

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

***“Modelado de la respuesta de activación de los Linfocitos T  
CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos humanos a las señales del  
receptor de células T (TCR) y el Receptor tipo Toll 5 (TLR5)”***

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

**M en C. Otoniel Rodríguez Jorge.**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. María Angélica Santana Calderón**

**Dr. Denis Thieffry**

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE, 2018

## **Jurado de examen**

Dra. Yvone Rosenstein Azoulay (IBT-UNAM)

Dra. Mesuma Atakishiyeva (CInC-UAEM)

Dra. Alejandra Medina Rivera (UNAM-Juriquilla)

Dra. Rosana Pelayo Camacho (Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS)

Dr. Mario Ernesto Cruz (Facultad de Medicina-UAEM)

Dr. Raúl Peralta Rodríguez (CIDC-UAEM)

Dra. María Angélica Santana Calderón (CIDC-UAEM)

**Lista de publicaciones:**

**Synergy between T Cell Receptor and Toll like Receptor 5 signaling for CD4<sup>+</sup> T cell activation.** Rodríguez-Jorge, O. *et al.* Science Signaling. 2018. Accepted

**CD8<sup>+</sup> T cells from human neonates are biased toward an innate immune response.** Galindo-Albarrán, A. O. *et al.* Cell Reports. 2016.

**Recent insights in T cell activation and differentiation.** Rodríguez Jorge, O., Santana, M.A. Recent Trends In Immunology. 2015.

## Resumen

Los recién nacidos son la población más propensa a morir a causa de la infección, de acuerdo a los datos de la Organización mundial de la salud, OMS (1). De las muertes de niños entre 0 y 5 años, el 30% corresponden a muertes neonatales y de estas, el 25% son debidas a infecciones. En particular, los recién nacidos son altamente susceptibles a infecciones intracelulares (2). Una apropiada activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> es necesaria para que se origine una respuesta inmune celular adecuada. (3–5).

El sistema inmune neonatal, y particularmente la respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos, no han sido estudiados a fondo. Existen evidencias de que los receptores tipo Toll, TLRs por sus siglas en inglés (Toll-Like Receptors), moléculas típicamente asociadas a la inmunidad innata, podrían ser importantes moléculas co-estimuladoras para la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales también expresan TLRs y algunos de estos son funcionales, tal es el caso del TLR5, el TLR2 y el heterodímero TLR7/8 (6–8).

El objetivo de este proyecto fue caracterizar a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos humanos, desde el estado basal de su cromatina y expresión génica, hasta su respuesta a los estímulos del receptor de células T (TCR) y el receptor co-estimulador clásico CD28 o las del estímulo alternativo por el TLR5. Hicimos un estudio comparativo con las células de adulto para delinear los aspectos generales de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y los específicos de las células neonatales. Hicimos un estudio interdisciplinario, que consistió en 5 aspectos principales: (1) La caracterización epigenética y transcriptómica de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos humanos en estado basal, a partir de datos públicos. (2) La generación de modelos lógicos que reproducen la respuesta de activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> a los estímulos conjuntos del TCR y CD28, y alternativamente al TLR5, y su validación con datos epigenéticos y transcriptómicos públicos, y datos experimentales para el caso del TLR5. (3) La generación de un modelo fusionado de las vías de señalización, (4) la validación experimental del modelo para el caso de los adultos. (5) La exploración de la señalización a través del TCR y el TLR5 en células neonatales y la propuesta de un mecanismo para inducir la activación de tales células.

## INTRODUCCIÓN

### *Inmunidad neonatal*

Los neonatos son altamente susceptibles a las infecciones, principalmente por patógenos intracelulares (9–12). Por lo que las infecciones son una de las principales causas de muerte durante la etapa neonatal (13). Durante mucho tiempo este suceso se atribuyó a la inmadurez del sistema inmune de los neonatos y se pensó que estos eran inmunodeficientes (14). Sin embargo, actualmente se sabe que, aunque en la sangre neonatal circula una mayor proporción de células inmaduras en comparación con la sangre de adulto, los neonatos sí son capaces de llevar a cabo respuestas inmunes eficientes bajo condiciones fuertes de estimulación (15, 16).

Una visión actualmente aceptada es que el sistema inmune neonatal está moldeado de una manera que atiende a las necesidades del feto durante la gestación, así como a las implicaciones del nacimiento (14, 17). Durante la gestación, el feto debe evitar reacciones pro-inflamatorias porque esto puede inducir un parto prematuro. El recién nacido, por su parte, también debe evitar las respuestas exacerbadas porque estas lo pueden llevar a un choque séptico, al entrar en contacto con el inmenso número de antígenos extraños del medio ambiente. Además, el recién nacido debe permitir nuevas asociaciones microbianas en sus mucosas, que son benéficas para su salud (9).

El sistema inmune adaptativo del neonato es básicamente virgen (no hay células de memoria), debido a que el recién nacido no ha tenido contacto con la mayoría de los antígenos del ambiente, por lo que su primer enfrentamiento con nuevos antígenos depende principalmente de su sistema inmune innato (14). Se han reportado grandes diferencias entre el sistema inmune innato del neonato y el adulto, muchas de ellas originan nuevas diferencias en la inducción de la activación del sistema inmune adaptativo (11, 18). Esto ocasiona que la respuesta inmune neonatal global sea muy diferente a la del adulto (12, 19).

