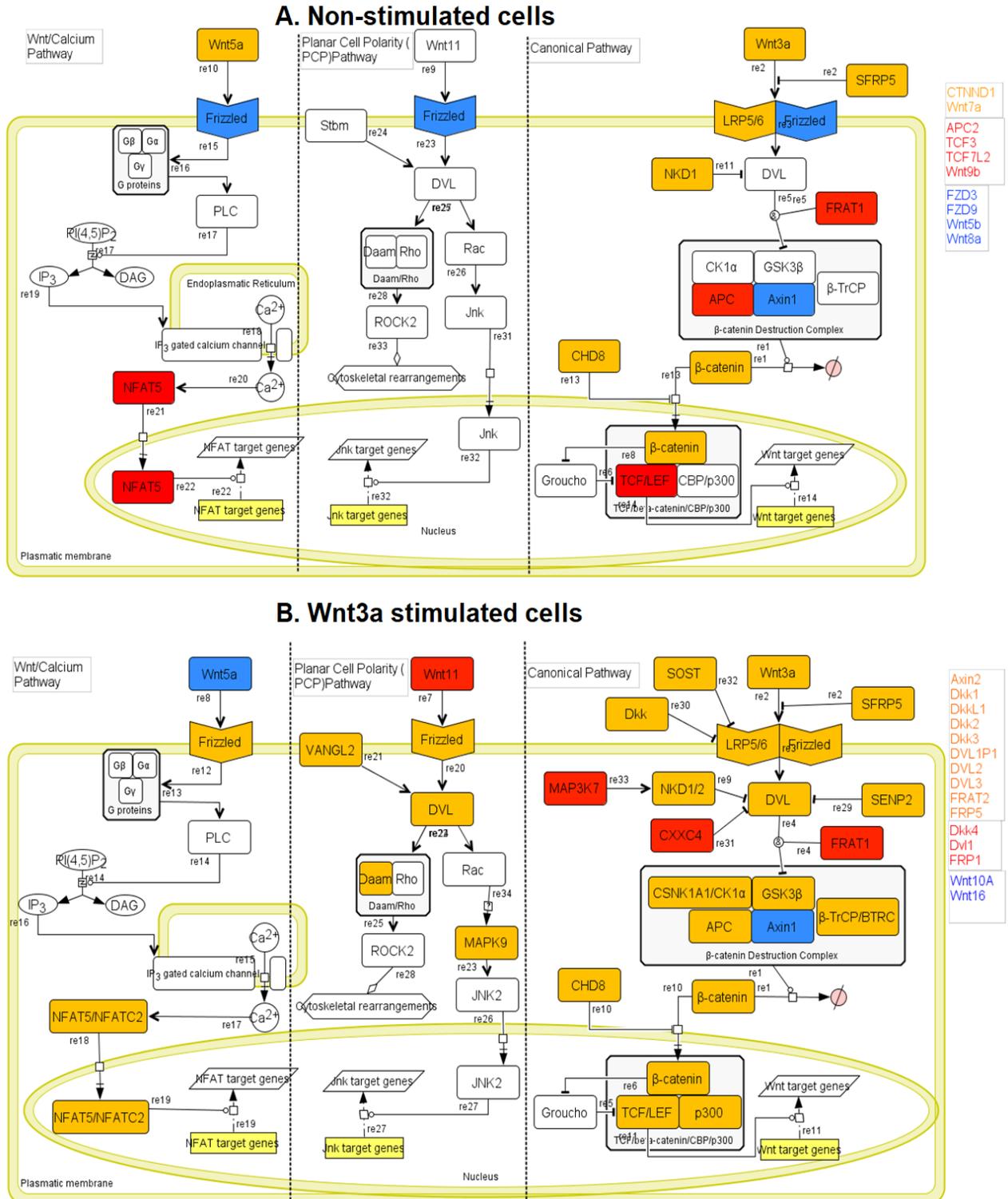


Figura 11. Proteínas de la vía de Wnt asociadas a β -catenina identificadas por espectrometría de masas y analizadas en KEGG PATHWAY. **A)** Proteínas identificadas en células de adultos y neonatos basales. **B)** Proteínas identificadas en células de adultos y neonatos estimuladas. Cuadros color naranja son proteínas comunes en adultos y neonatos. Cuadros rojos son proteínas identificadas exclusivamente en adultos y cuadros azules proteínas identificadas exclusivamente en neonatos. La figura fue diseñada con el programa Cell Designer.

potenciales, que se muestran en la **Figura 12**. Se presenta el análisis después de la estimulación con Wnt3a. Las proteínas marcadas en círculos naranja son proteínas comunes entre las células de adultos y neonatos. El 30% faltante son proteínas exclusivamente encontradas en células de adulto (color rojo) o neonatales (color azul).

En los complejos protéicos de las células de adultos, observamos funciones implicadas en señalización y varios procesos inmunológicos como procesos del sistema inmune, diferenciación de linfocitos, morfogénesis y desarrollo de vasos sanguíneos y regulación de la respuesta inmune innata. Por ejemplo, la regulación positiva de la señalización de NFκB, la regulación de la actividad de JUN y la regulación negativa de la cascada de las MAPK cinasas. Hubo enriquecimiento de complejos protéicos ensambladores como regulación de procesos en filamentos de actina. Proteínas muy repetidas en la formación de muchos de los complejos proteicos de las células de adultos se encontraron las proteínas Wnt11, SFRP1, y MAP3K. Se identificó además proteínas del citoesqueleto como microfilamentos de actina.

Para el caso de las células neonatales se enriquecieron otros complejos de proteínas relacionadas con la remodelación de la cromatina, la regulación positiva del ciclo celular y división celular. También se identificaron otros complejos relacionados con metabolismo como: metabolismo lipídico, metabolismo de procesamiento del DNA y regulación negativa de procesos metabólicos como catabolismo. También se identificaron proteínas de poliubiquitinación, ensamblaje de organelos y regulación de la diferenciación de proteínas involucradas en el desarrollo de la placenta embrionaria, diferenciación de las células neuronales y ensamblaje del citoesqueleto de tubulina. En varios complejos de proteínas encontramos repetidamente proteínas como Wnt5a, Axina1 y PSEN1, esta última conecta con la vía de Notch.

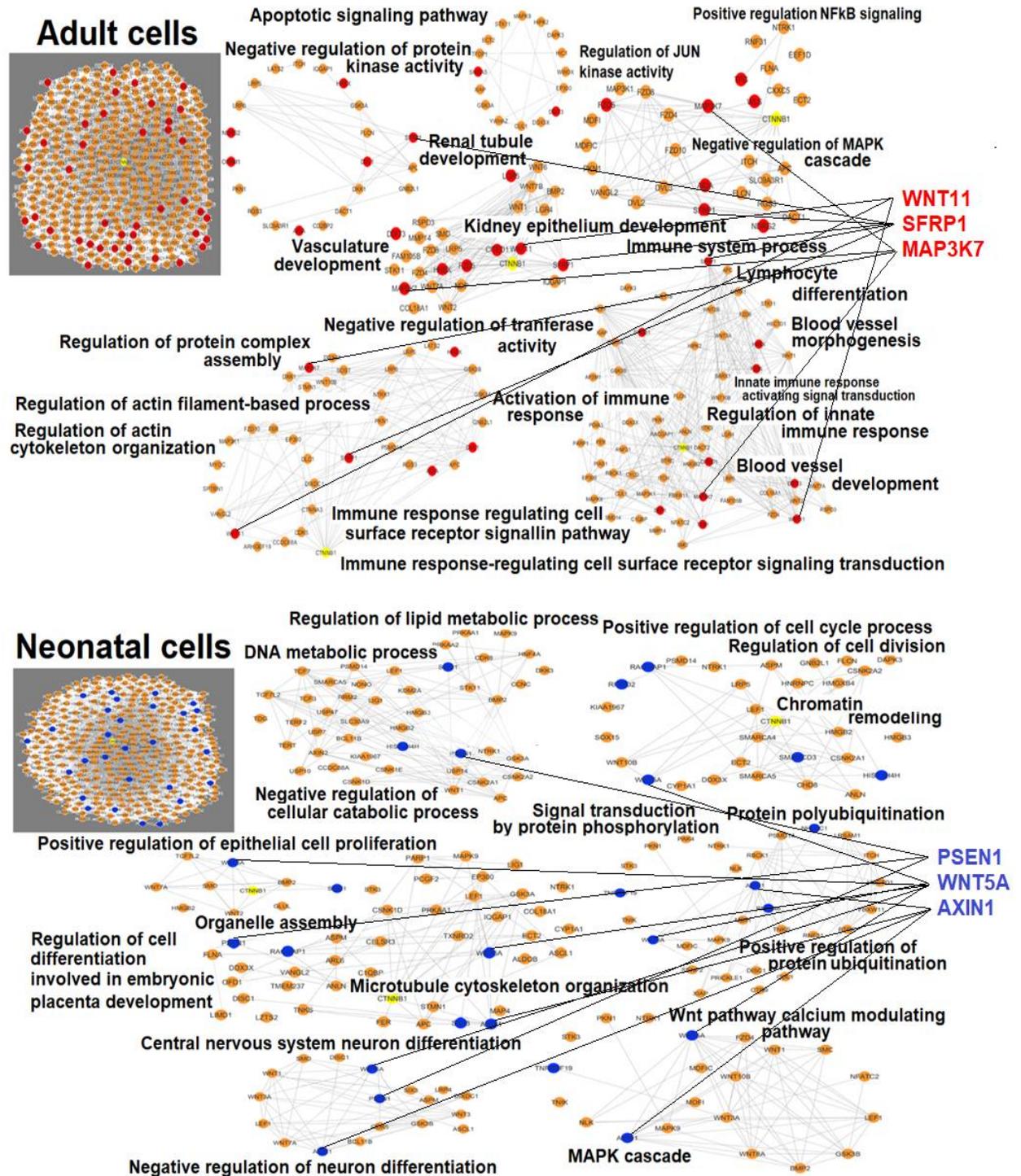


Figura 12. Interacción proteína-proteína de las que fueron identificadas en asociación a β -catenina en células de adultos estimulados (arriba) y en proteínas asociadas a β -catenina en células de neonatos estimuladas (abajo).

6.4.3 Expresión de genes diferenciales que participan en la formación de los complejos proteicos.

Como se mencionó arriba, encontramos proteínas que aparecerían en al menos tres complejos de células neonatales o de adultos y que por lo mismo, pudieran ser centrales en la formación de esos complejos. En la **Figura 13** se representan análisis de expresión de los genes de esas proteínas, que se evaluaron por RT-qPCR. Nuevamente usamos el color rojo para mostrar las proteínas encontradas en las células de adulto y el azul para aquellas de las células neonatales. Para las células de adultos evaluamos las proteínas **SFRP1** *Secreted frizzled-related protein 1*, **WNT11** *Protein Wnt-11* y **MAP3K7** *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7*. En caso de las células de neonatos se evaluó la expresión de los genes de las proteínas **WNT5a** *Protein Wnt-5a*, **PSEN1** *Presenilin-1* y **AXIN1** *Axin-1*.

En los genes que se encontraron muy representados en las células de adulto, encontramos que no hubo diferencias en la expresión del gen de MAP3K7 entre las células neonatales y de adultos, ni a nivel basal ni después de la estimulación con Wnt3a. Se encontró una diferencia significativa en la expresión del gen SFRP1, que se expresan más en las células estimuladas de adulto, con respecto a las células neonatales. También se encontró una diferencia significativa en la expresión del gen Wnt11 en las células de adulto con respecto a las células de neonato, que se expresó más en las células de adulto, desde el nivel basal. De los genes que se encontraron repetidamente en los complejos de las células neonatales, no encontramos diferencias significativas entre las células de adultos y neonatos para el gen de Axina1 ni a nivel basal ni después de la estimulación. Para el gen PSEN1 tampoco encontramos diferencias significativas en ninguno de los casos, debido a que hubo una gran variación entre las muestras neonatales, sin embargo, se observó una ligera tendencia a una mayor expresión de este gen en células neonatales a nivel basales y después de la estimulación. Finalmente, para el gen de Wnt5a, encontramos una diferencia significativa entre las células neonatales y de adulto, tanto a nivel basal como después de la estimulación, obteniendo una casi nula la expresión del gen en las células de los adultos.

Gene expression

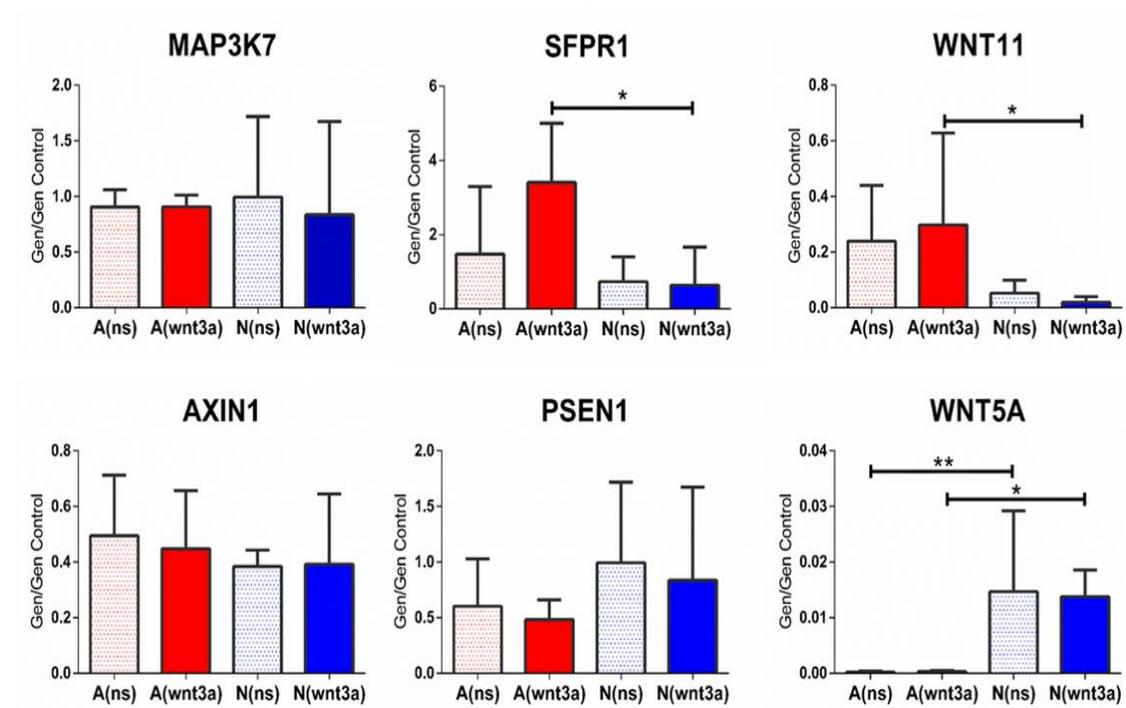


Figura 13. Validación de genes por qPCR.

6.4.4 Enriquecimiento de β -catenina en regiones promotoras de una selección de genes

La expresión de los genes de respuesta a la vía canónica de Wnt requiere de un estricto control a nivel transcripcional. Esta regulación depende en gran medida de los factores transcripcionales LEF/TCF. La β -catenina no es capaz de actuar por sí sola dado que no contiene en su estructura dominios de unión a DNA, sin embargo, su participación es fundamental para activar la expresión de los genes. Por esta razón, decidimos examinar la presencia de esta proteína en la región promotora de los genes seleccionados en los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos bajo condiciones basales y de estimulación con Wnt3A. Para este objetivo, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina usando anticuerpos anti- β -catenina para aislar fragmentos de DNA, que posteriormente se evaluaron por ensayos de PCR, usando oligos contra DNA de las regiones promotoras de una selección de genes blanco. Los valores de enriquecimiento de β -catenina en la región promotora de los genes, se obtuvieron al normalizar con respecto a las muestras de DNA

total (input), en las cuales no se empleó el anticuerpo. En la **Figura 14**, se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los genes, divididos en categorías: primero los que están asociados a auto-renovación, segundo los que están asociados a señalización y tercero los que están asociados a diferenciación. Se observó que en las células de los recién nacidos existe mayor presencia basal de β -catenina en el promotor de los genes CCND1 (ciclina D1), BIRC5 (Survivina) y POU5F1 (Oct4) en comparación con las células de adultos desde condiciones basales. Se observó una tendencia del gen de la Ciclina D1 a incrementar con la estimulación de las células neonatales después de la estimulación con Wnt3a, pero no fue significativo. Para el caso de los genes de señalización (CJUN, FRA1, FOS, y AXIN2)

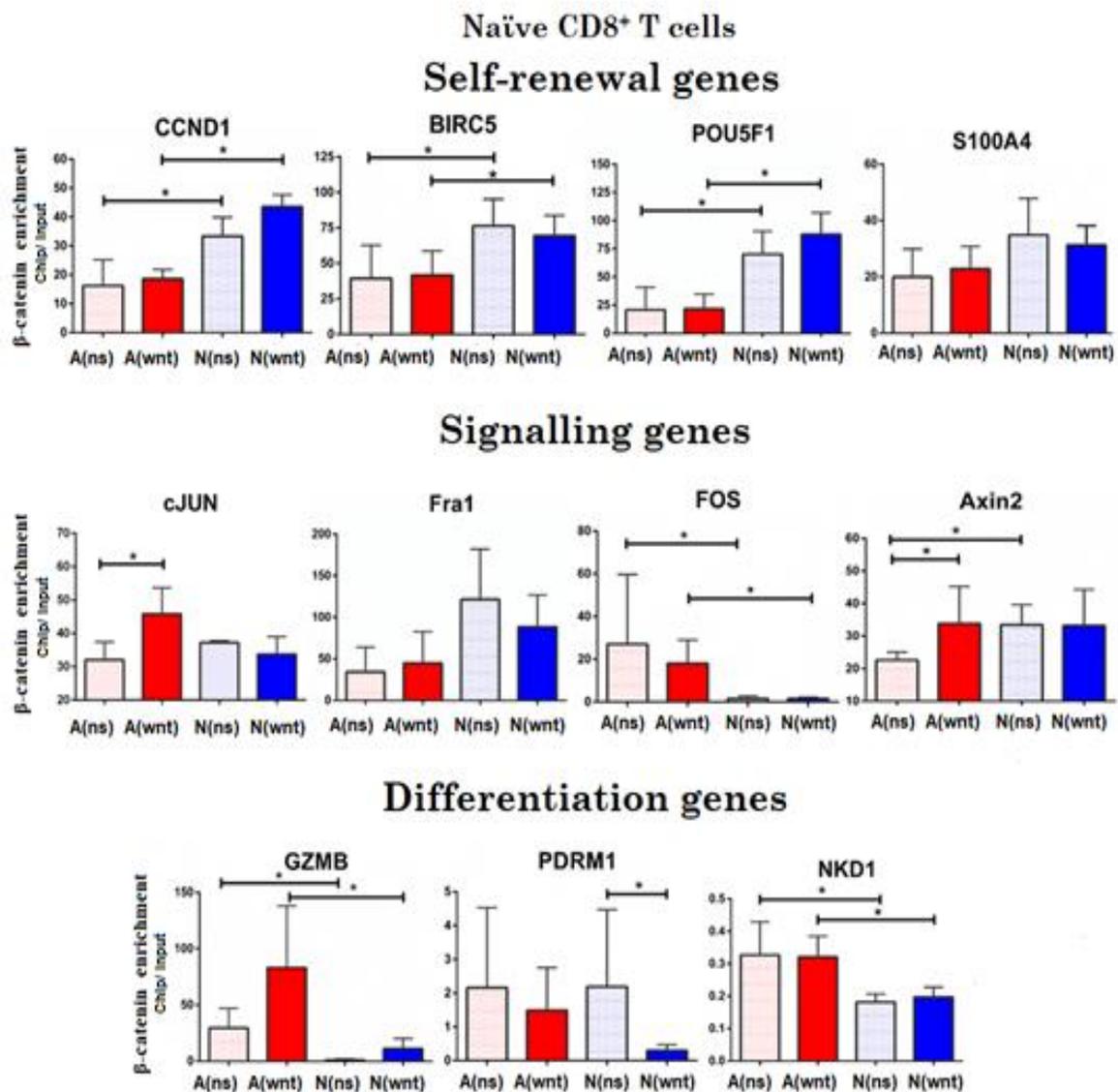


Figura 14. Enriquecimiento de β -catenina en promotores de genes de auto-renovación, señalización y diferenciación en linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos basales y estimulados con wnt3a

hubo un aumento significativo de enriquecimiento del promotor del gen de CJUN para las células de adulto después del estímulo con Wnt3a, en comparación con su estado basal, pero no se encontraron diferencias significativas al comparar el enriquecimiento con el de las células neonatales. En el caso del gen de cFos, desde el estado basal hubo un mayor enriquecimiento de β -catenina en las células de adulto a nivel basal en comparación con las células neonatales. Por otra parte, el reclutamiento de β -catenina en el gen de Axina 2 fue mayor en las células neonatales en condiciones basales, pero después del estímulo con Wnt3a, el enriquecimiento de β -catenina en las células de adultos fue comparable a los niveles obtenidos en las células neonatales en estado basal. Para el caso del gen FRA1 no hubo diferencias entre las células neonatales y de adultos ni a nivel basal ni después del estímulo con Wnt3a. El estudio del enriquecimiento de β -catenina en genes de diferenciación (GZMB, PRDM1 y NKD1) mostró un enriquecimiento significativo mayor para las células de los adultos con respecto a las células neonatales en los genes GZMB y NKD1 en condiciones basales. Se observó una tendencia de mayor enriquecimiento de β -catenina en el promotor de Granzima B en las células de adulto después de la estimulación con Wnt3a, pero no alcanzó significancia estadística. Por último, para el gen PRMD1, que codifica para BLIMP-1 un represor de $\text{IFN}\beta$, no observamos diferencias entre las células de adultos y las de neonatos, pero en estos últimos se observó un menor enriquecimiento de β -catenina con el estímulo de Wnt3a.

En conjunto, estos resultados muestran que existen diferencias en el reclutamiento de β -catenina sobre los promotores de genes blancos entre las células de adulto y de neonato. El mayor enriquecimiento de β -catenina en los promotores de genes de auto renovación en las células neonatales y de genes de diferenciación en los genes de los adultos concuerda con los resultados de los complejos proteicos.

Para evaluar si los cambios en el reclutamiento en β -catenina conducen a cambios en la expresión de los mismos, evaluamos los niveles de mRNA por RT-PCR en tiempo real. En la **Figura 15**, se muestran los resultados de la transcripción de cada gen, como su expresión relativa normalizada con respecto al gen control GAPDH. Sólo se encontraron diferencias significativas en 3 genes, dos de ellos de auto renovación, que se encontraron más expresados en las células neonatales. Para Ciclina D1, desde el nivel basal y para la

survivina (BIRC5F1) después del estímulo con Wnt3a. El tercer gen que mostró cambios en expresión fue Axina2, que a nivel basal se encontró más expresado en las células neonatales, pero con el estímulo de Wnt3a, alcanzó el nivel de expresión de los genes con las células neonatales. Para estos tres genes, la expresión de los genes concordó con los experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina, en el sentido que el enriquecimiento de β -catenina sobre el promotor de los genes llevó a una mayor expresión de los mismos. Para todos los demás genes evaluados, no se encontraron diferencias en los niveles de expresión entre las células neonatales y las de adulto o debidos al estímulo con Wnt3a. Es importante tener en cuenta que se considera a β -catenina como un facilitador de la expresión y en ese sentido, es posible que los cambios en expresión debidos al reclutamiento de la β -catenina se puedan visualizar únicamente al incluir estímulos combinados, por ejemplo, el estímulo de activación por el TCR.

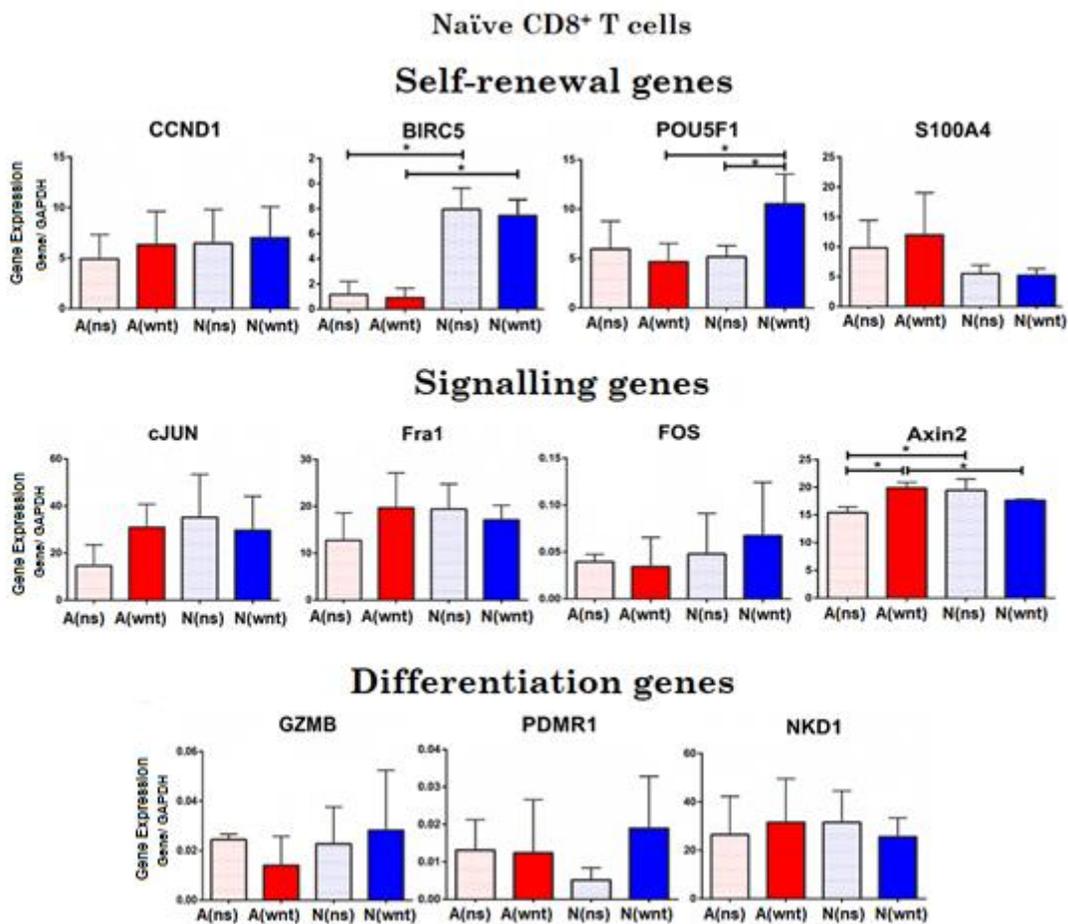


Figura 15. Transcripción de genes de auto-renovación, señalización y diferenciación en linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos basales y estimulados con wnt3a

7. Discusión

La vía de señalización de Wnt/ β -catenina juega un papel importante en el desarrollo y en la regulación de las actividades biológicas de los linfocitos T CD8⁺. Se ha reportado que la vía canónica de Wnt se encuentra activa en las células vírgenes y las células de memoria (Willinger et al., 2006), pero no en células efectoras. En un trabajo previo del laboratorio, se describió que las células T CD8⁺ neonatales tienen una programación transcriptómica y epigenética distinta a las células de adultos, caracterizada por una respuesta inflamatoria innata, una alta tasa de proliferación homeostática y baja señalización y funciones citotóxicas (Galindo-Albarrán et al., 2016). Entre los factores de transcripción que se encontraron enriquecidos en las células neonatales se encuentran Tcf4 y Lef1, que son los factores responsables de la transcripción mediada por la vía de Wnt dependiente de β -catenina. Por esta razón quisimos explorar esta vía, para evaluar si contribuye al fenotipo de los linfocitos T CD8⁺ neonatales.

La vía de señalización mediada por un incremento en β -catenina es compleja debido a que es la interacción de la misma con complejos proteicos la que define la respuesta celular y su asociación con los factores transcripcionales TCF/LEF. En este trabajo, encontramos que los complejos proteicos asociados a β -catenina presentaron diferencias entre las células T CD8⁺ de neonatos y de adultos. Estas diferencias se pudieron apreciar desde la condición basal. Cuando estimulamos la vía canónica de Wnt con Wnt3a, tanto las células CD8⁺ T de adulto como las neonatales respondieron al tratamiento con un aumento de más de 4 veces en la cantidad de proteínas asociadas con la β -catenina. Aunque el 78% de esas proteínas se compartieron entre las células de adultos y neonatales (402 proteínas), las proteínas específicamente reclutadas (102 proteínas) se asociaron con polaridad celular, señalización y fosforilación en las células de adulto. En cambio, las específicamente reclutadas en las células neonatales estuvieron involucradas en la proliferación, el metabolismo y el desarrollo.

En las células de adulto, en condiciones basales, se observó asociación de β -catenina con los factores de transcripción TCF/LEF y NFAT5, lo que sugiere la presencia de β -catenina ya en el núcleo. Los reguladores de la ruta APC y FRAT1 también se encontraron en los

inmunoprecipitados de las células de adultos. Esto sugiere una experiencia más larga con la actividad de la vía en las células de adultos, que podría estar relacionada con la larga vida de las células T vírgenes humanas (Vrisekoop et al., 2008). Después de la estimulación, como se esperaba, se encontró una mayor proporción de proteínas dentro de las vías de señalización mediadas por Wnt. Entre las proteínas asociadas diferencialmente con β -catenina, encontramos diferencias en las proteínas Wnt. En las células neonatales Wnt5a se encontró sobreexpresado en comparación con las células de adultos, lo que sugiere un vínculo de activación de Wnt3a con la activación de la vía de señalización de Wnt/Ca²⁺. Wnt5a también está relacionado con la inducción de autofagia en respuesta a infecciones bacterianas (Jati et al., 2018), que podría ser parte de una inmunidad innata, como la respuesta que encontramos previamente en las células T CD8⁺ neonatales. En las células de adultos, Wnt11 se sobreexpresó. Esta proteína induce la vía de polaridad celular Wnt y la señalización a través de la proteína cinasa C. Se caracteriza por la reorganización del citoesqueleto y cambios en la polaridad celular que conducen a la diferenciación en varios tipos de células (Terami, Hidaka, Katsumata, Iio, & Morisaki, 2004)(Uysal-Onganer et al., 2010).

El análisis de Interactoma de las proteínas específicamente reclutadas mostró que los complejos de las células neonatales estaban principalmente involucrados en la regulación positiva del ciclo celular, la remodelación de la cromatina, las vías del calcio y el metabolismo. Wnt5a se encontró central para el metabolismo la vía del calcio y la proliferación. Encontramos que también se asoció con el reclutamiento de la histona Hist1H4H dependiente de la replicación. Otros y nosotros hemos reportado un aumento de la proliferación homeostática en células T CD8⁺ neonatales (Galindo-Albarrán et al., 2016)(Marchant & Goldman, 2005)(Schönland et al., 2003). La posible implicación de la vía de señalización Wnt dependiente de β -catenina en la proliferación de células neonatales se hizo evidente por la formación de complejos asociados con la proliferación, el enriquecimiento de β -catenina en los promotores de genes de renovación celular y la inducción de estos mismos genes transcripción por señalización Wnt3a. Oct4 (pou5f1) se encontró sobreexpresado en las células neonatales, así como el inhibidor de la apoptosis Survivin (birc5), que podría estar involucrado en la auto renovación.

También es importante para la formación de complejos de células neonatales Presenilina1,

una proteasa que interviene en el corte de la región citoplasmática del receptor Notch durante la activación de la vía. Se ha descrito un papel de la vía de señalización Notch, complementaria a la vía Wnt para la diferenciación en poblaciones similares a la memoria de células madre y también en la enfermedad de Alzheimer, asociada a un mutante PS-1, en la que el bloqueo de CBP restableció la diferenciación neuronal (Teo, Ma, Nguyen, Lam, & Kahn, 2005). Las proteínas reclutadas preferencialmente en células de adultos se asociaron más con los procesos del sistema inmune, la regulación de las actividades de cinasas y la señalización celular. La proteína SFRP1, miembro de los complejos solubles relacionados con frizzled, era fundamental para varios de los complejos de células de adultos. El gen *sfrp1* se encontró sobreexpresado en células de adultos estimuladas con *wnt3a*. Estas proteínas son moduladores negativos de la señalización de Wnt, lo que conduce a una reducción en los niveles de β -catenina y a una inhibición de la proliferación en las células vasculares (Ezan et al., 2004). El producto del gen MAP3K7 también se reclutó solo en células de adultos. Este gen codifica para TAK1, un importante regulador de la muerte celular, a través de la activación de NF κ B y también a través de vías independientes de NF κ B como el estrés oxidativo y la vía dependiente de la proteína cinasa 1 interactiva (RIPK1) (Lui et al., 2011; Mihaly et al., 2014). La proteína de unión a ácido nucleico Sbp1 también se reclutó con β -catenina en células de adultos, estableciendo una conexión con la vía de señalización de p53.

Para evaluar si los cambios en los complejos proteicos conducen a un reclutamiento diferencial de β -catenina en los promotores de los genes asociados con la auto renovación, la señalización y la diferenciación, realizamos experimentos ChIP/qPCR. El enriquecimiento de β -catenina se observó para la mayoría de los genes, en ambas poblaciones celulares, sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre las células neonatales y las de adultos. El enriquecimiento de β -catenina fue mayor en los genes asociados con la auto renovación en las células neonatales. Por el contrario, los genes asociados a la diferenciación reclutaron una mayor proporción de β -catenina a sus promotores en células de adultos. Esto es acorde con el doble papel de la vía de señalización Wnt reportada para otros tipos de células. Se ha reportado en células madre, miocitos, neuronas y células cancerosas que la asociación de CBP o P300 a β -catenina tiene funciones opuestas en el control de la auto renovación y la diferenciación (Bordonaro y Lazarova,

2015; Roth et al., 2003a). ; Teo y Kahn, 2010; Teo et al., 2005). Debido a la alta homología de CBP y p300, la distinción entre ambas proteínas podría oscurecerse en el análisis proteómico, en el cual solo identificamos P300 asociado con células tanto neonatales como de adultos en células tratadas con Wnt3a. De este modo, realizamos inmunoblots para evaluar específicamente la interacción de β -catenina con P300 o CBP, utilizando anticuerpos específicos que distinguen entre ambas proteínas. Nuestros resultados mostraron que en células neonatales, el tratamiento con Wnt3a indujo significativamente la asociación de CBP con β -catenina, mientras que en células de adultos, el mismo estímulo indujo el reclutamiento de P300. Los 110 aminoácidos N-terminales de CBP o P300 son responsables de la asociación de estas proteínas con la β -catenina. La afinidad de esta interacción está mediada por la fosforilación de MAPK, en el caso de CBP en Ser92 y para P300 por Ser12. Usando inhibidores específicos, se determinó que Erk podría ser responsable de la fosforilación de Ser92 de CBP y p38 para Ser12 en P300 (Ma et al., 2012; Xia et al., 2011). Una activación diferencial de Erk o p38 MAPK podría mediar el reclutamiento diferencial de CBP o P300 en células T CD8⁺ neonatales y adultas. Un metabolismo diferente en células neonatales y adultas también podría explicar las diferencias (Scholz et al., 2016). Nuestros resultados sugieren que un cambio celular entre diferenciación y auto renovación, mediado por la asociación P300 vs. CBP con β -catenina, podría participar en la mayor capacidad de renovación de linfocitos T CD8⁺ neonatales y la diferenciación de células de adultos en células de memoria.

En conjunto, nuestros datos muestran que las células T CD8⁺ tanto neonatales como de adultos responden a Wnt3a con un conjunto de proteínas específicas de la población celular que da como resultado un reclutamiento diferencial de β -catenina a los promotores de los genes de auto renovación o diferenciación. Estas proteínas pueden formar complejos que podrían ser responsables de la diferenciación preferencial de células de adultos en células de memoria y de células neonatales en poblaciones que mantienen características de células madre y de memoria, definidas en la literatura como “stem cell memory like” (Gattinoni et al., 2012). Nuestros resultados destacan diferencias importantes en los complejos proteicos formados en las respuestas de las células neonatales y adultas a la señalización canónica de Wnt, que podrían ser consideraciones importantes en el manejo de las respuestas de las células neonatales y el trasplante de sangre del cordón umbilical. Además, la identificación

de las proteínas que forman complejos y los mecanismos potenciales que dan forma a los complejos nucleados de β -catenina podrían ser útiles para un mejor control de esta vía clave en enfermedades como el cáncer.

8. Artículo aceptado

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Protein complexes associated with β -catenin differentially influence the differentiation profile of neonatal and adult CD8⁺ T cells

Gerson N. Hernández-Acevedo¹ | Oscar H. López-Portales¹ |
 Darely Y. Gutiérrez-Reyna¹ | Erick Cuevas-Fernández¹ | Linda A. Kempis-Calanis¹ |
 Rosario G. Labastida-Conde¹ | Oscar B. Aguilar-Luviano¹ | Oscar Ramírez-Pliego¹ |
 Salvatore Spicuglia^{2,3} | Bárbara Lino-Alfaro⁴ | Alicia Chagolla-López⁴ |
 Luis E. González-de la Vara⁴ | María Angélica Santana¹

¹Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

²Aix-Marseille University, Inserm, TAGC, UMR1090, Marseille, France

³Equipe Labélisée Ligue Contre le Cancer, Marseille, France

⁴Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, Irapuato, Mexico

Correspondence

María Angélica Santana, Centro de Investigación en Dinámica Celular (IICBA), Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos 62100, Mexico.
 Email: santana@uaem.mx

Funding information

Ecos/Anuies/SEP/CONACYT, Grant/Award Number: M11S01 and M17S02; Programa para el Desarrollo Profesional Docente, Grant/Award Number: Red: Inmunología Molecular de Virus; Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant/Award Number: 168182 and 257188; Ligue contre le Cancer

Abstract

The canonical Wnt signaling pathway is a master cell regulator involved in CD8⁺ T cell proliferation and differentiation. In human CD8⁺ T cells, this pathway induces differentiation into memory cells or a “stem cell memory like” population, which is preferentially present in cord blood. To better understand the role of canonical Wnt signals in neonatal or adult blood, we compared the proteins associated with β -catenin, in nonstimulated and Wnt3a-stimulated human neonatal and adult naive CD8⁺ T cells. Differentially recruited proteins established different complexes in adult and neonatal cells. In the former, β -catenin-associated proteins were linked to cell signaling and immunological functions, whereas those of neonates were linked to proliferation and metabolism. Wnt3a stimulation led to the recruitment and overexpression of Wnt11 in adult cells and Wnt5a in neonatal cells, suggesting a differential connexion with planar polarity and Wnt/Ca²⁺ noncanonical pathways, respectively. The chromatin immunoprecipitation polymerase chain reaction β -catenin was recruited to a higher level on the promoters of cell renewal genes in neonatal cells and of differentiation genes in those of adults. We found a preferential association of β -catenin with CBP in neonatal cells and with p300 in the adult samples, which could be involved in a higher self-renewal capacity of the neonatal cells and memory commitment in those of adults. Altogether, our results show that different proteins associated with β -catenin during Wnt3a activation mediate a differential response of neonatal and adult human CD8⁺ T cells.

KEYWORDS

β -catenin, CBP/p300, CD8⁺ T cells, neonate immunity, proteomics

1 | INTRODUCTION

Human neonates are highly susceptible to infections by intracellular pathogens, which are a major cause of infant morbidity and mortality (World Health Organization, 2017). The function of neonatal T cells is considered to be immature, skewed, and tolerant. Under very strong stimulation, however, neonatal cells are capable of adult-level T-cell responses, indicating their high activation threshold (Adkins, Leclerc, & Marshall-Clarke, 2004).

The Wnt signaling pathways are master regulators of development and multiple biological functions, including antagonist roles in undifferentiated cell renewal and differentiation (Teo & Kahn, 2010). There are 19 mammalian Wnt proteins that can be recognized by 10 frizzled (Fzd) receptors and different coreceptors, the combination of which determine the signaling pathway and outcome of the cell. The canonical pathway can be activated by Wnt1, Wnt3a, and Wnt8 and depends on the engagement of Fzd and low-density lipoprotein-receptor-related proteins (LRP) 5/6. It relies on the stabilization of β -catenin, through the disassembly of the β -catenin degradation complex, formed by the scaffold protein axin, adenomatous polyposis coli (APC), glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β), and casein kinase 1 (CK1). In the absence of Wnt signals, β -catenin is phosphorylated by GSK3 β , a mark that provokes its ubiquitination and degradation. Once the Wnt signal is received, β -catenin is stabilized in the cytosol and forms protein complexes that mediate its import to the nucleus and activation of gene expression, which is mediated by the T cell factor (TCF) and Lymphoid enhancer-binding factor (LEF) family of transcription factors (MacDonald, Tamai, & He, 2009). The noncanonical Wnt-dependent signaling pathways are broadly grouped into the Wnt/Ca²⁺ signaling pathway and the planar polarity pathway. Wnt5a, with coreceptors Ror1/2, has been associated with the activation of the Wnt/Ca²⁺ pathway and Wnt11 with the planar polarity pathway.