Se puede decir, de manera general, que los neonatos tienden a favorecer ciertos tipos de respuesta. Particularmente, se favorecen la respuesta Th2, que es la respuesta especializada para combatir parásitos helmintos y participa en las alergias, así como la respuesta de tolerancia que se encarga de terminar o impedir a otros tipos de respuesta inmune (14, 20, 21). La respuesta de tolerancia aumenta el umbral de la respuesta antigénica y, en el caso del neonato, favorece el establecimiento de la flora intestinal (20, 22). Por otra parte, se ha visto que la respuesta Th17, encargada de combatir a las bacterias extracelulares y los hongos, presenta niveles comparables con la de los

adultos, aunque viene acompañada de una secreción aumentada de IL-10 que le confiere tolerancia. Sin embargo, la respuesta Th1, que es la respuesta especializada en combatir patógenos intracelulares, es frecuentemente deficiente (20, 22).

Las células encargadas de orquestar los distintos tipos de respuesta inmune adaptativa son los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Estas células se encuentran en proporción similar en la sangre de adulto y neonato. Sin embargo, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales presentan características fenotípicas y funcionales distintas a las de los adultos, aunque son capaces de responder adecuadamente ante algunos retos antigénicos (15, 16, 23).

### ***Linfocitos T CD4<sup>+</sup>***

Los linfocitos T son células responsables de reconocer específicamente, mediante el receptor de células T (TCR), a péptidos antigénicos de patógenos particulares y de responder de manera apropiada para mediar su eliminación. Un subtipo de estos, los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, son células especializadas que se encargan de coordinar la respuesta inmune de otros tipos de células, como la de los linfocitos B, los macrófagos y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (24).

Para realizar su función, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes (que no han reconocido a su antígeno) deben primero activarse. Para su activación, los linfocitos reconocen al antígeno para el cual su TCR es específico, siempre y cuando este sea presentado por las APCs (células presentadoras de antígeno) en un contexto de MHC (Major Histocompatibility Complex) II. Además del antígeno, los linfocitos perciben señales co-estimuladoras (proteínas B7) por parte de las APCs, a través del receptor CD28. Así mismo, durante su activación los linfocitos TCD4<sup>+</sup> perciben señales del medio, como las citocinas que son secretadas por otras células y que regulan la diferenciación celular (24–27). La figura 1 ejemplifica la activación de un linfocito T CD4<sup>+</sup> por una célula dendrítica, la célula presentadora de antígeno profesional.

Los Linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados pueden diferenciarse en fenotipos efectores particulares, dependiendo del tipo de citocinas que se encuentran durante su activación, estas células diferenciadas son capaces de producir los mediadores adecuados (citocinas específicas) para promover la eliminación del patógeno (24, 28).

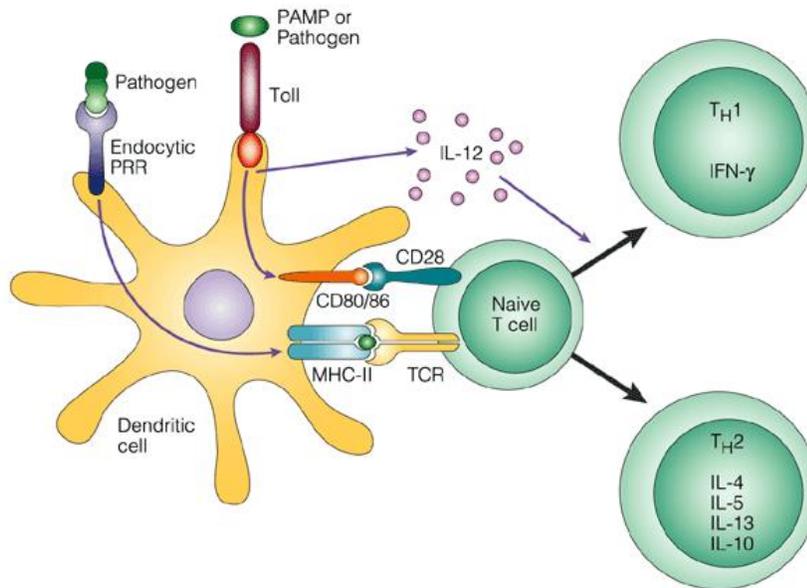


Figura 1. Activación y diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Se muestran las 3 señales requeridas para la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, y dos posibles vías de diferenciación. Figura tomada de (29).

En el tema de activación y diferenciación profundizamos en el capítulo de libro que publicamos en el 2016 y que corresponde al Anexo 1.

### ***Activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.***

La señalización de los linfocitos T a través del Receptor de Células T (TCR) (Figura 2) puede dividirse en 5 componentes principales para su estudio: (i) señalización temprana (azul), (ii) formación del señalosoma de LAT (Linker for Activation of T cells) y moléculas alternativas (iii) cascada de las MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) (verde), (iv) señalización mediada por PKC (Protein Kinase C)  $\theta$  (rojo) y (v) señalización mediada por calcio (amarillo). Estas vías llevan a la activación de las familias de factores transcripcionales, AP-1 (Activator Protein 1), NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa-B) y NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells). Además, dependiendo las señales co-estimuladoras se activan factores transcripcionales como CREB (cAMP response element-binding),  $\beta$ -catenina, y SRF (Serum Response Factor), que pueden cooperar o antagonizar con las señales del TCR (30–39).

Durante la señalización temprana, las cinasas LCK (Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) y/o FYN (Protein tyrosine kinase FYN) de la familia *src* son reclutadas al complejo TCR, ya sea

mediante su interacción con el co-receptor CD4 o con el receptor co-estimulador CD28, donde se encargan de fosforilar a los Motivos de Activación de Inmunoreceptor Basado en Tirosinas (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), ITAMs, de las cadenas CD3 y  $\zeta$  (35, 40–42). Los ITAMs fosforilados sirven como punto de anclaje a ZAP-70 (zeta-chain associated protein 70), la cual es fosforilada y activada por LCK. ZAP70 y LCK fosforilan a LAT (Linker for activation of T cells) en al menos 5 sitios. LAT es una proteína transmembranal que funciona como andamio para la formación de un complejo multi-proteico de señalización (el signalosoma del TCR) (43, 44). LAT fosforilada es un punto de anclaje para un grupo de proteínas de señalización, entre ellas PLC $\gamma$ 1 (phospholipase C gamma 1), la cual una vez reclutada es fosforilada y activada. PLC $\gamma$ 1 se encarga de lisar el PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate) presente en la membrana plasmática y de esta manera generar dos importantes segundos mensajeros: DAG (Diacylglycerol) e IP3 (Inositol triphosphate). Para el reclutamiento de otras proteínas de señalización al signalosoma de LAT son requeridas las proteínas GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2), GADS (GRB2-related adapter protein 2) y SLP76 (SH2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa) (43, 45–47). A partir del signalosoma de LAT se ramifican varias vías de señalización. La vía que es promovida por PKC $\theta$  lleva a la activación de NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) mediante la fosforilación del propio NF- $\kappa$ B y la fosforilación de su inhibidor I $\kappa$ B, evento que lo marca para degradación por el proteasoma (37). La principal cinasa que lleva a cabo estas fosforilaciones es el complejo IKK (Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase) (48, 49). Por otra parte, la vía dependiente de calcio lleva a la activación de NFAT (Nuclear Factor of Activated T Cell) (50) a través de la desfosforilación y activación del mismo. La fosfatasa responsable de esto es Calcineurina, que requiere de la Calmodulina asociada a calcio para llevar a cabo su función. Por su parte, las vías de las MAP cinasas llevan a la activación de AP-1 (Activator Protein 1) mediante la inducción de la expresión de Fos y su fosforilación y la fosforilación de Jun (51). Las señales co-estimuladoras de CD28 inducen además de las vías antes mencionadas a PI3K (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase), responsable de activar a CREB. Estas cuatro familias de factores transcripcionales median la expresión de una gran cantidad de genes, responsables de procesos como la proliferación, la supervivencia y la producción de citocinas anti- y pro-inflamatorias.