The protein complexes associated with the β -catenin translocate to the nucleus and associate with the transcription factors TCF and LEF to displace the GROUCHO family of proteins, to allow the transcription of the target genes (Gao, Xiao, & Hu, 2014). The later are inhibitors of gene transcription that keep the Wnt-responsive-genes silenced. In addition, the transcription factors TCF and LEF themselves have histone deacetylase activities and also contribute to gene silencing in the absence of activating protein complexes (Cadigan & Waterman, 2012). Gene expression mediated by the canonical pathway is complex, as it depends on the composition of the protein complexes associated with β -catenin and the cell context (Nakamura, de Paiva Alves, Veenstra, & Hoppler, 2016).

Among the proteins associated with the β -catenin complex in the nucleus are the coactivator proteins p300 and CBP. These highly homologous proteins have a role as scaffold proteins in chromatin opening for transcription of enhancers and genes (Dyson & Wright, 2005; Goodman & Smolik, 2000; Ogryzko, Schiltz, Russanova, Howard, & Nakatani, 1996; Teo & Kahn, 2010). In association with β -catenin, opposite effects of CBP and p300 have been reported. The inhibition of the association of β -catenin with either CBP or p300 results in different outcomes of the cells. CBP association with the

β -catenin is essential for the expression of genes involved in self-renewal of stem cells, whereas p300-containing complexes mediate transcription of differentiation-related genes (Teo & Kahn, 2010). A dual role for CBP and p300 was also described during myocytes, differentiation. Using mutant forms of CBP and p300, it was shown that p300, but not CBP, is important for cell differentiation *in vivo* (Roth et al., 2003). Again, in colorectal cancer, in which a role of Wnt signaling has been clearly established in cell transformation, it was found that CBP promotes proliferation and is a marker of bad prognosis, whereas p300 is important for differentiation of these cells (Bordonaro & Lazarova, 2015). These reports suggest that p300 and CBP associated with β -catenin act as a switch that promotes either differentiation or cell renewal, respectively.

The involvement of the Wnt- β -catenin pathway in CD8⁺ T cell differentiation into memory precursor effector cells (MPEC), but not into short lived effector precursor cells (SLEC), was demonstrated in adult mice models *in vivo*. It was clearly shown that the pathway is active in naive, MPECs, and memory cells, but is silenced in SLECs and effector cells (Boudousquie et al., 2014; Gattinoni et al., 2009). In addition, the activation of the canonical Wnt signaling pathway also induces a phenotype that has been called “stem cell memory like (TSCM)”. These are self-renewing multipotent CD8⁺ T cells that have a mixed phenotype between memory and stem cells, which could be useful for bone marrow transplantation purposes and immune-cell-mediated cancer treatments (Forget et al., 2012; Li et al., 2014; Scholz et al., 2016). The TSCM phenotype is enriched in neonatal as compared with adult blood (Xu et al., 2016).

We have previously shown that human neonatal CD8⁺ T cells have a distinctive transcriptomic and epigenetic landscape, characterized by the expression of genes involved in cell cycle and innate immunity. We also found that neonatal cells have an increased homeostatic proliferation, but reduced clonal expansion and effector functions. Several transcription factors were found differentially expressed between adult and neonatal cells, including the β -catenin-dependent TCF4 and LEF1 factors (Galindo-Albarran et al., 2016).

Our aim in this study was to understand the potential dual role of β -catenin-mediated signaling in the maintenance of cell renewal capacity and differentiation of neonatal and adult human CD8⁺ T cells. For this, we made a proteomic identification of the proteins that associate with β -catenin in human neonatal and adult CD8⁺ T cells, before and after stimulation with Wnt3a. We found common and differentially recruited proteins in the neonatal and adult cells that were involved in the formation of complexes with different biological activities. In the adult cells, the complexes formed were associated with the control of immunological function and cell signaling, whereas in those of neonates with proliferation and metabolism. A notable difference was the Wnt3a-induced association of β -catenin with Wnt11 in the adult cells complexes and Wnt5a in those of neonates, which were accompanied by a differential overexpression of these proteins. This suggests an alternative connexion of Wnt3a-activated cells with the cell polarity pathway in adult cells and Wnt/Ca²⁺ in the neonatal samples. Evaluation of β -catenin recruitment to the promoters of target genes showed a

higher enrichment of β -catenin to the promoters of proliferation genes in the neonatal cells. Finally, we found that β -catenin preferentially recruits CBP in neonatal cells and p300 in those of adults. Altogether our results suggest that a cellular switch, mediated by β -catenin-associated protein complexes, could participate in the control self-renewal or differentiation of human CD8⁺ T cells. This clarifies the role of the canonical Wnt signaling pathway in CD8⁺ T cell populations, which are considered for immunological cancer treatments and cell replenishment in transplantation procedures.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell preparation

Adult CD8⁺ T cells were obtained from leukocyte concentrates of healthy adult (Walham, MA) donors from Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea, Cuernavaca, Mexico. Neonatal blood was collected from the cord vein of full-term vaginal deliveries of healthy babies at Hospital General Parres, with informed consent of mothers. Blood was collected just after the deliveries and before placental expulsion. The Ethical Committee of Hospital Parres approved this procedure. Total blood was separated with ficoll-hypaque gradient and incubated overnight for plastic adhesion and monocytes depletion. For CD8⁺ T cell purification, we remixed peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with 2ml of cultured erythrocytes from the same donor and depleted the unwanted cells with RosetteSep™ CD8⁺ T cell enrichment cocktail (15063; StemCell Technologies, Canada). The cells were further purified by depletion of CD45RO⁺, CD44⁺, and B220⁺ cells with Protein A/G magnetic beads (8803; Pierce; Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), ligated to the corresponding antibodies (CD45RO: UCHL1; CD44: IM7 and B220: RA3-6B2; eBiosciences, San Diego, CA). This method allowed us to have more than 94% naive CD3⁺CD8⁺ T cells (Figure S1). The cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) supplemented with 1% L-glutamine, antibiotics (100U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin) and 5% fetal calf serum under 5% CO₂ at 37°C. For all experiments, the cells were left untreated or stimulated with Wnt3a recombinant protein (149122; R&D systems, McKinley, Minneapolis, MN), 50ng/ml for 12hr.

2.2 | Flow cytometry

Antibodies recognizing the following molecules coupled to the indicated fluorochromes were used to assess the purity of the cell preparations: PE anti-human CD8 α (Hit8aOKT8; 50-0089-T100; Tonbo Biosciences), FITC anti-human CD3 (OKT3; 35-0037-T100; Tonbo Biosciences), APC anti-human CD45RO (UCHL1; 20-0457-T100; Tonbo Biosciences). The cells were subsequently washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% fetal calf serum (FCS) and resuspended for fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. Flow cytometry was performed on the FACSCanto cytometer using the BD FACSDiva software. Data analysis was performed using the FlowJo software (FlowJo, LLC).

2.3 | Immunoprecipitation

The cells were left untreated or incubated in 24-well plates with Wnt3a for 12hr. After washing twice with PBS, cells were lysed in lysis buffer (137mM NaCl, 20mM Tris pH 8, 1% NP-40, 10% glycerol, 50mM NaF, 2mM ethylenediaminetetraacetic acid and 4% protease inhibitor cocktail [P8340; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO]). After clearance by centrifugation at 16,000g for 30min at 4°C, lysates were incubated with 2 μ g of anti- β -catenin antibody (E-5; sc-7963; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) at 4°C for 2hr, followed by incubation overnight with protein A/G magnetic beads (8803; Pierce; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Beads were washed three times with PBS, using a magnetic separation rack to retain marked cells, after which samples were boiled in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (SDS 12%, Tris base 0.6M pH 6.8, bromophenol blue 1.2 μ g/ml, and β -mercaptoethanol 5%). An example of the total proteins and immunoprecipitated proteins is shown in Figure S2.

2.4 | Mass spectrometry analysis

The β -catenin immunoprecipitates were concentrated in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) pre-gel. The bands were then cut, and the gel fragments were washed sequentially with 50% (v/v) acetonitrile in water (acetonitrile mixed with 100mM ammonium bicarbonate [1:1] and 100% acetonitrile as previously described; Lino, Carrillo-Rayas, Chagolla, Gonzalez, & de la Vara, 2006). The proteins in the gel fragments were then reduced, carbamidomethylated, and digested with trypsin, and the resulting peptides were extracted from the gel, as previously described (Shevchenko, Wilm, Vorm, & Mann, 1996).

These peptides were analyzed by mass spectrometry as described (Garcia Montes de Oca et al., 2016) and separated in a nanoAcquity Nanoflow LC System (Waters Corp., Milford, MA). The peptides were first trapped in a precolumn (Symmetry® C18, 5 μ m, 180 μ m \times 20mm; Waters) and then were separated in a 10-cm capillary ultra high performance liquid chromatography (UPLC) column (100- μ m ID BEH-C18 1.7 μ m particle size) that was run at 35°C with the following gradient: 3–50% Solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile) in Solvent A (0.1% formic acid in water) for 30min, 50–85% B (1min), 85% B (7min), and 3% B (22min). The separated peptides were directly electrosprayed into a linear ion trap LTQ Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) that was equipped with a nanoelectrospray ion source and controlled by the Xcalibur 2.1 software. This spectrometer was operated in data-dependent acquisition mode, automatically alternating a full-scan (m/z 400–2,000) spectrum with a collision-induced dissociation spectrum of the most abundant peptide ions.

The data were analyzed using the X!Tandem search engine on a LabKey or a Trans Proteome Pipeline (Deutsch et al., 2010) platform, and the results were validated with the PeptideProphet and ProteinProphet software. The fragmentation spectra were compared with theoretical two H. Sapiens Refseq databases that were obtained from NCBI: one with lymphocyte-related protein sequences and the other with proteins involved in the Wnt signaling pathway. The following search parameters were used: constant modifications,

carbamidomethylated C, variable modifications, and oxidized M. The ion-mass tolerances were 4 Da for precursor ions and 2Da for fragmentation products. Two separate experiments with an equivalent amount of identified proteins were analyzed. To include proteins for further analysis, we selected those in which the ProteinProphet probability was >0.95, with at least four unique identifying peptides per protein and that were identified in the two experimental samples. All identified proteins are presented in Tables S1 and S2.

2.5 | Protein analysis

We performed functional analysis to the differentially β -catenin-associated proteins under nonstimulated or Wnt3a-stimulated conditions from neonate or adult CD8⁺ T cells. For this, we used the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery software in connection with the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes PATHWAY, UP KEYWORDS (Uniprot), and Gene Ontology Consortium: Biological Process and Interprot. We took Benjamini corrected p values for significant differences between neonatal and adult CD8⁺ T cell samples. For interactome analysis, we used String 10.5 to predict protein interactions and visualized protein complexes with the Cytoscape 3.5.1 software.

2.6 | Chromatin immunoprecipitation

After stimulation, the cells were washed with PBS and cross-linked in 1% formaldehyde for 20min. The reaction was stopped with 0.22M glycine. The nuclei were isolated and sonicated for 20min with pulse 10s and 60% amplitude to yield fragments of 300–500 base pairs. After purification by centrifugation with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1; pH 8), cross-linked protein/DNA complexes were immunoprecipitated with 2 μ g of anti- β -catenin antibody (E-5; sc-7963; Santa Cruz Biotechnology). Total chromatin was used as a control (input). Both input and immunoprecipitated chromatin was reversed cross-linked by heating at 50°C for 12hr, and DNA was purified with mini columns (Expin PCR SV; Genall) and quantitated with a high sensitivity dsDNA kit in the Qubit fluorometer (Thermo Fischer Scientific).

2.7 | Real-time polymerase chain reaction

For gene expression evaluation, cells were centrifuged, washed, and placed in Trizol (15596-018; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific) before freezing. RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. The integrity of the RNA was determined by electrophoresis and quantified with Qubit RNA HS kit in a Qubit fluorometer. Complementary DNA was synthesized from total RNA using RevertAid Reverse Transcriptase (SO131; Thermo Fisher Scientific). Quantitative polymerase chain reactions (qPCRs) were performed using SYBR Green PCR Master Mix (4309155; Life Technologies; Thermo Fisher Scientific). The messenger RNA (mRNA) levels were calculated with

standard curves for each gene and were reported relative to those of GAPDH gene as standard.

Specific oligonucleotides were designed to amplify regions corresponding to the mRNA of the genes (Table S3). The mRNA sequence of the specific isoforms of the aforementioned genes was obtained from the NCBI database. Subsequently, these sequences were entered into the Primer-BLAST online program to ensure specificity of the amplicon.

For evaluation of the β -catenin associated with specific gene promoters, chromatin immunoprecipitation analysis was performed, followed by qPCR. Specific primers in the gene promoters, containing TCF/LEF binding motifs, were selected using the “Eukaryotic Promoter Database” (<http://epd.vital-it.ch/>) to find promoters from the position -1,000 to +100 of the gene. “Matinspector” analysis available at www.genomatix.de allowed us to find the TCF-1/LEF1 binding motifs. Regions with more than one motif were chosen. Oligos were obtained as described above, from a region -250 to +250 of the motifs. Sequences are shown in Table S3.

All amplicons produced a single peak after denaturation, indicating a single amplicon.

2.8 | Immunoblots

Protein extracts or β -catenin immunoprecipitates were boiled with sample buffer for 5min at 100°C and separated on a PAGE 4–12% mini-gel (mini-PROTEAN®). Proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride membrane in a wet chamber (Bio-Rad) at 400mA for 4hr. The membrane was blocked with TBST (TBS: Tris base 19mM, NaCl 137mM, pH=7.8 and TBST: Tris Based Saline containing+Tween 20), 1% fat free milk for 1hr at room temperature and subsequently incubated with anti- β -catenin (E-5; Santa Cruz Biotechnology), anti-CBP (C-1; Santa Cruz Biotechnology), anti-P300 (C-20; Santa Cruz Biotechnology), anti-wnt5a (ab174963; Abcam, UK), anti-wnt11 (Ab31962; Abcam) or anti- β -actin antibodies (rabbit polyclonal immunoglobulin G [IgG]; Santa Cruz Biotechnology). The membrane was washed with TBST three times and subsequently incubated with anti-mouse IgG-HRP (DO80; Santa Cruz Biotechnology) anti-rabbit IgG-HRP (LO204; sc-2301; Santa Cruz Biotechnology) for 2hr at room temperature. After washing the membrane with TBST and TBS, membranes were treated with enhanced chemiluminescence western blotting detection reagent (PE191121; 32132; Pierce® ECL Plus, Appleton, WI) and bands were revealed with radiography films Medical X-ray General Purpose Blue (825 024; Ref 604 0331; Kodak, Rochester, NY). Densitometry analysis was performed with ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

3 | RESULTS

3.1 | Differences in β -catenin-associated proteins in neonatal and adult CD8⁺ T cells

The canonical Wnt signaling pathway controls the antagonist responses of cell renewal and differentiation. To get insights into the proteins involved in neonatal and adult CD8⁺ T cells responses,

we purified naive CD8⁺ T cells (Figure S1) and immunoprecipitated β -catenin from protein extracts of untreated or Wnt3a-stimulated cells. Proteins were identified by mass spectrometry analysis from two independent experiments of each cell population (Tables S1 and S2). Under the untreated conditions, a total of 101 and 96 proteins were identified in the adult and neonatal samples, respectively, with 40 common proteins (Figure 1a). After stimulation with Wnt3a, the number of recruited proteins increased about 4-fold, to 455 and 451 in adult and neonatal cells, respectively, with 402 common proteins (Figure 1c).

The functional analysis of the cell-type specific β -catenin-recruited proteins showed conserved functions and also differences between neonatal and adult cells (Figure 1b). Among the differential functions, we found that in the nonstimulated adult samples, β -catenin-associated proteins were involved in a cell polarity pathway and were rich in kinase-like domains, armadillo fold, and shisa family of proteins. Armadillo is a common fold domain present in β -catenin and Wnt signaling transduction proteins, whereas the Shisa family refers to proteins that control the maturation and trafficking of Fzd receptors to the cell membrane. In the neonatal cells, the β -catenin-associated proteins were enriched in the melanogenesis pathway and in neural differentiation and Fzd-binding GOTerms. Fzd receptors associated with β -catenin under the nonstimulated conditions were only found in the neonatal cells. The enrichment in the melanogenesis pathway could relate to the high reactive oxygen species production of the neonatal cells (Galindo-Albarran et al., 2016). The neural differentiation GOTerm could refer to the recruitment of presenilin1 and associated proteins in the neonatal

immunoprecipitates, which suggests a connection with the Notch Pathway in these cells.

The proteins identified after Wnt3a stimulation in adult cells (Figure 1d) were associated with a higher activity of the Wnt signaling pathway and were rich in kringle, shisa, and kinase proteins. The recruitment of kinases is in agreement with a higher expression of signaling proteins in adult CD8⁺ T cells (Galindo-Albarran et al., 2016). The proteins with kringle domains are binding mediators and regulators of proteolytic activity. In the neonatal cells, the recruited proteins were associated with proliferation, stemness, and hippo signaling pathway that regulates cell proliferation, apoptosis, and stress responses. Altogether, these results suggest a mature, highly controlled, Wnt signaling pathway in the adult CD8⁺ T cells. In the neonatal cells, however, our results suggest the involvement of this pathway in stemness, cell cycle, and developmental processes.

Next, we focused our analysis on the differences of β -catenin-immunoprecipitated proteins between neonatal and adult CD8⁺ T cells within the Wnt signaling pathway (Figure 2). Orange color refers to common proteins, red to adult-specific proteins, and blue to neonatal-specific proteins. In the nonstimulated neonatal cells (Figure 2a), we found Wnt5b and Wnt8a, whereas in the adult cells, Wnt9b was recruited. Wnt5b is related to cell migration in cancer cells and estrogenic differentiation (Harada et al., 2017). Little is known about Wnt8a and Wnt9, except that they participate in development. Only in the adult's samples, the association of LEF and TCF with β -catenin complexes was found under basal conditions, and only in the neonatal cell samples, Fzd receptors were found to be associated with β -catenin.

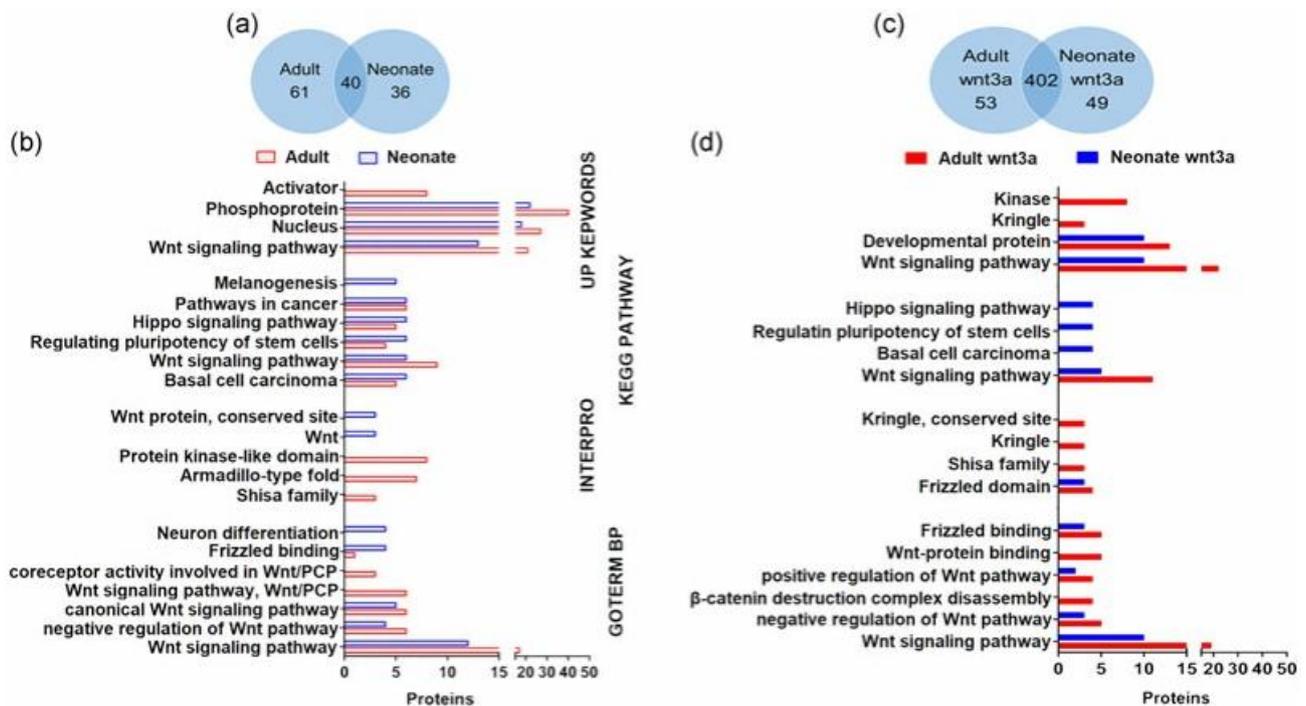


FIGURE 1 Functional analysis of β -catenin immunoprecipitates. (a) and (b) Proteins from nonstimulated or (c) and (d) Wnt3a-stimulated CD8⁺ T cells. (a) and (c) Venn diagrams indicating the adult and neonatal cells exclusive and common proteins. (b) and (d) Functional analyses of neonatal (blue) and adult (red) specifically recruited proteins [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