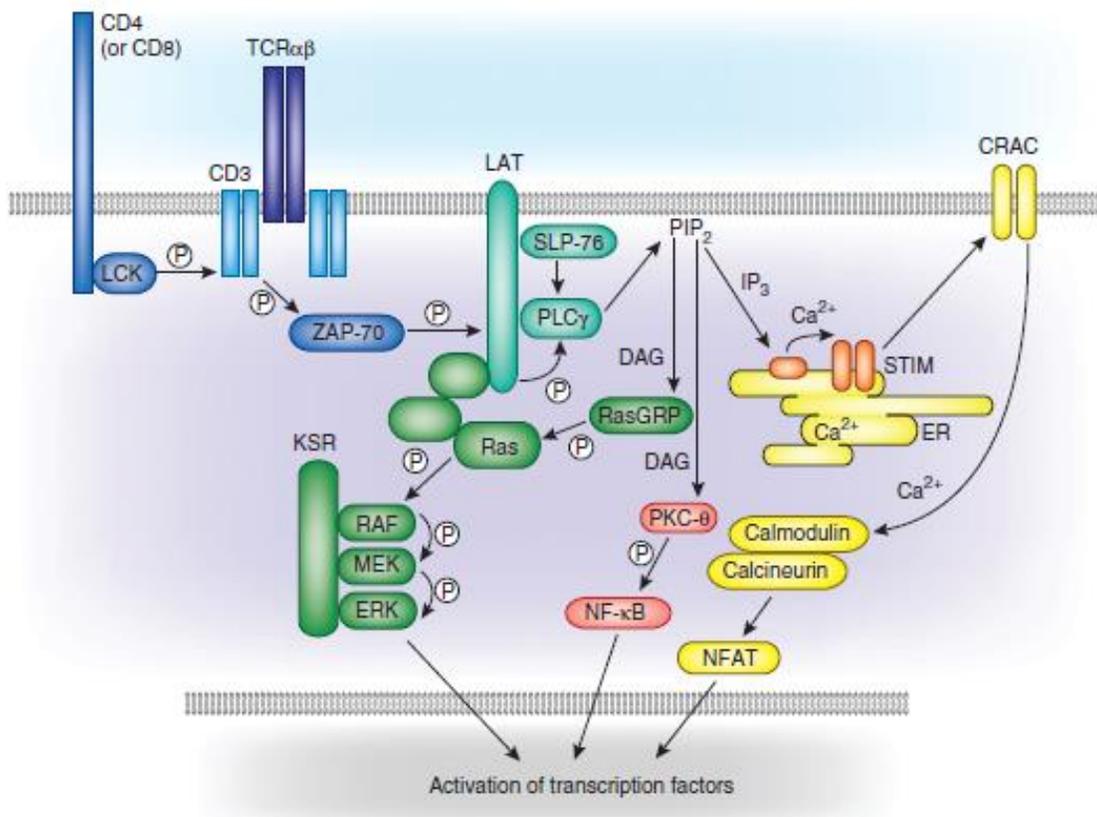


Figura 2. Señalización mediada por el TCR. Para su estudio, la vía se puede dividir en 5 componentes principales. Tomado de Morris and Allen, 2012 (30).

La magnitud y la dinámica de activación de estos factores transcripcionales es importante para determinar qué genes se expresan, dentro de todo el grupo de genes blanco (52). De la misma forma, la comunicación cruzada entre estas vías de señalización y la cooperación o el antagonismo entre los factores transcripcionales son determinantes de la expresión de genes de la respuesta inmune y el destino celular de los linfocitos (53, 54).

Cuando las señales del TCR (y co-estimuladoras) son suficientes para superar el umbral de activación de los linfocitos, y dependiendo de la naturaleza de las señales polarizantes presentes en el medio, estas células se diferenciarán en fenotipos efectoros específicos (24, 26, 55), como se describe a continuación.

### ***Diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.***

Las citocinas que los linfocitos perciben del microambiente durante su activación juegan un papel clave en la determinación del destino celular. Se sabe que la interleucina (IL) 12 y el interferón (IFN)  $\gamma$  promueven la diferenciación Th1 de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Estos son un subtipo de

linfocitos efectores encargados de mediar la respuesta contra patógenos intracelulares. Se caracterizan por expresar el factor transcripcional firma Tbet y producir varias citocinas para promover la respuesta de otros tipos celulares. El IFN $\gamma$  producido por estas células causa la activación de los macrófagos y mejora su actividad microbicida (26, 56, 57). Cuando el linfocito T CD4<sup>+</sup> percibe del medio IL-4 se diferencia hacia un fenotipo Th2. Estas células expresan al factor transcripcional firma GATA3 y producen, entre otras citocinas, IL-4, IL-5 e IL-13. Además, estas células median el cambio de isotipo de los linfocitos B hacia IgG1 e IgE y promueven la respuesta contra parásitos (58–61). Otras citocinas como IL-1, IL-6 y TGF- $\beta$  promueven la diferenciación hacia células Th17. Estas últimas expresan el factor transcripcional firma ROR $\gamma$ t y secretan IL-17 e IL-21, entre otras (62–64). Este subtipo celular media la respuesta contra hongos y algunas bacterias extracelulares. El TGF- $\beta$  también es importante para la diferenciación hacia iTreg, junto con la IL-10. Las iTregs se encargan de suprimir la respuesta inmune (65, 66).

En la figura 3 se muestran los 4 tipos principales de perfiles efectores de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, las citocinas que los promueven, los factores transcripcionales firma y las citocinas que producen, así como sus principales funciones. Además existen otros fenotipos efectores menos comunes, como las Th9, las Th21 y las T foliculares (Tfh), cuyas funciones no están del todo descritas (67–72). Incluso, se ha reportado que las células Tfh son en realidad un grupo celular que radica en los folículos pero que puede diferenciarse en todos los fenotipos específicos (70, 73).

Varios son los mecanismos que regulan la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Uno de ellos es la proporción y la relación entre los factores transcripcionales AP-1, NFAT, NF- $\kappa$ B y CREB, que se inducen por las señales del TCR y co-receptores. Por ejemplo, se sabe que las señales exclusivas y sostenidas de calcio (vía NFAT), conducen a un estado de anergia. Por otra parte, si domina la activación de NFAT sobre NF- $\kappa$ B, las células tienden a diferenciarse al fenotipo Th2. Mientras que si lo opuesto ocurre, se favorece el fenotipo Th1 (74–76). Sin embargo, mucho queda por entender sobre la forma en que estos factores transcripcionales pueden mediar la inducción y/o la estabilización de los factores transcripcionales firma de cada fenotipo efector (Tbet, GATA3, ROR $\gamma$ t y FOXP3).

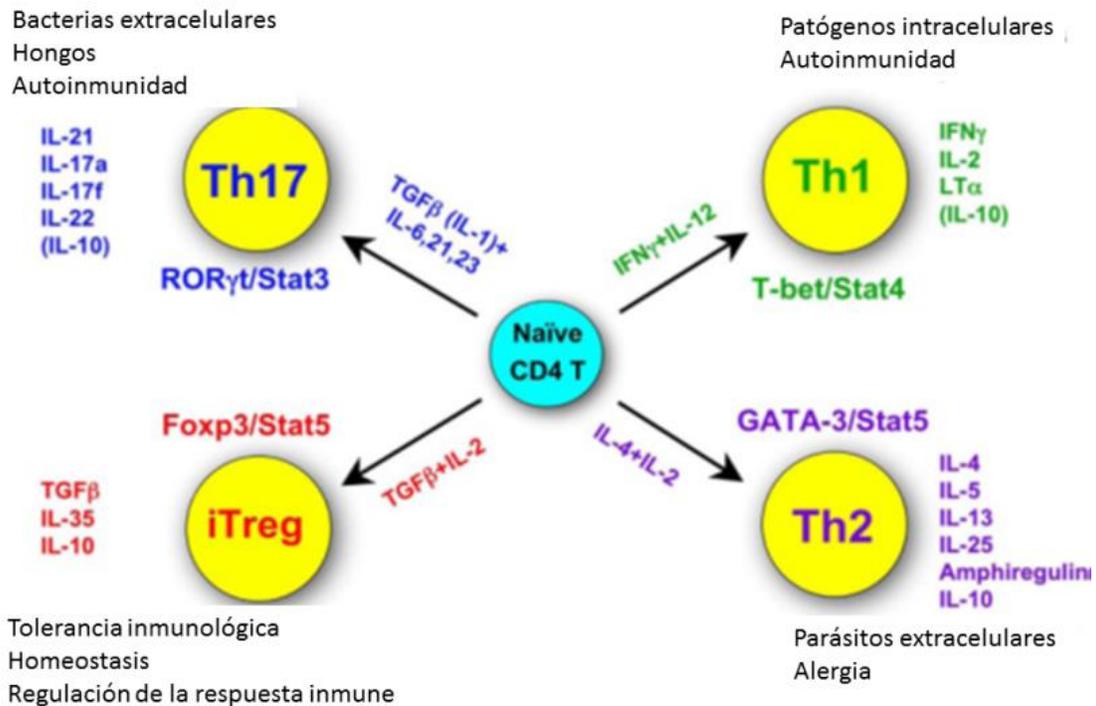


Figura 3. Diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Se muestran los 4 fenotipos efectoros más reconocidos. Modificado de Zhu *et al*, 2010 (25).

Es muy probable que durante la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4 otros receptores expresados en estas células, además del TCR, jueguen un papel importante. Muchos son los receptores que han sido descritos como moléculas co-estimuladoras (77, 78), entre ellos están los receptores tipo Toll (TLRs) (79, 80).

#### ***Importancia de los TLRs en linfocitos T CD4<sup>+</sup>.***

Los receptores tipo Toll (TLRs) son receptores membranales de reconocimiento de patrones moleculares de patógenos y de daño celular (PAMPs y DAMPs, respectivamente). Existen 13 TLRs en total, de los cuales 10 han sido identificados en humano (TLR 1 a 10) (81–83).

La expresión y función de los TLRs ha sido principalmente descrita en células de la inmunidad innata, como monocitos, células dendríticas y eosinófilos, sobre todo en ratón. Sin embargo, las células de humano también expresan y responden a los TLRs. Los ARNs mensajeros del TLR1 al 10 han sido reportados en diversos tipos celulares, incluyendo a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (80, 84). Aún más, la presencia de la proteína de algunos TLRs también ha sido reportada (80).

No solo se ha reportado que los linfocitos T expresan los RNAs mensajeros de la mayoría de los TLRs, además, se ha caracterizado un papel como receptores co-estimuladores para el TLR2, el TLR5 y el heterodímero TLR7/8 (6, 80, 83–85).

En linfocitos T CD4<sup>+</sup>, el TLR5 al reconocer a su ligando (flagelina), funciona como receptor co-estimulador, promoviendo la proliferación y la producción de IFN- $\gamma$  (84). Además, un pre-tratamiento con flagelina induce la posterior respuesta a las señales del TCR (86). En conjunto, esto nos permite plantear que tal vez la señalización del TLR5, o su efecto, podría hacer sinergia con la señalización del TCR para inducir la activación de estas células.

### ***Señalización por el TLR5.***

La caracterización de la vía de señalización mediada por el TLR5 se ha hecho en células epiteliales y en células de la inmunidad innata, como células dendríticas. En este tipo de células se sabe que al reconocer a su ligando, el TLR5 activa la vía de señalización dependiente de MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) para activar a TAK1 (TGF $\beta$ -activated kinase 1), también llamada MAP3K7 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7), aunque también se ha reportado que puede mediar la activación de la vía dependiente de TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ) (87).