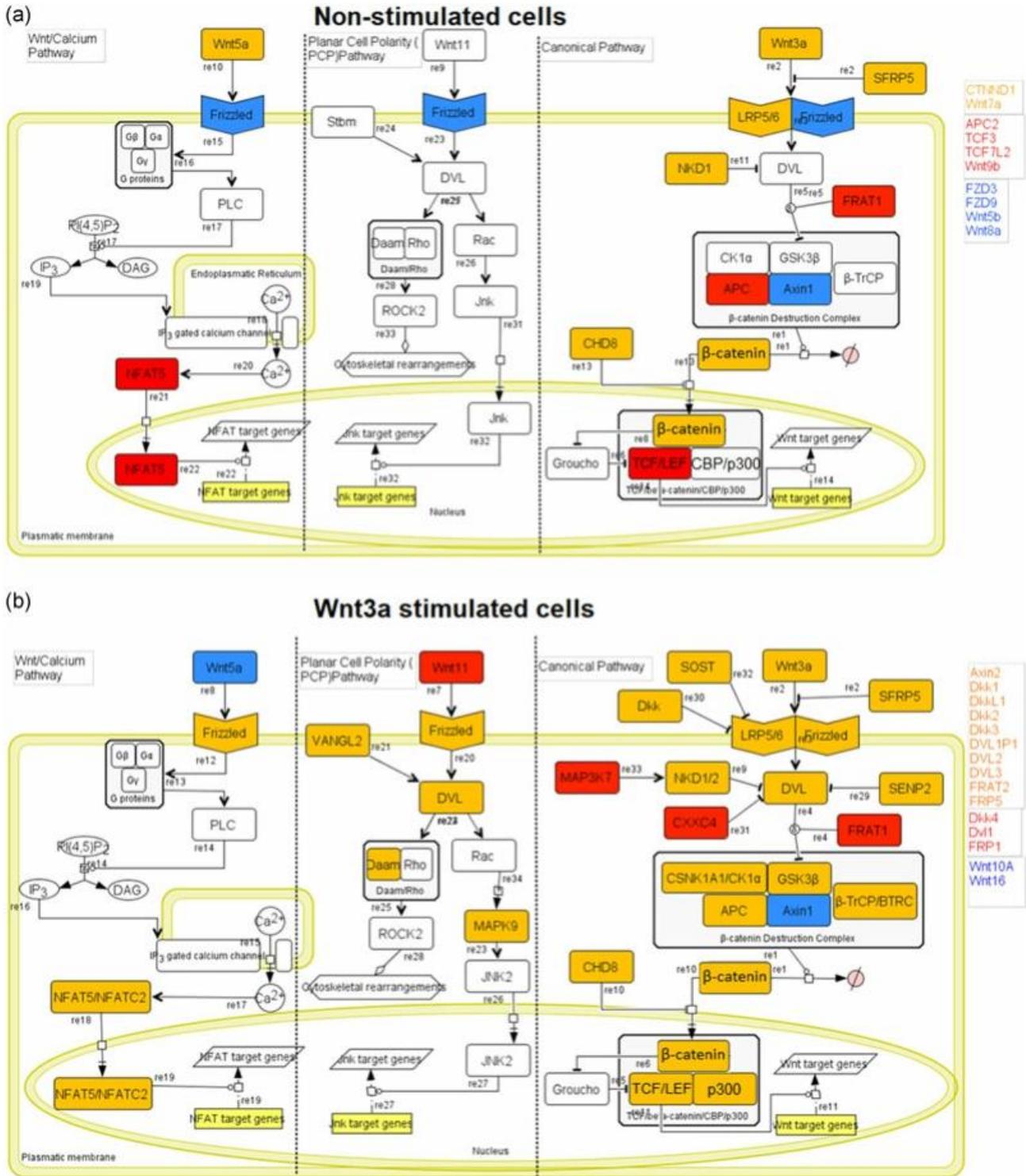


FIGURE 2 β -Catenin-associated proteins in Wnt pathways. Proteins from (a) nonstimulated and (b) Wnt3a-stimulated CD8⁺ T cells. Proteins only found in neonatal cells are depicted in blue, in adult cells in red, and in both cells in orange. The diagram was created in Cell Designer® [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

In the Wnt3a-stimulated cells (Figure 2b), the number of proteins associated with β -catenin was increased, as expected. Under these conditions, recruitment of Fzd receptors was found both in neonatal and adult cells as well as in all the proteins of the β -catenin degradation complex and transcription factors TCF and LEF. Only in adult cells, MAP3K7 transforming growth factor beta-activated kinase (Tak1),

frequently rearranged in advanced T cell lymphomas (FRAT1), and CXXC4 were recruited, indicating a connection with mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, ATM-dependent DNA damage control, and control of Wnt signaling, respectively. Although in the stimulated cells, Axin2 was found in both cell populations, Axin1 was only recruited in the neonatal cells and in untreated and Wnt3a-treated samples. A

differential role of Axin1 and Axin2 has been reported; the latter is more associated with the destruction complex activity (Thorvaldsen, Pedersen, Wenzel, & Stenmark, 2017). Differences in the recruitment of Wnt proteins were also found in the Wnt3a-stimulated cells. Wnt5a, Wnt10A, and Wnt16 were recruited only in neonatal cells, and Wnt11 only in the adult samples, suggesting the connexion with two independent branches of the noncanonical Wnt pathways in the cells from the two different age populations. Wnt11 induces the cell polarity pathway that is more strongly related to cell differentiation (Cohen, Tian, & Morrisey, 2008; Lange, Mix, Rateitschak, & Rolfs, 2006; Terami, Hidaka, Katsumata, Iio, & Morisaki, 2004) and Wnt5a with calcium signaling. Higher calcium waves have been reported in neonatal T cells (Palin, Ramachandran, Acharya, & Lewis, 2013).

In neonatal cells, we also found presenilin1 in the β -catenin complexes. This protein is the catalytic subunit of the γ secretase complex (PS-1) and is probably related to a connexion with the Notch signaling pathway. On the contrary, only in adult cells, the MAPKKK Tak 1 and the nucleic acid binding protein Sbp1 were recruited in the β -catenin complexed proteins, suggesting a link with the MAPK and p53 signaling pathways, respectively. Differences were also found in members of Dkk, DVL, and axin family proteins, all of which are controlling proteins of the canonical pathway. Altogether, our results show that the differences in proteins recruited by the β -catenin immunoprecipitates from neonatal and adult CD8⁺ T cells could be biologically significant.

3.2 | Interactome analysis of the β -catenin-immunoprecipitated proteins

To identify the protein complexes formed by the specific β -catenin-recruited proteins in neonatal and adult cells, we analyzed the interactome (Figure 3). The protein complexes from neonatal cells were mostly involved in positive regulation of cell cycle, chromatin remodeling, calcium pathways, and metabolism. Three proteins involved in several of the neonatal complexes were Wnt5, Axin1, and presenilin1. Wnt5a was involved in complexes associated with calcium metabolism and proliferation, in association with the replication-dependent histone Hist1H4H. Axin1 was involved in complexes related to proliferation, microtubule organization, and ubiquitination. Presenilin1 is a protease that cuts the Notch receptor during the Notch pathway activation. A role of the Notch signaling pathway, in association with the Wnt pathway, has been described during CD8⁺ T cells differentiation into stem-cell-memory-like populations (Kondo et al., 2017).

The preferentially recruited proteins in adult cells were more associated with the regulation of immune system processes, kinases activities, and cell signaling. The protein SFRP1, member of the soluble frizzled-related proteins, was present in adult cell complexes. This protein is a negative modulator of Wnt signaling, leading to a reduction in β -catenin levels and to an inhibition of proliferation in vascular cells (Ezan et al., 2004). Also central in adult cells complex's formation were MAP3K7 (Tak) and Wnt11.

The specific complexes formation in adult and neonatal cells could be the result of increased gene expression of the

population-specific complexes or posttranslational modifications. We thus evaluated the expression of six of the genes involved in the formation of the specific complexes in both cell's populations. As shown in Figure 4a, wnt5A was only detected in the neonatal cells, both untreated and Wnt3a stimulated. psen-1 and axin2 expression did not change as compared with adult cells or as a result of stimulation. For the adult genes, wnt11 and sfrp1 were overexpressed in adult cells, the later only under Wnt3a-stimulated conditions. The overexpression of Wnt5A in neonatal cells and of Wnt11 in the adult samples was also found at the protein level (Figure 4b)

Altogether these experiments show that some the differentially recruited proteins could be the result of differential gene expression and corroborate that different protein complexes in neonatal and adult CD8⁺ T cells could be responsible for the enriched presence of TscM phenotype in cord blood cells.

3.3 | Association of β -catenin with gene promoters differs in neonatal and adult cells

The differences in protein complexes recruited by β -catenin in neonatal and adult CD8⁺ T cells prompted us to investigate whether there is a differential recruitment of β -catenin to gene promoters in the neonatal and adult cells. For this, we performed experiments of chromatin immunoprecipitation followed by qPCR (ChIP-qPCR) of gene promoters associated with proliferation (birc5, ccnd1, pou5f1, and s100a4), cell signaling (cjun, fra1, fos, and axin2), and differentiation (gzmb, pdrm, and nkd1). As shown in Figure 5, enrichment of β -catenin was higher for birc5, ccnd1, and pou5f1 in the neonatal cells. At basal levels, axin2 promoter was more enriched in β -catenin in the neonatal cells, but after Wnt3a stimulation, adult cells showed enrichment in β -catenin recruitment to the neonatal cell levels.

In the adult cells, a higher enrichment in β -catenin recruitment was observed for fos promoter, both in nonstimulated and Wnt3a-treated cells. Recruitment of β -catenin to the jun promoter only increased in Wnt3a-stimulated adult cells. This is in agreement with the bigger involvement of the MAPK pathways in the adult cells. For gzmb and nkd1, associated with cell differentiation, there was a significant increase in the β -catenin recruitment in the adult cells as compared with those of neonates.

Our gene expression experiments showed that birc5 was overexpressed in the neonatal cells under basal conditions and was not further stimulated by Wnt3a treatment; pou5f1 was only overexpressed in response to Wnt3a in the neonatal cells, and axin2 expression was induced by Wnt3a in the adult cells, to the neonatal cells' basal levels (Figure 5). Only for these three genes, there was a correspondence between β -catenin recruitment and gene expression. Although β -catenin could have a permissive role in the expression of the other genes, their expression is also controlled by other transcription factors, such as the T cells receptor (TCR) inducible factors activator protein 1 (AP-1), nuclear factor kappa-B (NF κ B), nuclear factor of activated T cells (NFAT), and cAMP response element (CREB).

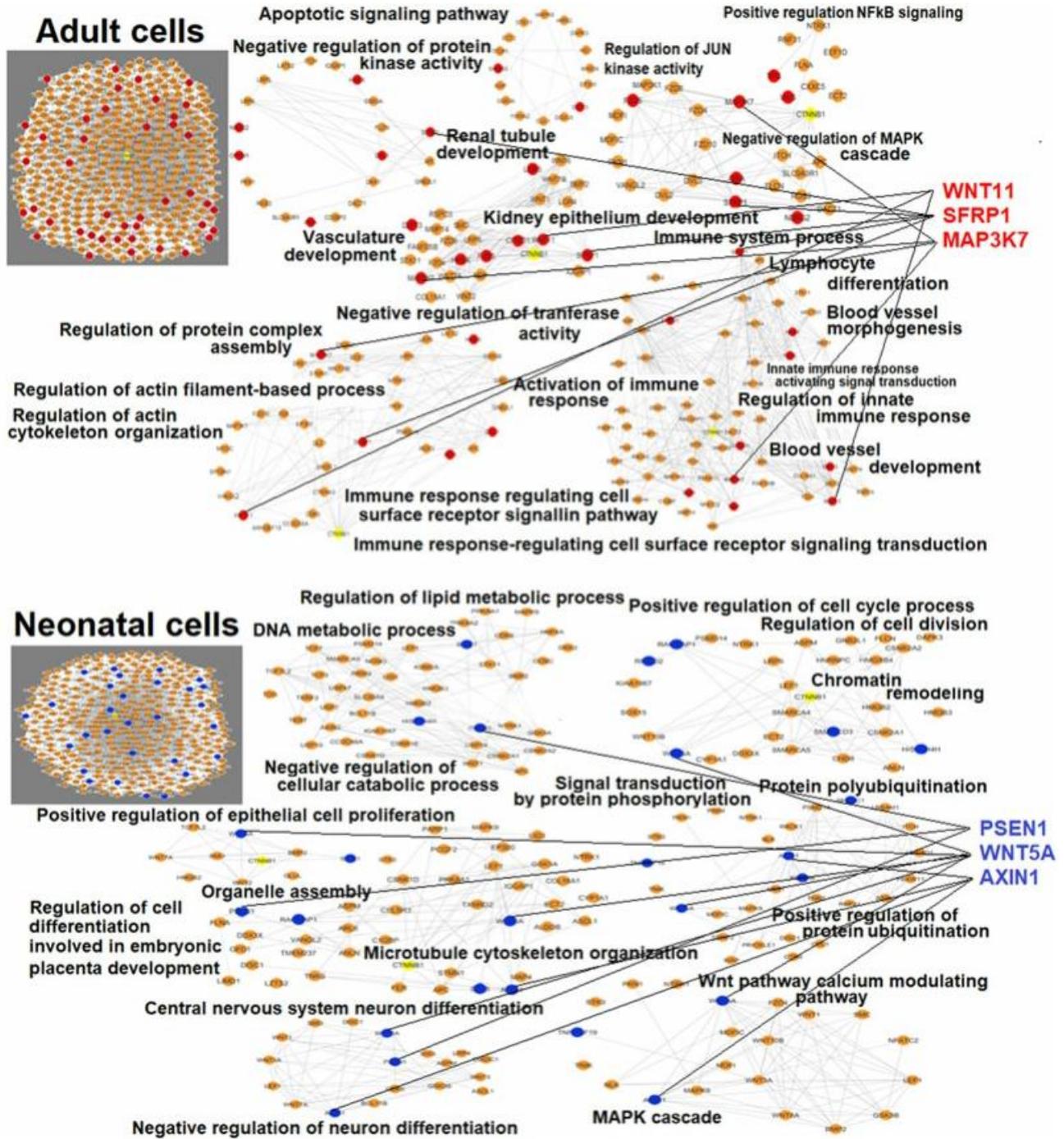


FIGURE 3 Interactome showing a representation of protein complexes recruited by β -catenin. Complexes formed in (a) adult or (b) neonatal CD8⁺ T cells. Red circles represent proteins only recruited in immunoprecipitates from adult cells, blue circles from neonatal cells, and orange circles in both samples. Image created using Cytoscape 3.5.1 [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

3.4 | Association of CBP or p300 with β -catenin in neonate and adult cells

Next, we evaluated specifically the association of CBP or p300 with β -catenin in neonatal and adult cells. It has been proposed that the association of β -catenin with either CBP or p300 is a molecular switch that flips the balance toward proliferation or differentiation of the cells, respectively. CD8⁺ T cells from adult or neonate donors differ in their proliferation versus differentiation profile. Neonatal

cells have a higher stemness capacity and adult cells differentiate preferentially into memory cells and its precursors in response to canonical Wnt signals (Boudousquie et al., 2014; Galindo-Albarran et al., 2016; Gattinoni et al., 2009; Xu, Zhang, Luo, & Li, 2015). In agreement with this notion, our results from the proteomic characterization of the complexes associated with β -catenin in adult cells complexes are balanced toward differentiation and in neonatal cells toward proliferation. To specifically evaluate the association of

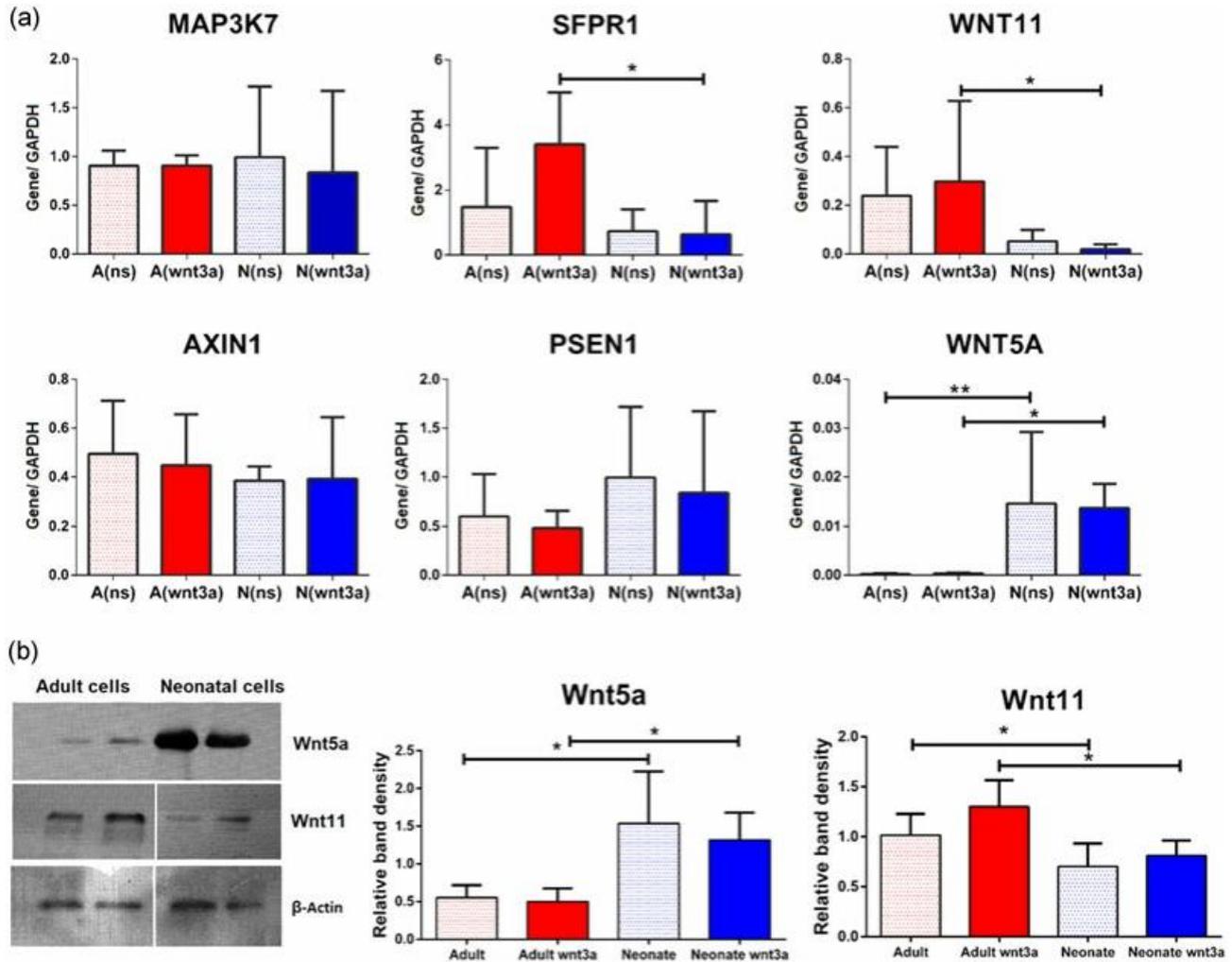


FIGURE 4 Expression of genes involved in complexes' formation. Neonatal or adult naive CD8⁺ T cells were left untreated or stimulated with Wnt3a for 12hr. Gene expression was evaluated by (a) RT-qPCR, using GAPDH as a control gene. (b) Western blots from total protein samples. Experiments were performed from at least three independent samples of neonatal or adult cells. **p* < 0.05. RT-qPCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

CBP or p300 with β -catenin in neonatal and adult CD8⁺ T cells, we performed β -catenin immunoprecipitation experiments followed by β -catenin, CBP, and p300 immunoblots. As shown in Figure 6, in neonatal but not adult cells, β -catenin was strongly associated with CBP after Wnt3a stimulation. On the contrary, only adult cells significantly increased their association with p300 after Wnt3a stimulation. Altogether, these results suggest that the preferential association of CBP with β -catenin in neonatal CD8⁺ T cells could be contributing to their stemness phenotype after Wnt3a stimulation. On the contrary, the association of p300 with β -catenin in adult CD8⁺ T cells could predispose their differentiation into memory cells and its precursors.

4 | DISCUSSION

In a previous work, we described that neonatal CD8⁺ T cells have a distinct transcriptomic and epigenetic programming, characterized by

an inflammatory innate response, a high homeostatic proliferation rate, and low signaling and cytotoxic functions (Galindo-Albarran et al., 2016). Among the transcription factors that we found enriched in the neonatal cells were Tcf4 and Lef1, which are the responsive factors of the Wnt signaling pathway. Both neonatal and adult CD8⁺ T cells responded to Wnt3a treatment with an over fourfold increase in the amount of proteins that associated with β -catenin. Although 78% of those proteins were shared between adult and neonatal cells (402 proteins), the specifically recruited proteins (102 proteins) could be determinant for the specific neonatal or adult cells' responses. Adult-specific proteins were associated with phosphorylation, cell polarity, MAPK, and differentiation, whereas those specifically recruited in the neonatal cells were involved in proliferation, metabolism, and development.

In the adult cells, under basal conditions, the association of β -catenin with the transcription factors TCF/LEF and NFAT5 was observed, suggesting the presence of β -catenin already in the nucleus. The pathway regulators APC and FRAT1 were also found

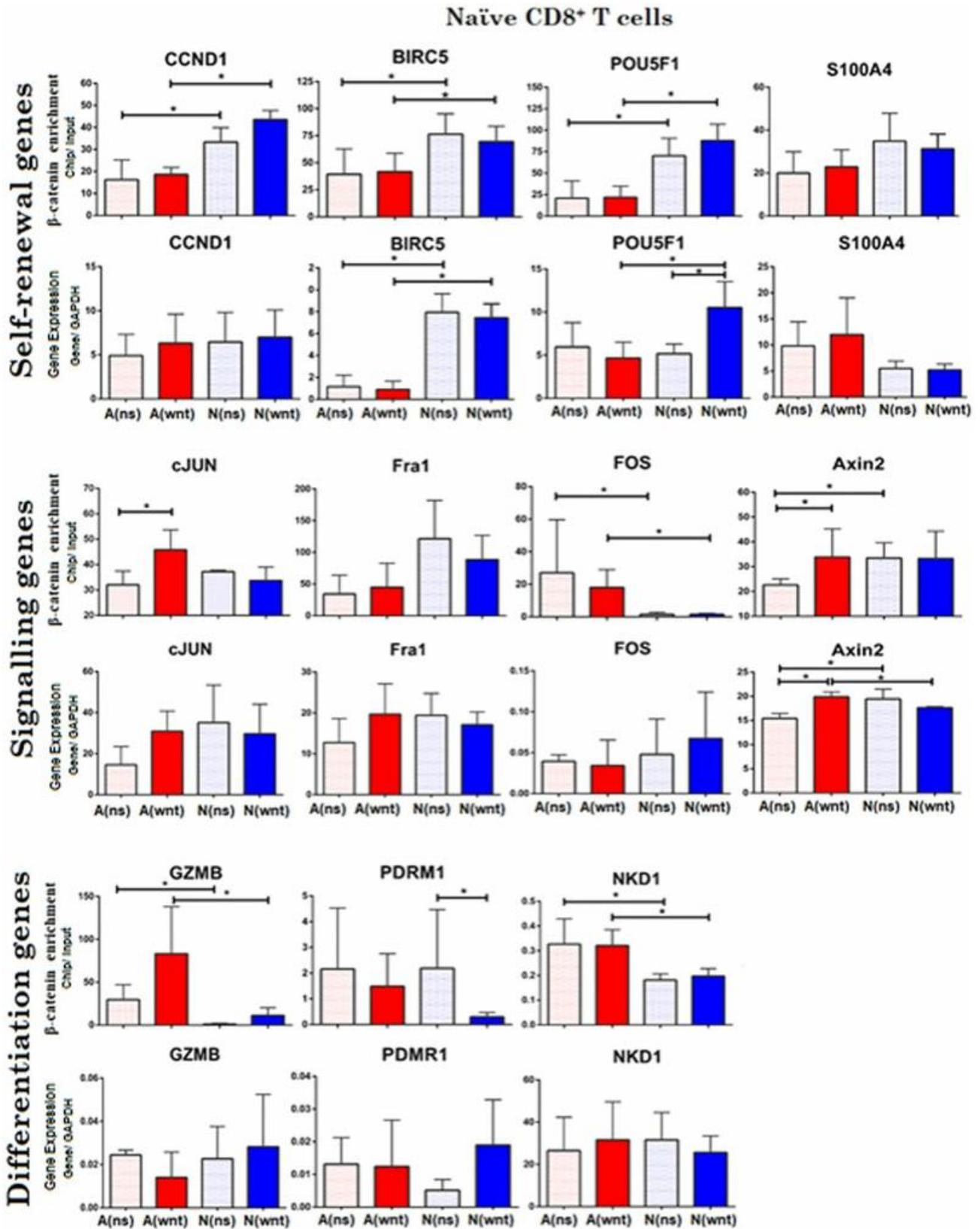


FIGURE 5 β-Catenin bound to gene promoters and gene expression. Primers were designed for the selection of TCF/LEF target genes with self-renewal, signaling or differentiation roles. Upper panels: Enrichment of β-catenin to the promoters of these genes (ChIP/qPCR). Lower panels: gene expression (RT-qPCR). Experiments were performed from at least three independent samples of neonatal or adult cells. **p* < 0.05. ChIP: chromatin immunoprecipitation; RT-qPCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

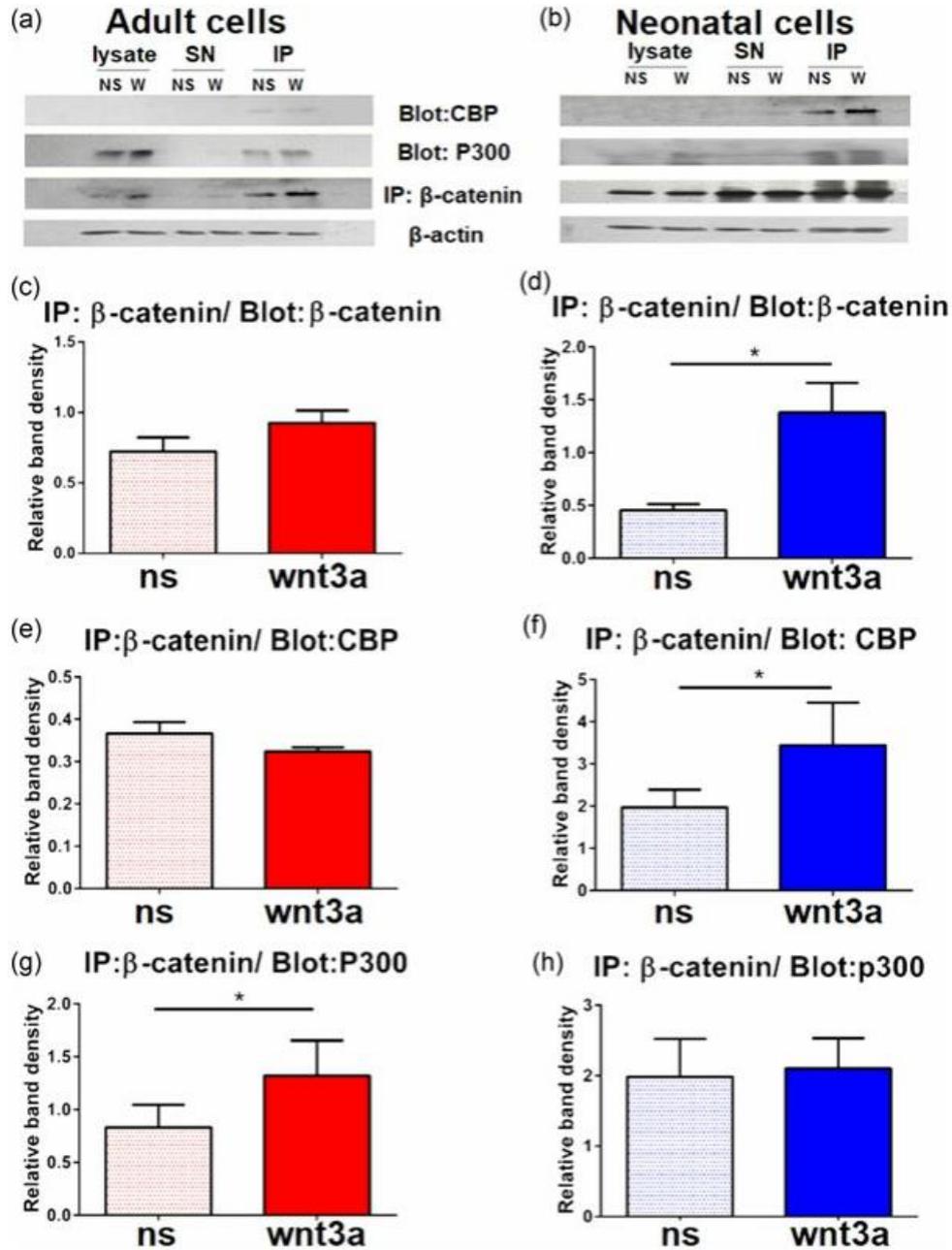


FIGURE 6 β -Catenin, CBP, and p300 immunoblots from β -catenin immunoprecipitates. Protein extracts from nonstimulated (NS) of Wnt3a-stimulated neonatal (right panels) and adult (left panels) CD8⁺T cells were immunoprecipitated with β -catenin antibodies. Representative immunoblots from (a) adult cells and (b) neonatal cells. (c)–(h) Densitometric analysis of immunoblots, results are reported as means \pm SD of three independent experiments and expressed as optical density value calculated with ImageJ; * $p < 0.05$; (b) and (d) β -catenin blots; (e) and (f) CBP blots; (g) and (h) p300 blots. Experiments were performed from at least three independent samples of neonatal or adult cells. * $p < 0.05$. SD: standard deviation [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

in the adult cells immunoprecipitates. This suggests a longer experience with the activity of the pathway in the adult cells, which could be related to the long life of human naive T cells (Vrisekoop et al., 2008). After stimulation, as expected, a bigger proportion of proteins within the Wnt-mediated signaling pathways were found. Among the proteins differentially associated with β -catenin, we retrieved differences in Wnt proteins themselves. In the neonatal cells, Wnt5a was found overexpressed as compared with adult cells, suggesting a link of Wnt3a activation

with the activation of the Wnt/Ca²⁺ signaling pathway. Wnt5a is also related to autophagy induction in response to bacterial infections (Jati et al., 2018), which could be part of an innate-immunity-like response we previously found in neonatal CD8⁺ T cells. In the adult cells, Wnt11 was overexpressed. This protein induces the Wnt cell polarity pathway and signaling through protein kinase C. It is characterized by cytoskeleton reorganization and changes in cell polarity leading to differentiation in several cell types (Terami et al., 2004; Uysal-Onganer et al., 2010).

Interactome analysis of the specifically recruited proteins showed that the complexes from neonatal cells were mostly involved in the positive regulation of cell cycle, chromatin remodeling, calcium pathways, and metabolism. Wnt5a was found central to calcium metabolism and proliferation, which was also associated with the recruitment of the replication-dependent histone Hist1H4H. Others and we have reported an increased homeostatic proliferation in neonatal CD8⁺ T cells (Galindo-Albarran et al., 2016; Marchant & Goldman, 2005; Schonland et al., 2003). The potential involvement of the β -catenin-dependent Wnt signaling pathway in the neonatal cells' proliferation was made evident by the formation of complexes associated with proliferation, the enrichment of β -catenin on the promoters of cell renewal genes, and the induction of these same genes' transcription by Wnt3a signaling. Oct4 (*pou5f1*) was found overexpressed in the neonatal cells, as well as the apoptosis inhibitor survivin (*birc5*), which could be involved in self-renewal.

Also important to the neonatal cells complexes formation was presenilin1, a protease that is involved severing Notch receptor during the pathway activation. A role of the Notch signaling pathway, complementary to the Wnt pathway, has been described for differentiation into stem-cell-memory-like populations (Kondo et al., 2017) and also in Alzheimer disease, associated with a PS-1 mutant, in which the blockage of CBP re-established neuronal differentiation (Teo, Ma, Nguyen, Lam, & Kahn, 2005). The preferentially recruited proteins in adult cells were more associated with immune system processes, regulation of kinase activities, and cell signaling. The protein SFRP1, member of the soluble frizzled-related complexes was central to several of the adult cell complexes. The *sfrp1* gene was found overexpressed in adult Wnt-3a-stimulated cells. These proteins are negative modulators of Wnt signaling, leading to a reduction in β -catenin levels and to an inhibition of proliferation in vascular cells (Ezan et al., 2004). The product of the gene *map3k7* was also only recruited in adult cells. This gene codes for TAK1, an important regulator of cell death, through NF κ B activation and also through NF κ B-independent pathways, such as oxidative stress and receptor-interacting protein-kinase-1-dependent pathway (Lui et al., 2011; Mihaly, Ninomiya-Tsuji, & Morioka, 2014). The nucleic acid binding protein Sbp1 was also recruited to the β -catenin complexed proteins from adult cells, establishing a connexion with the p53 signaling pathway.

To evaluate whether the changes in protein complexes lead to differential recruitment of β -catenin to the promoters of genes associated with self-renewal, signaling, and differentiation, we performed ChIP/qPCR experiments. Enrichment of β -catenin over the input was observed for most of the genes, in both cell populations; however, significant differences between neonatal and adult cells were found. Enrichment of β -catenin was higher in self-renewal associated genes in the neonatal cells. On the contrary, differentiation-associated genes recruited a higher proportion of β -catenin to their promoters in adult cells. This reminded us of the dual role of the Wnt signaling pathway reported for other cell types. It has been reported in stem cells, myocytes, neurons, and cancer cells that the association of CBP or p300 with β -catenin have

opposite roles in the control of self-renewal and differentiation (Bordonaro & Lazarova, 2015; Roth et al., 2003; Teo & Kahn, 2010; Teo et al., 2005). Because of the high homology of CBP and p300, the distinction between both proteins could be clouded in proteomic analysis, in which we only identified p300 associated with both neonatal and adult cells in Wnt3a-treated cells. We thus performed immunoblots to specifically evaluate the interaction of β -catenin with either p300 or CBP, using specific antibodies that distinguish between both proteins. Our results show that in neonatal cells, Wnt3a treatment significantly induced the association of CBP with β -catenin, whereas in adult cells, the same stimulus-induced p300 recruitment. The N-terminal 110 amino acids of CBP or p300 are responsible for the association of these proteins with β -catenin. The affinity of this interaction is mediated by MAPK phosphorylation, in the case of CBP in Ser92 and for p300 by Ser12. Using specific inhibitors, it was determined that Erk could be responsible for the Ser92 phosphorylation of CBP and p38 for Ser12 in p300 (Ma, Guo, Shan, & Xia, 2012; Xia, Guo, & Ma, 2011). Differential activation of Erk or p38 MAPK could thus mediate the differential recruitment of CBP or p300 in neonatal and adult CD8⁺ T cells. A different metabolism in neonatal and adult cells could also explain the differences (Scholz et al., 2016). Our results suggest that a cell switch between differentiation and self-renewal, mediated by p300 versus CBP association with β -catenin, could participate in the higher renewal capacity of neonatal CD8⁺ T and differentiation of adult cells into memory cells.

Altogether, our data show that both neonatal and adult CD8⁺ T cells respond to Wnt3a with a set of cell population-specific proteins that result in a differential recruitment of β -catenin to the promoters of self-renewal or differentiation genes. These proteins may form complexes that could be responsible for the preferential differentiation of adult cells into memory cells and of neonatal cells into Tscm populations. Our results highlight important differences in protein complexes formed in neonatal and adult cell responses to the canonical Wnt signaling, which could be important considerations in managing the neonatal cell responses and cord blood transplantation. In addition, the identification of the complex-forming proteins and potential mechanisms shaping the β -catenin nucleated complexes could be useful for a better control of this important pathway for cancer treatments.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea (Morelos) and Hospital José G. Parres for access to the blood samples. We also thank Dr. Verónica Narváez, Dr. Mario Cruz, and members of the Santana Lab. for helpful discussions and Dr. Agustín Reyez Pérez for advise in proteomic analysis. Work in our laboratories was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (Grants 168182 and 257188 to M. A. S. C.), Programa para el Desarrollo Profesional Docente (Grant: Red: Inmunología Molecular de Virus to M. A. S. C.). Work in S.S. lab was supported by Ligue Contre le Cancer, labelled program. The Ecos-Nord/ANUIES/SEP/CONACYT bilateral program

also supported this work (Grants M11S01 (257857) and M17S02 (291235) to M. A. S. C. and S. S.).

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no conflict of interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

G. N. H.-A. performed a large part of the experiments and wrote manuscript; O. H. L.-P., D. Y. G. R., E. C. F. L. A. K.-C., R. G. L. C., O. B. A.-L., and O. R.-P. performed experimental work; S. S. contributed with the design, discussion, and financing of the study; B. L.-A., A. C.-L., and L. E. G.-V. contributed with proteomics and financing of the study; M. A. S. C. conceived the study, wrote the manuscript, and financed the study.

ORCID

Gerson N. Hernández-Acevedo  <http://orcid.org/0000-0002-6998-0647>

María Angélica Santana  <http://orcid.org/0000-0001-8373-7873>

REFERENCES

- Adkins, B., Leclerc, C., & Marshall-Clarke, S. (2004). Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nature Reviews Immunology*, 4(7), 553–564.
- Bordonaro, M., & Lazarova, D. L. (2015). CREB-binding protein, p300, butyrate, and Wnt signaling in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 21(27), 8238–8248.
- Boudousquie, C., Danilo, M., Pousse, L., Jeevan-Raj, B., Angelov, G. S., Chennupati, V., ... Held, W. (2014). Differences in the transduction of canonical Wnt signals demarcate effector and memory CD8 T cells with distinct recall proliferation capacity. *Journal of Immunology*, 193(6), 2784–2791.
- Cadigan, K. M., & Waterman, M. L. (2012). TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11), a007906.
- Cohen, E. D., Tian, Y., & Morrisey, E. E. (2008). Wnt signaling: An essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal. *Development*, 135(5), 789–798.
- Deutsch, E. W., Mendoza, L., Shteynberg, D., Farrah, T., Lam, H., Tasman, N., ... Aebersold, R. (2010). A guided tour of the Trans-Proteomic pipeline. *Proteomics*, 10(6), 1150–1159.
- Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, 197–208.
- Ezan, J., Leroux, L., Barandon, L., Dufourcq, P., Jaspard, B., Moreau, C., ... Duplaa, C. (2004). FrzA/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo. *Cardiovascular Research*, 63(4), 731–738.
- Forget, M. A., Huon, Y., Reuben, A., Grange, C., Liberman, M., Martin, J., ... Lapointe, R. (2012). Stimulation of Wnt/ss-catenin pathway in human CD8+T lymphocytes from blood and lung tumors leads to a shared young/memory phenotype. *PLoS One*, 7(7), e41074.
- Galindo-Albarran, A. O., Lopez-Portales, O. H., Gutierrez-Reyna, D. Y., Rodriguez-Jorge, O., Sanchez-Villanueva, J. A., Ramirez-Pliego, O., ... Santana, M. A. (2016). CD8+T cells from human neonates are biased toward an innate immune response. *Cell Reports*, 17(8), 2151–2160.
- Gao, C., Xiao, G., & Hu, J. (2014). Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by posttranslational modifications. *Cell & Bioscience*, 4, 13.
- García Montes de Oca, L. Y., Cabellos Avelar, T., Picon Garrido, G. I., Chagoya-Lopez, A., Gonzalez de la Vara, L., Delgado Buenrostro, N. L., ... Gutierrez-Cirlos, E. B. (2016). Cardiolipin deficiency causes a dissociation of the b6c:Caa3 megacomplex in B. subtilis membranes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 48(4), 451–467.
- Gattinoni, L., Zhong, X. S., Palmer, D. C., Ji, Y., Hinrichs, C. S., Yu, Z., ... Restifo, N. P. (2009). Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+memory stem cells. *Nature Medicine*, 15(7), 808–813.
- Goodman, R. H., & Smolik, S. (2000). CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes & Development*, 14(1997), 1553–1577.
- Harada, T., Yamamoto, H., Kishida, S., Kishida, M., Awada, C., Takao, T., & Kikuchi, A. (2017). Wnt5b-associated exosomes promote cancer cell migration and proliferation. *Cancer Science*, 108(1), 42–52. <https://doi.org/10.1111/cas.13109>
- Jati, S., Kundu, S., Chakraborty, A., Mahata, S. K., Nizet, V., & Sen, M. (2018). Wnt5A signaling promotes defense against bacterial pathogens by activating a host autophagy circuit. *Frontiers in Immunology*, 9, 679.
- Kondo, T., Morita, R., Okuzono, Y., Nakatsukasa, H., Sekiya, T., Chikuma, S., Yoshimura, A. (2017). Notch-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy. *Nature Communications*, 8, 15338–15352.
- Lange, C., Mix, E., Rateitschak, K., & Rolfs, A. (2006). Wnt signal pathways and neural stem cell differentiation. *Neurodegenerative Diseases*, 3, 3–86.
- Li, L., Kim, H. T., Nellore, A., Patsoukis, N., Petkova, V., McDonough, S., ... Boussiotis, V. A. (2014). Prostaglandin E2 promotes survival of naive UCB T cells via the Wnt/beta-catenin pathway and alters immune reconstitution after UCBT. *Blood Cancer Journal*, 4, e178–e178.
- Lino, B., Carrillo-Rayas, M. T., Chagolla, A., Gonzalez, & de la Vara, L. E. (2006). Purification and characterization of a calcium-dependent protein kinase from beetroot plasma membranes. *Planta*, 225(1), 255–268.
- Lui, T. T., Lacroix, C., Ahmed, S. M., Goldenberg, S. J., Leach, C. A., Daulat, A. M., & Angers, S. (2011). The ubiquitin-specific protease USP34 regulates axin stability and Wnt/beta-catenin signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 31(10), 2053–2065.
- Ma, H., Guo, M., Shan, B., & Xia, Z. (2012). Targeted functional analysis of p300 coactivator in Wnt/beta-catenin signaling pathway using phosphoproteomic and biochemical approaches. *Journal of Proteomics*, 75(9), 2601–2610.
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, 17(1), 9–26.
- Marchant, A., & Goldman, M. (2005). T cell-mediated immune responses in human newborns: Ready to learn? *Clinical and Experimental Immunology*, 141(1), 10–18.
- Mihaly, S. R., Ninomiya-Tsuji, J., & Morioka, S. (2014). TAK1 control of cell death. *Cell Death and Differentiation*, 21(11), 1667–1676.
- Nakamura, Y., de Paiva Alves, E., Veenstra, G. J., & Hoppler, S. (2016). Tissue- and stage-specific Wnt target gene expression is controlled subsequent to beta-catenin recruitment to cis-regulatory modules. *Development*, 143(11), 1914–1925.
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H., & Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87, 953–959.
- Palin, A. C., Ramachandran, V., Acharya, S., & Lewis, D. B. (2013). Human neonatal naive CD4+ T cells have enhanced activation-dependent signaling Regulated by the MicroRNA miR-181a. *The Journal of Immunology*, 190(6), 2682–2691. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.120253>