TAK1 es una cinasa que se encarga de activar a las vías de las MAP cinasas y a I kappa Cinasa (IKK)  $\alpha\beta$ , que llevan a la activación de los factores transcripcionales AP-1 y NF- $\kappa$ B, respectivamente (88, 89). Además se ha reportado que el TLR5 puede activar la vía de señalización de PI3K, la cual promueve la activación del factor transcripcional CREB (90, 91).

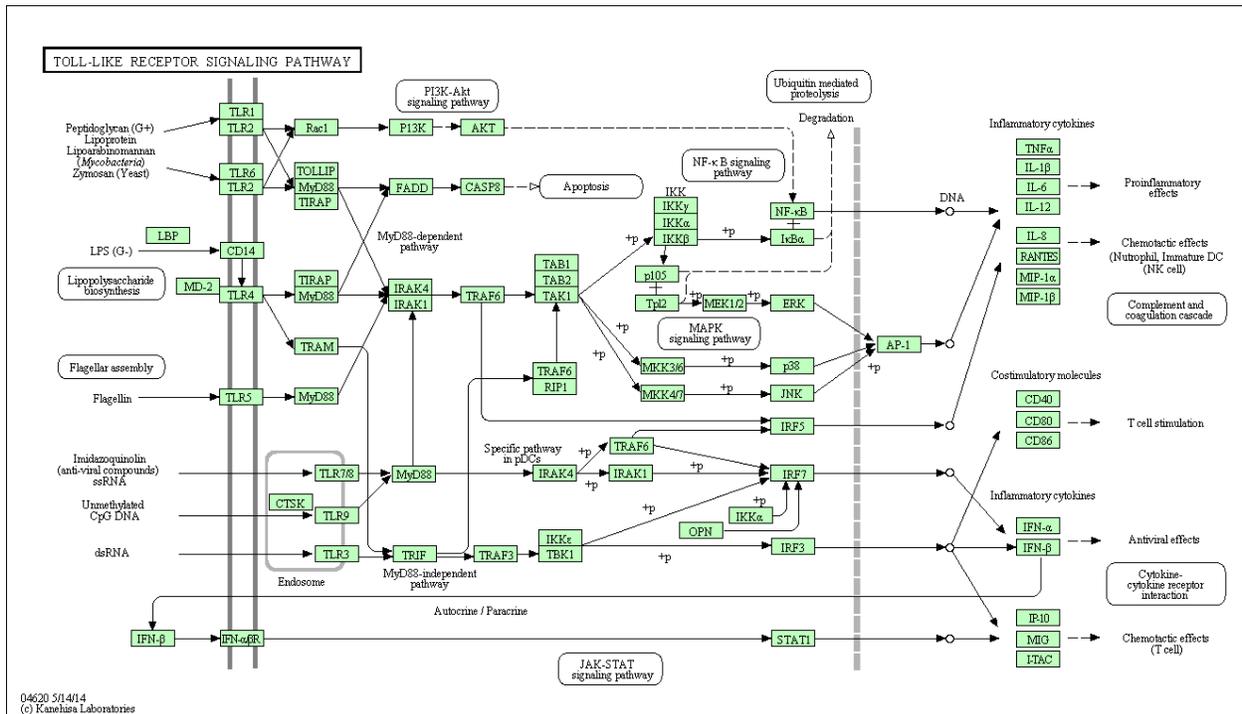


Figura 4. Señalización mediada por el TLR5. Mapa molecular ([http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa04620](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04620)) de la señalización por los TLRs. Al reconocer su ligando (flagelina), el TLR5 forma homodímeros, recluta a MyD88 y a las cinasas IRAK4 e IRAK1. Estas dos cinasas son activadas e interaccionan con TRAF6 el cual se activa y ubiquitina a las proteínas TAB y a NEMO. Este evento es importante para la activación de TAK1, el cual fosforila y activa a IKK, el cual a su vez fosforila a IκB y la marca para su posterior ubiquitinación y degradación, permitiendo la activación de NF-κB. TAK1 también es responsable de activar la vía de las MAP cinasas, e inducir la activación de AP-1.

La función de los TLRs está bien descrita en una gran variedad de tipos celulares, como los macrófagos y las células dendríticas, pero poco se sabe de su función en los linfocitos T. En estas células, los TLRs representan un campo poco explorado de vías de activación directa. Se sabe que en estas células, los TLRs pueden funcionar como receptores co-estimuladores durante su activación a través del TCR, pero además algunos pueden funcionar de manera independiente del TCR (80, 86).

Ya que las vías de los TLRs llevan a la activación de AP-1, NF-κB y CREB, los TLRs constituyen una fuente alternativa a la del TCR para la activación de estos factores transcripcionales en linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Es probable que los TLRs promuevan la activación robusta de NF-κB, AP-1 y CREB y promuevan la activación y la producción de citocinas.