- Roth, J. F., Shikama, N., Henzen, C., Desbaillets, I., Lutz, W., Marino, S., ... Eckner, R. (2003). Differential role of p300 and CBP acetyltransferase during myogenesis: p300 acts upstream of MyoD and Myf5. *The EMBO Journal*, 22(19), 5186–5196.
- Scholz, G., Jandus, C., Zhang, L., Grandclement, C., Lopez-Mejia, I. C., Sonesson, C., ... Romero, P. (2016). Modulation of mTOR signalling triggers the formation of stem cell-like memory T cells. *EBioMedicine*, 4, 50–61.
- Schonland, S. O., Zimmer, J. K., Lopez-Benitez, C. M., Widmann, T., Ramin, K. D., Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2003). Homeostatic control of T-cell generation in neonates. *Blood*, 102(4), 1428–1434.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68(5), 850–858.
- Teo, J. L., & Kahn, M. (2010). The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(12), 1149–1155.
- Teo, J. L., Ma, H., Nguyen, C., Lam, C., & Kahn, M. (2005). Specific inhibition of CBP/beta-catenin interaction rescues defects in neuronal differentiation caused by a presenilin-1 mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34), 12171–12176.
- Terami, H., Hidaka, K., Katsumata, T., Iio, A., & Morisaki, T. (2004). Wnt11 facilitates embryonic stem cell differentiation to Nkx2.5-positive cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325(3), 968–975.
- Thorvaldsen, T. E., Pedersen, N. M., Wenzel, E. M., & Stenmark, H. (2017). Differential roles of AXIN1 and AXIN2 in tankyrase inhibitor-induced formation of degradasomes and beta-catenin degradation. *PLoS One*, 12(1), e0170508.
- Uysal-Onganer, P., Kawano, Y., Caro, M., Walker, M. M., Diez, S., Darrington, R. S., ... Kypta, R. M. (2010). Wnt-11 promotes neuroendocrine-like differentiation, survival and migration of prostate cancer cells. *Molecular Cancer*, 9, 55.
- Vrisekoop, N., den Braber, I., de Boer, A. B., Ruiter, A. F., Ackermans, M. T., van der Crabben, S. N., ... Tesselaar, K. (2008). Sparse production but preferential incorporation of recently produced naive T cells in the human peripheral pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(16), 6115–6120.
- World Health Organization. 2017. Global Health Observatory (GHO) data/3.2 newborn and child mortality/child health. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- Xia, Z., Guo, M., & Ma, H. (2011). Functional analysis of novel phosphorylation sites of CREB-binding protein using mass spectrometry and mammalian two-hybrid assays. *Proteomics*, 11(17), 3444–3451.
- Xu, L., Zhang, Y., Luo, G., & Li, Y. (2015). The roles of stem cell memory T cells in hematological malignancies. *Journal of Hematology & Oncology*, 8, 113.
- Xu, L., Tan, J., Zhang, Y., Lai, J., Lu, Y., Yao, D., ... Li, Y. (2016). The distribution of T memory stem cells in cord blood, peripheral blood from healthy individuals and patients with leukemia/lymphoma. *Blood*, 128(22), 3376–3378.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Hernández-Acevedo GN, López-Portales OH, Gutiérrez-Reyna DY, et al. Protein complexes associated with β -catenin differentially influence the differentiation profile of neonatal and adult CD8⁺ T cells. *J Cell Physiol*. 2019;1–14. <https://doi.org/10.1002/jcp.28502>

9. Recomendaciones

Realizar una proteómica cuantitativa en células T CD8⁺ de células de adultos y neonatos basales y estimuladas con wnt3a y cuantificar cuanta β -catenina se está acumulando en estas poblaciones celulares.

Para profundizar en la fisiología de los linfocitos ante la estimulación con Wnt3a podemos realizar esta misma metodología desarrollada en este trabajo para linfocitos T CD4⁺ de células de adultos y neonatos basales y estimulados.

Realizar experimentos de ChIP-PCR para evaluar si existen diferencias en el enriquecimiento tanto de CBP, como de P300, sobre la región promotora de genes de respuesta a Wnt en células de neonatos y adultos.

Por otra parte, el uso de técnicas que nos brinden una mayor capacidad de análisis, como por ejemplo ChIP-Seq (secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina), aportaría información de gran ayuda en la comprensión de los mecanismos que establecen las características intrínsecas de los linfocitos T CD8⁺ neonatales a causa de la vía canónica de Wnt y de su señalización mediada por CBP y P300.

10. Agradecimientos

Inicio este apartado con muchos sentimientos. Es el momento de agradecer y deseo agradecerle a todos los que de una forma directa o indirecta participaron en este trabajo y esta meta. Hay que agradecerle a la vida que es lo más valioso que tengo al igual que a mis padres. Son el motor que me impulsan a ser una mejor persona. A mi padre por su sabiduría y a mi madre que con su disciplina y métodos muy duros y estrictos me brinda cada día no solo su amor de madre, de amiga y compañera. A mis hermanos que siempre me impulsan y me alientan a que no debo claudicar. Este trabajo es el fruto de una idea que surgió en diciembre del 2010 en Cuba. Ramón Batista mi hermano querido me platicó de la posibilidad de superarnos en este gran país que es México. Contacto con la Dra. María Angélica Santana Calderón mi tutora y la líder de este trabajo y de mi formación que tanto trabajo ha costado y con su ejemplo, sabiduría, conocimiento, experiencia y ese valor humano me aceptó en su grupo de trabajo. El laboratorio de inmunología celular donde existe un grupo de chicos increíbles y talentosos. Tengo que mencionarlos porque son personas especiales y con sus críticas, sugerencias día tras día fueron tributando en este trabajo. Oscar Ramírez y su familia, Oscar López (el asere), Otoniel, Ariel, Bruno, Linda, Nadia, Sofía, Zeferino, Darely, Rosario, Erick, Carlos, Vero, Ximena y especialmente a José Antonio. Personas que están distante pero muy importante para este trabajo, el personal del Cinvestav Irapuato el Dr Luis González de la Vara, Bárbara Lino y Alicia Chagoya.

Mis amigos cubanos que es una comunidad increíble y ya son una familia. A los nuevos amigos mexicanos que me abrieron las puertas a esta gran sociedad y cultura.

A todos y a todas muchas gracias.

11. Anexos

Anexo 1. Cebadores empleados en el PCR Tiempo-Real

Genes	Secuencia de los oligos diseñados para los ensayos con cDNA (5' to 3')	
	Forward	Reverse
CCND1	AGTTGCAAAGTCCTGGAGCC	GATGGTTTCCACTTCGCAGC
BIRC5	AGGACCACCGCATCTCTACA	TGTTCCCTCTATGGGGTCGTCA
POU5F1	TCGCAAGCCCTCATTTCCACC	TTGGAAGCTTAGCCAGGTCC
S100A4	TCTTGTTTTGATCCTGACTGCT	ACTTGTCACCCTCTTTGCC
cJUN	GGAGACAAGTGGCAGAGTCC	CCAAGTTCAACAACCGGTGC
FRA1	AACCCTCCTCGCTTTGTGAG	GAAACAGTGGGCAGCTTTGG
FOS	CTGGCGTTGTGAAGACCATGA	TCTAGTTGGTCTGTCTCCGCT
AXIN2	ACACCGATAGAGGGGTGGAA	CCACCGACCACGTTTCTGTA
GZMB	AGCCTGCACCAAAGTCTCAA	TTTCATTACAGCGGGGGCTT
PRDM1	AGTGTGCGGAGAGGCAAG	CCCACAGTTTTTCCAAGCAA
NKD1	TGAGGACCCTCTCCTACGG	AGGGTCTCTACTGTCTGTCC
SFRP1	CTTCTACTGGCCGAGATGC	ATCCTCAGTGCAAACCTCGCTG
MAP3K7	TGGTGTGAACCATTGCCA	CTGCAACCAGCAGTAAGTTGG
WNT11	GCCCACCACATGGAATCACT	AGTTCACTTGACGAGGCCG
AXIN1	CAAGCAGAGGTATGTGCAGGA	CACAACGATGCTGTACACAG
PSEN1	AAGCGTATACCTAATCTGGGAGC	CTGCCGTTCTCTATTGTCATTCTG
Genes	Secuencia de los oligos diseñados para los ensayos con gDNA (5' to 3')	
	Forward	Reverse
CCND1	ATTCTTTGGCCGTCTGTCCG	GAGACCACGAGAAGGGGTGA
BIRC5	TTTGAAAGCAGTCGAGGGGG	GTGTGCCGGGAGTTGTAGTC
POU5F1	GAGGTCAAGGCTAGTGGGTG	CGAGAAGGCCAAATCCGAAG
S100A4	CCCCTAGCTTTTGTGTCCACC	ATGGGGGACAGGGAGTAGT
cJUN	GGGAAACAACAACCACCCCT	GACTGTCTAGTGACGGTGGC
FRA1	CAGAAACGGAGTTAGCCCA	CTGACGTAGCTGCCATACA
FOS	AACGATCCTGCCACGGACAT	CTGAAGGGATAACGGGAACGC
AXIN2	CTGTGGGTGGAGAAATGCC	CCCTACTCCACCCTCTAGC
GZMB	AAAGCGTCTTCAAATCATAGCTGA	GCTGGAATTCTACAGGGTAGGAG
PRDM1	GGGCGATCTGGAGTGTTTAGA	GAGAGCTTCTCTCTTCGCAT
NKD1	GGGAAGACTGGGAAAAGGCA	TCCGCTCCACGTCTCTCTA

Anexo 2. Identificación de proteínas asociadas a β -catenina en células T CD8⁺ basales

Adult cells and Neonatal cells (common proteins)														
#	UniProtKB	Gene symbol	#	UniProtKB	Gene symbol	#	UniProtKB	Gene symbol	#	UniProtKB	Gene symbol	#	UniProtKB	Gene symbol
1	Q08117	AES	9	Q9Y5R5	DMRT2	17	Q96N16	JAKMIP1	25	P35227	PCGF2	33	Q15831	STK11
2	Q61MN6	CAPRN2	10	O43432	EIF4G3	18	Q53G59	KLHL12	26	Q9UPQ7	PDZRN3	34	O14746	TERT
3	Q9P219	CCDC88C	11	Q7Z7B0	FILIP1	19	O75197	LRP5	27	Q16512	PKN1	35	P56704	WNT3A
4	Q9HCK8	CHD8	12	P34947	GRK5	20	Q9UPN3	MACF1	28	Q96P16	RPRD1A	36	A0A024R316	WNT5A
5	P48730	CSNK1D	13	P49840	GSK3A	21	Q6KC79	NIPBL	29	Q5T4F7	SFRP5	37	O00755	WNT7A
6	P35222	CTNNB1	14	P26583	HMGB2	22	Q969G9	NKD1	30	O60264	SMARCA5	38	O43296	ZNF264
7	O60716	CTNND1	15	Q9H0C8	ILKAP	23	Q5BJF6	ODE2	31	Q8NB90	SPATA5	39	A0A024RC65	
8	Q9NYF0	DACT1	16	P46940	IQGAP1	24	A0A024RC37	P15RS	32	P81877	SSBP2	40	B4DZB8	
Adult cells (exclusive proteins)								Neonatal cells (exclusive proteins)						
#	UniProtKB	Gene symbol	#	UniProtKB	Gene symbol	#	UniProtKB	Gene symbol	#	UniProtKB	Gene symbol	#	UniProtKB	Gene symbol
1	P55196	AFDN	22	Q13233	MAP3K1	43	B8ZZ34	SHISA8	1	Q9NQW6	ANLN	22	Q68DV7	RNF43
2	Q8N7J2	AMER2	23	Q9P0L2	MARK1	44	O95343	SIX3	2	O15169	AXIN1	23	Q9NQG5	RPRD1B
3	P25054	APC	24	P27448	MARK3	45	Q6PML9	SLC30A9	3	Q07021	C1QBP	24	P31350	RRM2
4	O95996	APC2	25	Q71F56	MED13L	46	O14745	SLC9A3R1	4	Q96B18	DACT3	25	Q9NP91	SLC6A20
5	Q81W93	ARHGEF19	26	Q99972	MYOC	47	Q9NQZ5	STARD7	5	P24534	EEF1B2	26	P51532	SMARCA4
6	Q8IZT6	ASPM	27	O94916	NFAT5	48	O14907	TAX1BP3	6	Q9NPG1	FZD3	27	O95347	SMC2
7	O15234	CASC3	28	O75928	PIAS2	49	P15923	TCF3	7	O00144	FZD9	28	A0A024R158	SMC2L1
8	Q3V6T2	CCDC88A	29	Q96MT3	PRICKLE1	50	P36402	TCF7	8	Q13283	G3BP1	29	Q01082	SPTBN1
9	Q8ND76	CCNY	30	Q7Z3G6	PRICKLE2	51	Q6FWH4	TCF7L2	9	P62805	HIST1H4A	30	Q15583	TGIF1
10	P35638	DDIT3	31	A6NK89	RASSF10	52	Q9UKE5	TNIK	10	B2R4R0	HIST1H4L	31	Q9P2C4	TMEM181
11	P35659	DEK	32	P0DJJ3	RBMY1A1	53	Q13641	TPBG	11	Q9UGU5	HMGXB4	32	P09544	WNT2
12	Q155Q3	DIXDC1	33	Q8NHY2	RFWD2	54	Q70CQ2	USP34	12	P07910	HNRNPC	33	Q9H1J7	WNT5B
13	Q68D97	DKFZp686C13257	34	Q05D03	RHOV	55	Q96K76	USP47	13	Q9BUJ2	HNRNPUL1	34	Q9H1J5	WNT8A
14	Q14517	FAT1	35	Q01973	ROR1	56	Q93008	USP9X	14	O00410	IPO5	35	Q9UGI0	ZRANB1
15	P85037	FOXX1	36	Q01974	ROR2	57	F8W9F9	WNK2	15	A0A024R4R9	LENG8	36	B3KWG6	
16	Q92837	FRAT1	37	Q2MKA7	RSP01	58	O14905	WNT9B	16	O75096	LRP4			
17	Q13322	GRB10	38	P34925	RYK	59	A2A288	ZC3H12D	17	Q9BRK4	LZTS2			
18	Q9ULT8	HECTD1	39	Q8WTS6	SETD7	60	B3KW12		18	O75161	NPHP4			
19	Q6PKG0	LARP1	40	Q6FHJ7	SFRP4	61	B4DN02		19	P09874	PARP1			
20	Q9HBX8	LGR6	41	Q8N114	SHISA5				20	Q8WY48	PP2150			
21	P18858	LIG1	42	A6NL88	SHISA7				21	Q8NHQ8	RASSF8			

Anexo 3. Identificación de proteínas asociadas a β -catenina en células T CD8⁺ estimuladas con wnt3a

Adult cells and Neonatal cells stimulated with wnt3a (common proteins)														
#	UniProtKB	Gene symbol	#	UniProtKB	Gene symbol	#	UniProtKB	Gene symbol	#	UniProtKB	Gene symbol	#	UniProtKB	Gene symbol
1	P55196	AFDN	82	Q5SW24	DACT2	163	Q96N16	JAKMIP1	244	Q96KR7	PHACTR3	325	O14746	TERT
2	P30838	ALDH3A1	83	Q96B18	DACT3	164	Q719H9	KCTD1	245	O75925	PIAS1	326	Q14186	TFDP1
3	P05062	ALDOB	84	O43293	DAPK3	165	Q9Y2K7	KDM2A	246	O75928	PIAS2	327	Q15583	TGIF1
4	P09972	ALDOC	85	Q9UHG0	DCDC2	166	Q8NHM5	KDM2B	247	Q8N2W9	PIAS4	328	P10828	THR6
5	Q5JTC6	AMER1	86	O00571	DDX3X	167	A2VDJ0	KIAA0922	248	P14618	PKM	329	Q04724	TLE1
6	Q8N7J2	AMER2	87	P35659	DEK	168	Q53G59	KLHL12	249	Q16512	PKN1	330	Q04725	TLE2
7	Q8N944	AMER3	88	Q8WUY9	DEPDC1B	169	Q1ED39	KNOP1	250	Q9UPG8	PLAGL2	331	Q04726	TLE3
8	Q8IY63	AMOTL1	89	Q9NRI5	DISC1	170	P13646	KRT13	251	Q9NQ55	PPAN	332	Q04727	TLE4
9	Q9Y2J4	AMOTL2	90	Q155Q3	DIXDC1	171	P08729	KRT7	252	Q96MT3	PRICKLE1	333	Q8N4V6	TMEM181
10	Q9Y2G4	ANKRD6	91	Q659G9	DKFZp586H0919	172	Q6PKG0	LARP1	253	Q7Z3G6	PRICKLE2	334	Q66K66	TMEM198
11	Q9NQW6	ANLN	92	Q68D97	DKFZp686C13257	173	Q9NRM7	LATS2	254	Q13131	PRKAA1	335	Q96Q45	TMEM237
12	Q96CW1	AP2M1	93	O94907	DKK1	174	Q9UJU2	LEF1	255	P54646	PRKAA2	336	P42167	TMPO
13	P25054	APC	94	Q9UBU2	DKK2	175	A0A024R4R9	LENG8	256	Q86TP1	PRUNE1	337	Q9UKE5	TNIK
14	O95996	APC2	95	Q9UBP4	DKK3	176	Q8WVC0	LEO1	257	O00487	PSMD14	338	O95271	TNKS
15	Q8J025	APCDD1	96	Q9UK85	DKKL1	177	Q9BXB1	LGR4	258	Q13308	PTK7	339	Q13641	TPBG
16	Q8IW93	ARHGEF19	97	Q96QB1	DLC1	178	Q9HBX8	LGR6	259	Q5T170	PYGO2	340	P60174	TPI1
17	Q9H0F7	ARL6	98	Q9Y5R5	DMRT2	179	P18858	LIG1	260	Q9H0H5	RACGAP1	341	Q86V40	TRABD2A
18	Q8IUR7	ARMC8	99	Q9NX36	DNAJC28	180	Q9UGP4	LIMD1	261	P63244	RACK1	342	Q6PKC3	TXNDC11
19	Q9P291	ARMCX1	100	A6NLW8	DUXA	181	Q9H9Z2	LIN28A	262	P13631	RARG	343	Q9NNW7	TXNRD2
20	Q9UH62	ARMCX3	101	P54792	DVL1P1	182	Q8NG48	LINS1	263	A6NK89	RASSF10	344	Q86VQ6	TXNRD3
21	O00327	ARNTL	102	O14641	DVL2	183	Q8N448	LNX2	264	Q9BYM8	RBCK1	345	O94888	UBXN7
22	P50553	ASCL1	103	Q92997	DVL3	184	Q7Z4F1	LRP10	265	P0DJD3	RBMY1A1	346	Q14694	USP10
23	Q8IZT6	ASPM	104	Q9HAK2	EBF2	185	O75096	LRP4	266	P49796	RGS3	347	P54578	USP14
24	L8B567	ATL1-y	105	Q9H8V3	ECT2	186	O75197	LRP5	267	Q7L0Q8	RHOU	348	Q70CQ2	USP34
25	O75787	ATP6AP2	106	P29692	EEF1D	187	O75581	LRP6	268	Q96L33	RHOV	349	Q96K76	USP47
26	Q9Y2T1	AXIN2	107	O43432	EIF4G3	188	Q9Y608	LRRFIP2	269	Q63HN8	RNF213	350	Q93009	USP7
27	Q9HBU1	BARX1	108	Q9BXX0	EMILIN2	189	Q6UWE0	LRSAM1	270	Q5VTB9	RNF220	351	Q93008	USP9X
28	Q9C0K0	BCL11B	109	Q09472	EP300	190	Q86X29	LSR	271	Q96EP0	RNF31	352	Q9ULK5	VANGL2
29	O00512	BCL9	110	Q9Y6I3	EPN1	191	Q86Y78	LYPD6	272	Q68DV7	RNF43	353	Q9UIW0	VAX2
30	Q86UU0	BCL9L	111	Q14517	FAT1	192	Q9BRK4	LZTS2	273	B1APY4	ROR2	354	O95231	VENTX
31	Q9H694	BICC1	112	Q96IG2	FBXL20	193	Q9UPN3	MACF1	274	Q96P16	RPRD1A	355	O75436	VPS26A
32	Q9H2G9	BLZF1	113	Q9UKB1	FBXW11	194	Q13233	MAP3K1	275	P31350	RRM2	356	Q96QK1	VPS35
33	P12643	BMP2	114	P16591	FER	195	P27816	MAP4	276	Q6UXX9	RSPO2	357	Q9GZS3	WDR61
34	Q9NP11	BRD7	115	Q96AC1	FERMT2	196	P45984	MAPK9	277	Q9BXY4	RSPO3	358	O95388	WISP1
35	Q9Y297	BTRC	116	Q7Z7B0	FILIP1	197	Q9P0L2	MARK1	278	Q92541	RTF1	359	O76076	WISP2
36	A0A024R6P6	C14orf129	117	Q8NFG4	FLCN	198	Q7KZ17	MARK2	279	Q9UL12	SARDH	360	O95389	WISP3
37	Q07021	C1QBP	118	P21333	FLNA	199	P27448	MARK3	280	Q8N9R8	SCAI	361	Q9Y3S1	WNK2
38	Q49A92	C8orf34	119	P85037	FOXK1	200	P23508	MCC	281	Q6P3W7	SCYL2	362	P04628	WNT1
39	Q6IMN6	CAPRIN2	120	O75474	FRAT2	201	Q14676	MDC1	282	Q9HC62	SEN2	363	O00744	WNT10B
40	O15234	CASC3	121	D9ZGF6	FRZB	202	Q99750	MDF1	283	O15047	SETD1A	364	P09544	WNT2
41	O95931	CBX7	122	Q8N475	FSTL5	203	Q9P1T7	MDFIC	284	Q15047	SETDB1	365	Q93097	WNT2B
42	A6NI87	CBY3	123	Q9UP38	FZD1	204	Q93074	MED12	285	Q5T4F7	SEFRP5	366	P56703	WNT3