Durante la activación de los linfocitos T, se disparan una serie de intrincadas vías de señalización a consecuencia de la estimulación mediante el TCR y los receptores co-estimuladores. Para entender un proceso tan complejo como la activación de los linfocitos T, es preciso estudiar las vías de señalización de los receptores que participan en este proceso, así como la regulación cruzada que existe entre ellas. Para eso es necesario emplear herramientas para la descripción detallada de la red, y que permitan, además, explorar las propiedades dinámicas que surgen de su estructura y de las interacciones entre las distintas vías. En este sentido, los modelos computacionales han probado ser una herramienta importante (27, 92, 93). Específicamente, los modelos lógicos han mostrado ser muy útiles para este tipo de tarea debido a que no requieren de valores de parámetros, frecuentemente desconocidos, para el análisis dinámico del sistema (94, 95). Tal es el caso del modelo de la señalización por el TCR publicado en el 2007 (27)

### ***Regulación epigenética de la expresión génica***

La regulación de la expresión genética es un proceso relevante que modula la función y la especificación celular. Cuando se estudian las diferencias funcionales entre tipos celulares, es posible mapear eventos de índole epigenética y transcriptómica que están regulando las funciones celulares. Por ejemplo, algunos enhancers y promotores suelen abrirse o cerrarse ante estímulos específicos y controlar la expresión de sus genes blanco, regulando así la función celular (96–98).

Para que un gen se exprese, es necesario que la RNA polimerasa sea reclutada a la región promotora y, con ayuda de co-factores y enhancers, promueva la transcripción, para lo cual, se requiere que la cromatina esté accesible. La accesibilidad de la cromatina es afectada por las modificaciones postraduccionales en las colas de histonas y la metilación del ADN (regulación epigenética). En los últimos años, se ha avanzado significativamente en la definición de un código de modificaciones en histonas y como estas modificaciones regulan la expresión génica (99–103).

Las modificaciones en las colas de histonas también funcionan como marcas y algunas de las más relevantes son la H3K4me3, H3K4me1, H3K27ac, H3K27me3 y H3K36me3. La H3K4me3 marca preferentemente zonas promotoras, mientras que la H3K4me1 marca regiones de enhancers. La H3K27ac co-habita con cualquiera de las dos modificaciones anteriores y marca la apertura de la cromatina; por lo tanto, un promotor activo tiene tanto H3K4me3 como H3K27ac, mientras que un enhancer activo tiene H3K4me1 y H3K27ac. La H3K36me3 marca regiones transcripcionalmente activas. Por su parte, la H3K27me3 es una modificación que marca el cierre de la cromatina. La accesibilidad de las regiones regulatorias a la RNA polimerasa y a co-factores

también es regulada por el nivel de metilación del ADN, siendo la hipermetilación una marca de cierre y la hipometilación una marca de apertura (104–106).

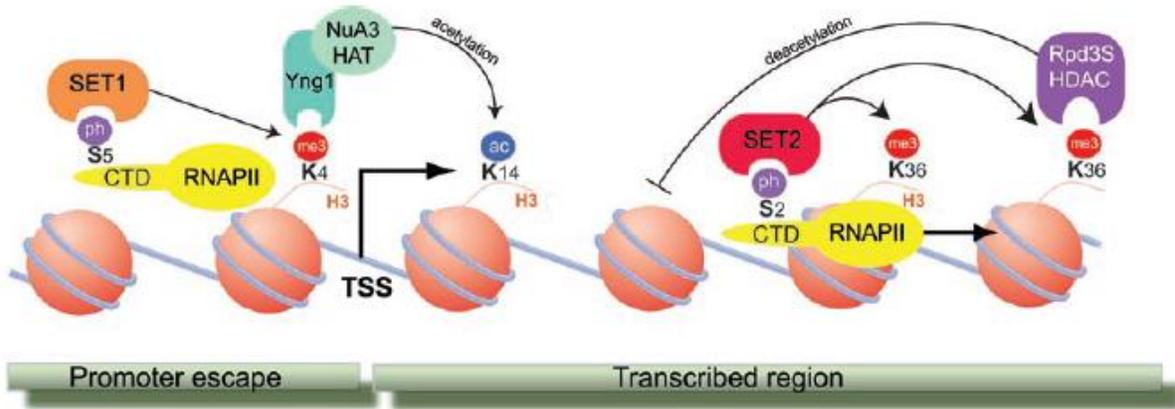


Figure 5. Modificaciones epigenéticas. Las colas de histonas modificadas reclutan proteínas, las cuales, a su vez, reclutan más complejos proteicos para regular la accesibilidad de la cromatina a la RNA Polimerasa y otros co-factores que regulan la expresión de genes blanco. Tomada de Bannister *et al.* 2011. (107).

### ***Modelado de redes biológicas.***

#### *Tipos de modelos*

Los modelos matemáticos y computacionales son herramientas útiles para el estudio de procesos dinámicos, tales como los procesos biológicos. Dichos procesos, ricos en componentes interactuantes y parámetros que regulan su función, son un reto para el modelador. Sin embargo, existen varios formalismos ampliamente recurridos para el abordaje de los mismos. Entre los formalismos más utilizados para el modelado de procesos biológicos se encuentran las ecuaciones diferenciales ordinarias y parciales, los formalismos lógicos discretos y de lógica difusa, entre otros. Difieren entre ellos por el nivel de fidelidad de la representación del proceso que describen, la complejidad de su análisis y el nivel de aproximación a la realidad que tienen sus resultados (108–110). La figura 6 compara distintos formalismos de modelado implementados en distinto software y el nivel de resolución de sus resultados.