43	Q8IX12	CCAR1	124	Q9ULW2	FZD10	205	Q71F56	MED13L	286	Q9H788	SH2D4A	367	P56704	WNT3A
44	Q8N163	CCAR2	125	Q86UZ8	FZD2	206	Q9BY79	MFRP	287	Q6ZSJ9	SHISA6	368	Q9Y6F9	WNT6
45	Q3V6T2	CCDC88A	126	Q9NPG1	FZD3	207	A0A024R483	MGC99813	288	A6NL88	SHISA7	369	O00755	WNT7A
46	Q9P219	CCDC88C	127	Q9JLV1	FZD4	208	Q9H2W2	MIXL1	289	B8ZZ34	SHISA8	370	P56706	WNT7B
47	P24863	CCNC	128	A0A024R9E9	FZD6	209	P50281	MMP14	290	O95343	SIX3	371	Q9H1J5	WNT8A
48	Q8ND76	CCNY	129	Q9H461	FZD8	210	Q99972	MYOC	291	Q6PML9	SLC30A9	372	Q93098	WNT8B
49	O95400	CD2BP2	130	O00144	FZD9	211	Q00604	NDP	292	O14745	SLC9A3R1	373	D9ZGG3	WNT9A
50	Q6P1J9	CDC73	131	Q13283	G3BP1	212	Q9UQ49	NEU3	293	O00193	SMAP	374	A6NIX2	WTIP
51	O94921	CDK14	132	P08151	GLI1	213	O94916	NFAT5	294	P51532	SMARCA4	375	Q9NZC7	WWOX
52	Q00535	CDK5	133	Q9BZE0	GLIS2	214	Q13469	NFATC2	295	O60264	SMARCA5	376	P98170	XIAP
53	P49336	CDK8	134	P15104	GLUL	215	Q6KC79	NIPBL	296	O95347	SMC2	377	P63104	YWHAZ
54	Q9NYQ7	CELSR3	135	P30679	GNA15	216	Q969G9	NKD1	297	A0A024R158	SMC2L1	378	Q96IU2	ZBED3
55	Q8WUJ3	CEMIP	136	P35052	GPC1	217	Q969F2	NKD2	298	Q99835	SMO	379	Q9Y330	ZBTB12
56	Q9HCK8	CHD8	137	Q13322	GRB10	218	Q9NVX2	NLE1	299	O60493	SNX3	380	Q86T24	ZBTB33
57	Q9NPF2	CHST11	138	P34947	GRK5	219	Q9UBE8	NLK	300	Q9BQB4	SOST	381	A2A288	ZC3H12D
58	Q9Y471	CMAHP	139	P43250	GRK6	220	Q15233	NONO	301	O15370	SOX12	382	Q8TBF4	ZCRB1
59	P39060	COL18A1	140	P49840	GSK3A	221	Q7Z494	NPHP3	302	Q9UN79	SOX13	383	O43296	ZNF264
60	P48729	CSNK1A1	141	P49841	GSK3B	222	O75161	NPHP4	303	O60248	SOX15	384	Q9ULT6	ZNRF3
61	Q8N752	CSNK1A1L	142	Q9P0R6	GSKIP	223	F1D8N7	NR1A2	304	Q8NB90	SPATA5	385	Q9UG10	ZRANB1
62	P48730	CSNK1D	143	O60381	HBP1	224	F1D8P1	NR1B3	305	Q496A3	SPATS1	386	B3KW12	
63	P49674	CSNK1E	144	Q9UBI9	HECA	225	F1D8T1	NR2A1	306	A0A024R297	SPIN	387	B3KW36	
64	Q9HCP0	CSNK1G1	145	Q9ULT8	HECTD1	226	O00482	NR5A2	307	Q9Y657	SPIN1	388	B4DZB8	
65	P78368	CSNK1G2	146	V9HVV3	HEL-S-269	227	P04629	NTRK1	308	Q01082	SPTBN1	389	A0A024RC65	
66	Q9Y6M4	CSNK1G3	147	Q14526	HIC1	228	Q9H1E3	NUCKS1	309	Q9BXP5	SRRT	390	B3KWG6	
67	P68400	CSNK2A1	148	Q9H2X6	HIPK2	229	Q6DKJ4	NXN	310	Q13242	SRSF9	391	Q59ER8	
68	P19784	CSNK2A2	149	P26583	HMGB2	230	Q5BJF6	ODF2	311	P81877	SSBP2	392	B7Z3D2	
69	Q9UI47	CTNNA3	150	O15347	HMGB3	231	O75665	OFD1	312	Q15831	STK11	393	A8K4L6	
70	P35222	CTNNB1	151	Q9UGU5	HMGXB4	232	Q99784	OLFM1	313	Q13188	STK3	394	B2RE34	
71	O60716	CTNND1	152	P41235	HNF4A	233	Q96BN8	OTULIN	314	P16949	STMN1	395	A0A140VJV5	
72	Q9UQB3	CTNND2	153	P07910	HNRNPC	234	A0A024RC37	P15RS	315	Q8IWU6	SULF1	396	B4DN02	
73	Q6PD62	CTR9	154	Q9BUJ2	HNRNPUL1	235	Q8N7H5	PAF1	316	O75478	TADA2A	397	B3KX42	
74	Q13616	CUL1	155	P31270	HOXA11	236	O96013	PAK4	317	A0A024R0Y4	TADA2L	398	Q59EF7	
75	Q7LFL8	CXXC5	156	Q9H0C8	ILKAP	237	P09874	PARP1	318	O60907	TBL1X	399	Q53GP3	
76	Q9NQC7	CYLD	157	Q9Y283	INVS	238	Q8N6Y1	PCDH20	319	P15923	TCF3	400	Q8N2N3	
77	P04798	CYP1A1	158	O00410	IPO5	239	P35227	PCGF2	320	P36402	TCF7	401	B3KQX9	
78	Q9Y4D1	DAAM1	159	P46940	IQGAP1	240	P30101	PDIA3	321	Q9HCS4	TCF7L1	402	B3KSZ7	
79	Q86T65	DAAM2	160	Q6DN90	IQSEC1	241	Q9UPQ7	PDZRN3	322	C6ZRJ7	TCF7L2			
80	P98082	DAB2	161	Q96J02	ITCH	242	W0S0X4	Pe1Fe3	323	Q13569	TDG			
81	Q9NYF0	DACT1	162	Q6IE81	JADE1	243	Q99471	PFDN5	324	Q15554	TERF2			

Adult cells stimulated with wnt3a (exclusive proteins)

Neonatal cells stimulated with wnt3a (exclusive proteins)

#	UniProtKB	Gene symbol	#	UniProtKB	Gene symbol	#	UniProtKB	Gene symbol	#	UniProtKB	Gene symbol
1	Q96BJ3	AIDA	28	A0A024R2Z8	PTHR1	1	Q9Y4X0	AMMECR1	28	Q9NTX7	RNF146
2	Q13145	BAMBI	29	P20472	PVALB	2	Q8NEY4	ATP6V1C2	29	Q2MKA7	RSP01
3	Q9NR00	C8orf4	30	Q9Y3Y4	PYGO1	3	O15169	AXIN1	30	P29622	SERPINA4
4	Q99966	CITED1	31	Q8WVD3	RNF138	4	Q9BQE9	BCL7B	31	Q9NPC8	SIX2
5	Q9H2H0	CXXC4	32	O01973	ROR1	5	Q53F96	CD2	32	Q6STE5	SMARCD3
6	P35638	DDIT3	33	Q9NQG5	RPRD1B	6	Q9UI36	DACH1	33	Q95863	SNAI1
7	Q68DS0	DKFZp781N011	34	P34925	RYK	7	Q9NSR3	DKFZp761O2023	34	Q9BT81	SOX7
8	Q9UBT3	DKK4	35	Q8N474	SFRP1	8	Q9UM22	EPDR1	35	A0A024R9Y9	SPIN-2
9	O14640	DVL1	36	Q6UW14	SHISA2	9	Q6UWV7	FAM159A	36	Q9BPZ2	SPIN2B
10	Q92837	FRAT1	37	Q8N114	SHISA5	10	Q9NZH0	GPRC5B	37	Q15532	SS18
11	P22083	FUT4	38	B4DS77	SHISA9	11	P18283	GPX2	38	Q9NQZ5	STARD7

12	Q13467	FZD5	39	P63208	SKP1	12	P62805	HIST1H4A	39	Q9Y3Q3	TMED3
13	V9HWB8	HEL-S-30	40	Q9NP91	SLC6A20	13	B2R4R0	HIST1H4L	40	Q9NS68	TNFRSF19
14	Q15011	HERPUD1	41	Q6X4U4	SOSTDC1	14	A0A024R5B2	MARK2	41	A6NFA1	TRABD2B
15	Q03014	HHEX	42	Q8NA61	SPERT	15	Q96J80	MERP1	42	O95859	TSPAN12
16	D3DWI5	JRK	43	Q2MJR0	SPRED3	16	Q9BRJ9	MESP1	43	Q9GZT5	WNT10A
17	Q96MU8	KREMEN1	44	Q8N2I9	STK40	17	P50579	METAP2	44	A4D0W7	WNT16
18	Q8NCW0	KREMEN2	45	Q9BX79	STRA6	18	P17050	NAGA	45	Q9UBV4	WNT16
19	O75473	LGR5	46	Q06520	SULT2A1	19	Q6VVB1	NHLRC1	46	P41221	WNT5A
20	O43318	MAP3K7	47	Q15750	TAB1	20	Q6P988	NOTUM	47	B3KWB6	
21	Q14696	MESDC2	48	Q92734	TFG	21	Q9P2E7	PCDH10	48	B7Z5Q3	
22	O15146	MUSK	49	O43294	TGFB111	22	Q7Z2D5	PLPPR4	49	Q59G99	
23	Q9UN36	NDRG2	50	I3L2J3	TMEM88	23	P49768	PSEN1			
24	P35372	OPRM1	51	Q5T9L3	WLS	24	A0A024R136	RACGAP1			
25	P11309	PIM1	52	O96014	WNT11	25	Q8NHQ8	RASSF8			
26	P62136	PPP1CA	53	A5Y0M9		26	Q8NHY2	RFWD2			
27	Q03431	PTH1R				27	A0A024R841	RGS3			

12. Bibliografía

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2011). *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier (7th ed.). <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3369-8.00001-X>
- Adkins, B. (2005). Neonatal T cell function. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 40(suppl 1), S5–S7.
- Al-Shanti, N., & Stewart, C. E. (2008). PD98059 enhances C2 myoblast differentiation through p38 MAPK activation: a novel role for PD98059. *The Journal of Endocrinology*, 198(1), 243–52. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0151>
- Alfonso, J., Frick, L. R., Silberman, D. M., Palumbo, M. L., Genaro, A. M., & Frasch, A. C. (2006). Regulation of hippocampal gene expression is conserved in two species subjected to different stressors and antidepressant treatments. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.06.036>
- Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J. S., Ben-shushan, E., Mann, M., ... Alkalay, I. (2002). Axin-mediated CKI phosphorylation of. *Genes Dev.*, 1066–1076. <https://doi.org/10.1101/gad.230302.somal>
- Annunziato, F., & Romagnani, S. (2009). Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Research and Therapy*, 11(6), 1–8. <https://doi.org/10.1186/ar2843>
- Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, J. P. S., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R. A., ... Weiner, H. L. (2007). A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nature Immunology*, 8, 1380–1389. <https://doi.org/10.1038/ni1541>
- Bevan, M. J. (2004). Helping the CD8+ T-cell response. *Nature Reviews Immunology*, 4, 595–602.
- Bordonaro, M., & Lazarova, D. L. (2016). Determination of the Role of CBP- and p300-Mediated Wnt Signaling on Colonic Cells. *JMIR Research Protocols*, 5(2), e66. <https://doi.org/10.2196/resprot.5495>
- Boudousquie, C., Danilo, M., Pousse, L., Jeevan-raj, B., Angelov, G. S., Zehn, D., ... Boudousquie, C. (2017). Differences in the Transduction of Canonical Wnt Signals Demarcate Effector and Memory CD8 T Cells with Distinct Recall Proliferation Capacity. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400465>
- Bryja, Lv., Schulte, G., & Arenas, E. (2007). Wnt-3a utilizes a novel low dose and rapid pathway that does not require casein kinase 1-mediated phosphorylation of Dvl to activate β -catenin. *Cellular Signalling*, 19(3), 610–616.
- Cadigan, K. M., & Waterman, M. L. (2012). TCF / LEFs and Wnt Signaling in the Nucleus, 1–22.
- Carlo, S., Daniela, P., Chiara, M., V, F. S., Meri, R., David, R. J., ... Lorenzo, P. P. (2009). differentiation, 28(2), 200–213. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.08.021.Functional>
- Cavallo, R. A., Cox, R. T., Moline, M. M., Roose, J., Polevoy, G. A., Clevers, H., ... Bejsovec, A. (1998). Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*, 395, 604–608.
- Chang, J. T., Ciocca, M. L., Kinjyo, I., Palanivel, V. R., McClurkin, C. E., DeJong, C. S., ... Reiner, S. L. (2011). CellCept and CellCept IV product monograph. *Immunity*, 34(4), 492–504. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.017.Asymmetric>
- Chatterton, D. E. W., Nguyen, N. D., Bering, B. S., & Sangild, P. T. (2013). Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(8), 1730–1747.

- Chen, J., & Li, Q. (2011). Life and death of transcriptional co-activator p300. *Epigenetics*, 6(8), 957–961. <https://doi.org/10.4161/epi.6.8.16065>
- Chrivia, J. C., Kwok, R. P. S., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M. R., & Richard H Goodman. (1993). Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*, 365(6449), 855–9.
- Clevers, H. (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>
- Cong, F., & Varmus, H. (2004). Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of β -catenin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(9), 2882–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307344101>
- Crane, I. J., & Forrester, J. V. (2005). Th1 and Th2 lymphocytes in autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*, 25(2). <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v25.i2.10>
- de Lau, W. B. M., Snel, B., & Clevers, H. C. (2012). The R-spondin protein family. *Genome Biology*, 13(3), 1–10. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-3-242>
- Deena Gibbons, Fleming, P., Virasami, A., Marie-Laure, M., Sebire, N. J., Costeloe, K., ... Hayday, A. (2014). Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants. *Nature Medicine*, 20, 1206–1210.
- Deutsch, E. W., Mendoza, L., Shteynberg, D., Farrah, T., Lam, H., Sun, Z., ... Aebersold, R. (2011). NIH Public Access, 10(6), 1150–1159. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900375.A>
- Dong, C. (2008). TH17 cells in development: An updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nature Reviews Immunology*, 8(5), 337–48. <https://doi.org/10.1038/nri2295>
- Dormond, O., Romero, P., Zhang, L., & Romero, P. (2016). Modulation of mTOR Signalling Triggers the Formation of Stem Cell-like Memory T Cells. *EBioMedicine*, 4, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.01.019>
- Dowlatshahi, D., MacQueen, G. M., Wang, J. F., Reiach, J. S., & Young, L. T. (1999). G protein-coupled cyclic AMP signaling in postmortem brain of subjects with mood disorders: Effects of diagnosis, suicide, and treatment at the time of death. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0731121.x>
- Driessens, G., Zheng, Y., Locke, F., Cannon, J. L., Gounari, F., & Gajewski, T. F. (2011). Beta-catenin inhibits T cell activation by selective interference with linker for activation of T cells-phospholipase C- γ 1 phosphorylation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(2), 784–90. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001562>
- Elahi, S. (2014). New Insight into an Old Concept: Role of Immature Erythroid Cells in Immune Pathogenesis of Neonatal Infection. *Frontiers in Immunology*, 5(August), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00376>
- Fagotto, F., Jho, E. H., Zeng, L., Kurth, T., Joos, T., Kaufmann, C., & Costantini, F. (1999). Domains of Axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular localization. *Journal of Cell Biology*, 145(4), 741–756. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.4.741>
- Fearnhead, N., Britton, M., & Bodmer, W. (2001). The ABC of APC. *Hum Mol Genet.*, 10(7), 721–33.
- Forget, M. A., Huon, Y., Reuben, A., Grange, C., Liberman, M., Martin, J., ... Lapointe, R. (2012). Stimulation of Wnt/ β -Catenin pathway in human CD8+T lymphocytes from blood and lung tumors leads to a shared young/memory phenotype. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041074>
- Galindo-Albarrán, A. O., López-Portales, O. H., Gutiérrez-Reyna, D. Y., Rodríguez-Jorge,

- O., Sánchez-Villanueva, J. A., Ramírez-Pliego, O., ... Santana, M. A. (2016). CD8+ T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response. *Cell Reports*, 17(8), 2151–2160. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.056>
- Gao, C., & Chen, Y.-G. (2010). Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cellular Signalling*, 22(5), 717–27. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.11.021>
- García Montes de Oca, LY Cabellos, A. T., GI Picón, G., Chagoya-López, A González, de la Vara L Delgado, Buenrostro NL Chirino-López, Y., & Gómez-Lojero, C Gutiérrez-Cirlos, E. (2016). Cardiolipin deficiency causes a dissociation of the b 6 c:caa 3 megacomplex in B. subtilis membranes. *J Bioenerg Biomembr*, 48(4), 451–67. <https://doi.org/s10863-016-9671-y>
- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C. M., Quigley, M. F., ... Restifo, N. P. (2012). NIH Public Access. *Nature Medicine*, 17(10), 1290–1297. <https://doi.org/10.1038/nm.2446.A>
- Gattinoni, L., Zhong, X., Palmer, D. C., Ji, Y., Hinrichs, C. S., Yu, Z., ... Church, L. (2010). Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells, 15(7), 808–813. <https://doi.org/10.1038/nm.1982.Wnt>
- Ghazal, P., Dickinson, P., & Smith, C. (2013). Early life response to infection. *Curr. Opin. Infect. Dis*, 26, 213–218.
- Goriely, S., Vincart, B., Stordeur, P., Vekemans, J., Willems, F., Goldman, M., & De Wit, D. (2001). Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(3), 2141–2146. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.3.2141>
- Hart, M., Concordet, J. P., Lassot, I., Albert, I., Del Los Santos, R., Durand, H., ... Polakis, P. (1999). The F-box protein β -TrCP associates with phosphorylated β -catenin and regulates its activity in the cell. *Current Biology*, 9(4), 207–210. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80091-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80091-8)
- Haskó, G., & Cronstein, B. N. (2004). Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology*, 25(1), 33–39.
- He, X., Mikhail, Keiko, T., & Xin, Z. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: Arrows point the way. *Development*, 131(8), 1663–1677. <https://doi.org/10.1242/dev.01117>
- Hikasa, H., Ezan, J., Itoh, K., Li, X., Klymkowsky, M. W., & Sokol, S. Y. (2011). Vertebrate Axis Specification, 19(4), 521–532. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.005.Regulation>
- Hino, S. I., Michiue, T., Asashima, M., & Kikuchi, A. (2003). Casein kinase I γ enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of β -catenin. *Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14066–14073. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213265200>
- Hrckulak, D., Kolar, M., Strnad, H., & Korinek, V. (2016). TCF/LEF transcription factors: An update from the internet resources. *Cancers*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/cancers8070070>
- Hsu, W., Zeng, L., & Costantini, F. (1999). Identification of a domain of axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 274(6), 3439–3445. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.6.3439>
- Huber, a H., Nelson, W. J., & Weis, W. I. (1997). Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell*, 90(5), 871–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298899>
- Ikeda, S., Kishida, M., Matsuura, Y., Usui, H., & Kikuchi, A. (2000). GSK-3 β -dependent phosphorylation of adenomatous polyposis cop gene product can be modulated by β -

- catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin. *Oncogene*, *19*(4), 537–545. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203359>
- Jati, S., Kundu, S., Chakraborty, A., Mahata, S. K., Nizet, V., & Sen, M. (2018). Wnt5A signaling promotes defense against bacterial pathogens by activating a host autophagy circuit. *Frontiers in Immunology*, *9*(APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00679>
- Jeannet, G., Scheller, M., Scarpellino, L., Duboux, S., Gardiol, N., Back, J., ... Held, W. (2008). Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of β -catenin and γ -catenin. *Blood*, *111*(1), 142–149. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-102558>
- Jimeno, R., Leceta, J., Martínez, C., Gutiérrez-Cãas, I., Pérez-García, S., Carrión, M., ... Juarranz, Y. (2012). Effect of VIP on the balance between cytokines and master regulators of activated helper T cells. *Immunology and Cell Biology*, *90*(2), 178–186. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.23>
- Johnson, S. E., Wang, X., Hardy, S., Taparowsky, E. J., & Konieczny, S. F. (1996). Casein kinase II increases the transcriptional activities of MRF4 and MyoD independently of their direct phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(4), 1604–13. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=231146&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jonuleit, H., & Schmitt, E. (2003). The Regulatory T Cell Family: Distinct Subsets and their Interrelations. *The Journal of Immunology*, *171*(12), 6323–6327. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.12.6323>
- Kalkhoven, E. (2004). CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochemical Pharmacology*, *68*(6), 1145–1155.
- Kawahara, K., Morishita, T., Nakamura, T., Hamada, F., Toyoshima, K., & Akiyama, T. (2000). Down-regulation of β -catenin by the colorectal tumor suppressor APC requires association with axin and β -catenin. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(12), 8369–8374. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.12.8369>
- Kawasaki, H., Eckner, R., Yao, T.-P., Taira, K., Chiu, R., Livingston, D. M., & Yokoyama, K. K. (1998). Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature*, *393*, 284–289.
- Koch, U., Wilson, A., Cobas, M., Kemler, R., MacDonald, H. R., & Radtke, F. (2008). Simultaneous loss of β - and γ -catenin does not perturb hematopoiesis or lymphopoiesis. *Blood*, *111*(1), 160–164. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-099754>
- Kook, S.-H., Choi, K.-C., Son, Y.-O., Lee, K.-Y., Hwang, I.-H., Lee, H.-J., ... Lee, J.-C. (2008). Involvement of p38 MAPK-mediated signaling in the calpeptin-mediated suppression of myogenic differentiation and fusion in C2C12 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *310*(1–2), 85–92. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9668-2>
- Laifenfeld, D., Karry, R., Grauer, E., Klein, E., & Ben-Shachar, D. (2005). Antidepressants and prolonged stress in rats modulate CAM-L1, laminin, and pCREB, implicated in neuronal plasticity. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.03.023>
- Lee, E., & Son, H. (2011). Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Reports*, 133–731.
- Levy, O. (2007). Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nature Reviews. Immunology*, *7*(5), 379–90. <https://doi.org/10.1038/nri2075>
- Levy, O., Coughlin, M., Cronstein, B. N., Roy, R. M., Desai, A., & Wessels, M. R. (2006).

- The Adenosine System Selectively Inhibits TLR-Mediated TNF- α .pdf.
- Li, L., Kim, H. T., Nellore, a, Patsoukis, N., Petkova, V., McDonough, S., ... Boussiotis, V. a. (2014). Prostaglandin E2 promotes survival of naive UCB T cells via the Wnt/ β -catenin pathway and alters immune reconstitution after UCBT. *Blood Cancer Journal*, 4(December 2013), e178. <https://doi.org/10.1038/bcj.2013.75>
- Li, L., Yuan, H., Weaver, C. D., Mao, J., Farr, G. H., Sussman, D. J., ... Wu, D. (1999). Axin and Frat1 interact with Dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO Journal*, 18(15), 4233–4240. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.15.4233>
- Liang, H., Chen, Q., Coles, A. H., Anderson, S. J., Pihan, G., Bradley, A., ... Jones, S. N. (2003). Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell*, 4(5), 349–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14667502>
- Liang, H., Coles, A. H., Zhu, Z., Zayas, J., Jurecic, R., Kang, J., & Jones, S. N. (2007). Noncanonical Wnt signaling promotes apoptosis in thymocyte development. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(13), 3077–84. <https://doi.org/10.1084/jem.20062692>
- Lien, W. H., & Fuchs, E. (2014). Wnt some lose some: Transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes and Development*, 28(14), 1517–1532. <https://doi.org/10.1101/gad.244772.114>
- Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 781–810. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>
- Luis, T. C., Weerkamp, F., Naber, B. A. E., Baert, M. R. M., De Haas, E. F. E., Nikolic, T., ... Staal, F. J. T. (2009). Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation. *Blood*, 113(3), 546–554. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-163774>
- Luo, W., Peterson, A., Garcia, B. A., Coombs, G., Kofahl, B., Heinrich, R., ... Virshup, D. M. (2007). Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the β -catenin degradation complex. *EMBO Journal*, 26(6), 1511–1521. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601607>
- Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., ... Behrens, J. (2002). Negative Feedback Loop of Wnt Signaling through Upregulation of Conductin/Axin2 in Colorectal and Liver Tumors. *Molecular and Cellular Biology*, 22(4), 1184–1193. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.4.1184>
- Ma, H., Guo, M., Shan, B., & Xia, Z. (2012). Targeted functional analysis of p300 coactivator in Wnt/ β -catenin signaling pathway using phosphoproteomic and biochemical approaches. *Journal of Proteomics*, 75(9), 2601–10. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.009>
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, 17(1), 9–26. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>
- Marchant, A., & Goldman, M. (2005). T cell-mediated immune responses in human newborns: Ready to learn? *Clinical and Experimental Immunology*, 141(1), 10–18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02799.x>
- Mato, S., Vidal, R., Castro, E., Diaz, A., Pazos, A., & Valdizan, E. M. (2010). Long-Term Fluoxetine Treatment Modulates Cannabinoid Type 1 Receptor-Mediated Inhibition of Adenylyl Cyclase in the Rat Prefrontal Cortex through 5-Hydroxytryptamine1A Receptor-Dependent Mechanisms. *Molecular Pharmacology*.

- <https://doi.org/10.1124/mol.109.060079>
- Mellor, A. L., & Munn, D. H. (2000). Immunology at the Maternal-Fetal Interface: Lessons for T Cell Tolerance and Suppression. *Annual Review of Immunology*, *18*, 367–391. Retrieved from <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.367>
- Melvan, J. N., Bagby, G. J., Welsh, D. A., Nelson, S., & Zhang, P. (2010). Neonatal Sepsis and Neutrophil Insufficiencies. *Int Rev Immunol*, *29*(3), 315–348. <https://doi.org/10.3109/08830181003792803>. Neonatal
- Melvin, A., McGurn, M., Bort, S., Gibson, C., & Lewis, D. (1995). Hypomethylation of the interferon-gamma gene correlates with its expression by primary T-lineage cells. *European Journal of Immunology*, *25*(2), 426–30. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250218>
- Morley-Fletcher, S., Mairesse, J., Soumier, A., Banasr, M., Fagioli, F., Gabriel, C., ... MacCari, S. (2011). Chronic agomelatine treatment corrects behavioral, cellular, and biochemical abnormalities induced by prenatal stress in rats. *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2280-x>
- Muralidharan, S., Hanley, P. J., Liu, E., Chakraborty, R., Bollard, C., Shpall, E., ... Dotti, G. (2011). Activation of Wnt signaling arrests effector differentiation in human peripheral and cord blood-derived T lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *187*(10), 5221–32. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101585>
- Nam, J. S., Turcotte, T. J., Smith, P. F., Choi, S., & Jeong, K. Y. (2006). Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the frizzled 8 and LRP6 receptors and activate β -catenin-dependent gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(19), 13247–13257. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508324200>
- Ndure, J., & Flanagan, K. L. (2014). Targeting regulatory T cells to improve vaccine immunogenicity in early life. *Frontiers in Microbiology*, *5*(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00477>
- Nestler, E. J., Terwilliger, R. Z., & Duman, R. S. (1989). Chronic Antidepressant Administration Alters the Subcellular Distribution of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase in Rat Frontal Cortex. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb08564.x>
- Odagaki, Y., García-Sevilla, J. A., Huguelet, P., La Harpe, R., Koyama, T., & Guimón, J. (2001). Cyclic AMP-mediated signaling components are upregulated in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02188-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02188-6)
- Qu, W., & Zhang, C. (2015). *PCR Primer Design* (Vol. 1275). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6>
- Qu, W., Zhou, Y., Zhang, Y., Lu, Y., Wang, X., Zhao, D., ... Zhang, C. (2012). MFEprimer-2.0: A fast thermodynamics-based program for checking PCR primer specificity. *Nucleic Acids Research*, *40*, 205–208. <https://doi.org/10.1093/nar/gks552>
- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., ... Weissman, I. L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, *423*(6938), 409–14. <https://doi.org/10.1038/nature01593>
- Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., ... Clevers, H. (1998). The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature*, *395*, 608–612.
- Roth, J.-F., Shikama, N., Henzen, C., Desbaillets, I., Lutz, W., Marino, S., ... Eckner, R. (2003). Differential role of p300 and CBP acetyltransferase during myogenesis: p300 acts upstream of MyoD and Myf5. *The EMBO Journal*, *22*(19), 5186–96. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg473>

- Rubinfeld, B., Tice, D. A., & Polakis, P. (2001). Axin-dependent Phosphorylation of the Adenomatous Polyposis Coli Protein Mediated by Casein Kinase 1?? *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 39037–39045. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105148200>
- Rubinfeld B, I, A., E, P., C, F., S, M., & P, P. (1996). Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science*, 272(5264), 1023–6.
- Sakanaka, C., Weiss, J. B., & Williams, L. T. (1998). Bridging of β -catenin and glycogen synthase kinase-3 β by Axin and inhibition of β -catenin-mediated transcription. *Cell Biology*, 95(March), 3020–3023. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3020>
- Santana, M. A., & Esquivel-Guadarrama, F. (2006). Cell Biology of T Cell Activation and Differentiation. *International Review of Cytology*, 250, 217–274. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)50006-3](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0074-7696(06)50006-3)
- Scheller, M., Huelsken, J., Rosenbauer, F., Taketo, M. M., Birchmeier, W., Tenen, D. G., & Leutz, A. (2006). Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive β -catenin activation. *Nature Immunology*, 7, 1037–1047.
- Schenkel, J. M., Zloza, A., Li, W., Narasipura, S. D., & Lena Al-Harhi. (2010). β -Catenin Signaling Mediates CD4 Expression on Mature CD8+ T.
- Schönland, S. O., Zimmer, J. K., Lopez-Benitez, C. M., Widmann, T., Ramin, K. D., Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2003). Homeostatic control of T-cell generation in neonates. *Blood*, 102(4), 1428–1434. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3591>
- Schuijers, J., Mokry, M., Hatzis, P., Cuppen, E., & Clevers, H. (2014). Wnt-induced transcriptional activation is exclusively mediated by TCF/LEF. *EMBO Journal*, 33(2), 146–156. <https://doi.org/10.1002/embj.201385358>
- Semënov, M., Tamai, K., & He, X. (2005). SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 280(29), 26770–26775. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504308200>
- Semenov, M. V, Habas, R., Macdonald, B. T., & He, X. (2007). SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell*, 131(7), 1378. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.011>
- Smith, C. L., Dickinson, P., Forster, T., Craigon, M., Ross, A., Khondoker, M. R., ... Ghazal, P. (2014). Identification of a human neonatal immune-metabolic network associated with bacterial infection. *Nature Communications*, 5, 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms5649>
- Staal, F. J. T., Luis, T. C., & Tiemessen, M. M. (2008). WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nature Reviews. Immunology*, 8(8), 581–93. <https://doi.org/10.1038/nri2360>
- Stipdonk, M. J. B. van, Hardenberg, G., Bijker, M. S., Lemmens, E. E., Droin, N. M., Green, D. R., & Schoenberger, S. P. (2003). Dynamic programming of CD8+ T lymphocyte responses. *Nature Immunology*, 4, 361–365.
- Su, Y., Fu, C., Ishikawa, S., Stella, A., Kojima, M., Shitoh, K., ... Liu, B. (2008). APC Is Essential for Targeting Phosphorylated β -Catenin to the SCF β -TrCP Ubiquitin Ligase. *Molecular Cell*, 32(5), 652–661. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.023>
- Teo, J.-L., & Kahn, M. (2010). The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(12), 1149–55. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.09.012>
- Teo, J.-L., Ma, H., Nguyen, C., Lam, C., & Kahn, M. (2005). Specific inhibition of CBP/beta-catenin interaction rescues defects in neuronal differentiation caused by a

- presenilin-1 mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(34), 12171–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504600102>
- Terami, H., Hidaka, K., Katsumata, T., Iio, A., & Morisaki, T. (2004). Wnt11 facilitates embryonic stem cell differentiation to Nkx2.5-positive cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325(3), 968–975. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.103>
- UNICEF, WHO, World Bank, U.-D. P. D. (2018). *Levels and Trends in Child Mortality Report 2018. Estimates Developed by the UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation*.
- Uysal-Onganer, P., Kawano, Y., Caro, M., Walker, M. M., Diez, S., Darrington, R. S., ... Kypta, R. M. (2010). Wnt-11 promotes neuroendocrine-like differentiation, survival and migration of prostate cancer cells. *Molecular Cancer*, 9, 55. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-55>
- Vanden Eijnden, S., Goriely, S., De Wit, D., Goldman, M., & Willems, F. (2006). Preferential production of the IL-12(p40)/IL-23(p19) heterodimer by dendritic cells from human newborns. *European Journal of Immunology*, 36(1), 21–26. <https://doi.org/10.1002/eji.200535467>
- Verboon-Macielek, M., Krediet, T., Gerards, L., Fleer, A., & Loon, T. van. (2005). Clinical and epidemiologic characteristics of viral infections in a neonatal intensive care unit during a 12-year period. *Pediatr Infect Dis J*, 24(10), 901–4.
- Vidal, R., Valdizán, E. M., Mostany, R., Pazos, A., & Castro, E. (2009). Long-term treatment with fluoxetine induces desensitization of 5-HT 4 receptor-dependent signalling and functionality in rat brain. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06210.x>
- Vidal, R., Valdizan, E. M., Vilaró, M. T., Pazos, A., & Castro, E. (2010). Reduced signal transduction by 5-HT 4 receptors after long-term venlafaxine treatment in rats. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00903.x>
- Vock, C., Hauber, H.-P., & Wegmann, M. (2010). The Other T Helper Cells in Asthma Pathogenesis. *Journal of Allergy*, 2010, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2010/519298>
- Vrisekoop, N., den Braber, I., de Boer, A. B., Ruiter, A. F. C., Ackermans, M. T., van der Crabben, S. N., ... Tesselaar, K. (2008). Sparse production but preferential incorporation of recently produced naive T cells in the human peripheral pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(16), 6115–6120. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709713105>
- Wan, Y. Y. (2010). Multi-tasking of helper T cells. *Immunology*, 130(2), 166–171. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03289.x>
- Watts, V. J., & Neve, K. A. (2005). Sensitization of adenylate cyclase by Gai/o-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 106(3), 405–421. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.12.005>
- Webster, R. B., Rodriguez, Y., Klimecki, W. T., & Vercelli, D. (2007). The human IL-13 locus in neonatal CD4+ T cells is refractory to the acquisition of a repressive chromatin architecture. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 700–709. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609501200>
- Wesołowska, A. (2008). The anxiolytic-like effect of the selective 5-HT6 receptor antagonist SB-399885: The impact of benzodiazepine receptors. *European Journal of Pharmacology*, 580, 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.022>
- Whyte, P., Williamson, N. M., & Harlow, E. (1989). Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell*, 56(1), 67–75.

- Willinger, T., Freeman, T., Herbert, M., Hasegawa, H., McMichael, A. J., & Callan, M. F. C. (2006). Human Naive CD8 T Cells Down-Regulate Expression of the WNT Pathway Transcription Factors Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 and Transcription Factor 7 (T Cell Factor-1) following Antigen Encounter In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology*, *176*(3), 1439–1446. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1439>
- Wissinger, E. (n.d.). CÉLULAS T CD8+. Retrieved December 26, 2017, from <http://inmunologia.eu/celulas-inmunologia-en-un-mordisco/celulas-t-cd8>
- Wu, C., Wei, W., Li, C., Li, Q., Sheng, Q., & Zeng, R. (2012). Delicate Analysis of Post-Translational Modifications on Dishevelled 3.
- Xia, Z., Guo, M., & Ma, H. (2011). Functional analysis of novel phosphorylation sites of CREB-binding protein using mass spectrometry and mammalian two-hybrid assays. *Proteomics*, *11*(17), 3444–51. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100121>
- Xu, L., Tan, J., Zhang, Y., Lai, J., Lu, Y., Yao, D., ... Li, Y. (2016). The Distribution of T Memory Stem Cells in Cord Blood, Peripheral Blood from Healthy Individuals and Patients with Leukemia/Lymphoma. *Blood*, *128*(22), 3376–3378.
- Xu, Q., Wang, Y., Dabdoub, A., Tasman, W., Zhang, K., & Nathans, J. (2004). Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell*, *116*, 883–895. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00216-8](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00216-8)
- Yamada, S., Yamamoto, M., Ozawa, H., Riederer, P., & Saito, T. (2003). Reduced phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein in the postmortem orbitofrontal cortex of patients with major depressive disorder. *Journal of Neural Transmission*. <https://doi.org/10.1007/s00702-002-0810-8>
- Young, L. T., Dowlatshahi, D., MacQueen, G. M., & Wang, J. F. (1998). Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)79827-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)79827-5)
- Zeng, X., Tamai, K., Doble, B., Li, S., Huang, H., Habas, R., ... He, X. (2005). A dual-kinase mechanism for Wnt coreceptor phosphorylation and activation. *Nature*, *438*(7069), 873–877. <https://doi.org/10.1038/nature04371>
- Zhang, H.-T. (2009). Cyclic AMP-Specific Phosphodiesterase-4 as a Target for the Development of Antidepressant Drugs. *Current Pharmaceutical Design*. <https://doi.org/10.2174/138161209788168092>
- Zhang, Y., Joe, G., Hexner, E., Zhu, J., & Emerson, S. G. (2005). Host-reactive CD8+ memory stem cells in graft-versus-host disease. *Nature Medicine*, *11*, 1299–1305.
- Zhao, D.-M., Yu, S., Zhou, X., Haring, J. S., Held, W., Badovinac, V. P., ... Xue, H.-H. (2011). Constitutive activation of Wnt signaling favors generation of memory CD8 T cells. *Journal of Immunology*, *184*(3), 1191–1199. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901199>. Constitutive