		TIME RESOLUTION		
		steady state	discrete	continuous
STATE RESOLUTION	binary	<b>CellNOptR</b>	BooleanNet BoolNet ChemChains <b>CNORDt</b> Odefy	BooleanNet
	multi-state	CellNetAnalyzer MetaReg	GinSim	Genetic Network Analyzer
	continuous	<b>CNORfuzzy</b>		<b>CNORode</b> Odefy SQUAD

Figura 6. Tipos de modelado implementados en distintos softwares. Esta figura muestra una comparación de la resolución de los estados y el comportamiento temporal de un sistema logrado por distintos softwares. Tomada de (109).

### *Formalismo lógico*

El formalismo lógico discreto es una herramienta de modelado bien adaptada para el estudio de redes regulatorias biológicas, donde la información que se tiene respecto de estos sistemas es principalmente cualitativa (92, 111, 112).

Este formalismo permite la definición de una *gráfica regulatoria* (RG) a partir de una red de regulación, la cual puede ser una vía de señalización, una red de la regulación de la expresión de ciertos genes, una vía metabólica, entre otras. Para generar los modelos, se asignan variables a los componentes de la red y reglas lógicas que describen la evolución del sistema (*Modelo lógico*). A partir de la definición de 1 o más estados iniciales, se pueden hacer simulaciones para investigar la evolución del sistema. Tal proceso es representado por una *gráfica de estados de transición* (STG) (112, 113).

### *Gráfica regulatoria*

Como primer paso para el planteamiento de un modelo lógico, se puede crear una *gráfica regulatoria*, como la mostrada en la figura 7a, que describa la red regulatoria a modelar. Esta gráfica es creada a partir de la información publicada en la literatura o de alguna otra fuente de conocimiento. Dependiendo del sistema de estudio, la construcción de esta gráfica puede tomar mucho tiempo (111). Una *gráfica regulatoria* es un modelo en sí, dado que es una abstracción de la realidad, y algunos análisis pueden ser realizados usando teoría de gráficas para abordar el proceso bajo estudio (114).

Una *gráfica regulatoria* está compuesta por nodos y arcos (ver figura 7a). Los nodos representan los componentes de la red (proteínas, genes, metabolitos, complejos proteicos, etc), mientras que los arcos, que son las flechas que conectan a los nodos, representan las interacciones que ocurren entre los distintos componentes. Los arcos pueden ser desde una simple asociación física, una activación (modificación post-traducciona, activación de la transcripción, etc.) o una inhibición (degradación, modificación post-traducciona, inhibición de la transcripción, etc). Los arcos pueden tener dirección y signo, lo que dependerá del conocimiento que se tenga sobre cada una de las interacciones entre los componentes del sistema (111).

### *Modelo lógico*

Una vez descrita la *gráfica regulatoria* se asigna una variable lógica a cada nodo. Las variables pueden ser booleanas (si solo aceptan los valores 0 y 1) o multivaluadas (si aceptan otros valores además de los anteriormente mencionados). Con base en las interacciones entre los componentes de la red, se asignan reglas lógicas que definen el grado de presencia/actividad del componente (111). El conjunto de variables, las reglas lógicas que determinan la actividad del componente y los umbrales para la activación de cada nodo, constituyen el modelo lógico, el cual puede ser usado aún sin una representación gráfica (27). Sin embargo, el estudio de la red regulatoria y el modelo lógico son complementarios.

El planteamiento de las reglas lógicas que definen el estado de un nodo es un paso crítico, puesto que tales reglas son las que determinan el comportamiento dinámico del modelo. Es por eso que las reglas lógicas deben describir adecuadamente los conocimientos que se tienen acerca de la red regulatoria bajo estudio.

### *Gráfica de estados de transición*

A partir de una gráfica RG, su modelo lógico asociado y uno o más estados iniciales, es posible evaluar la evolución del sistema y representarlo como una gráfica de estados de transición (STG). Esta gráfica consiste en nodos, vectores que contienen los estados de cada componente del sistema, y arcos que conectan los nodos, que representan las transiciones entre los diferentes estados (113).

En una STG es posible identificar los *atractores*, que corresponden a los nodos que solo tienen entradas (arcos entrantes) y no salidas (arcos salientes). Estos pueden ser estados estables (estados sin sucesores) o componentes cíclicos (que denotan comportamiento oscilatorio) (111, 113). Sobre la gráfica STG se pueden realizar una serie de estudios que permiten conocer más acerca del sistema.

### ***Modelado en Ginsim***

Debido al gran tamaño de las redes que nos propusimos estudiar (de más de 100 nodos) y a la carencia de valores para los parámetros enzimáticos, optamos por el formalismo lógico discreto, que aún nos permite la definición del modelo de manera mecanística y realizar un análisis dinámico del modelo.

El software “Gene Interaction Network simulation suite” (GINSim), desarrollado en Java, nos permite la definición y el análisis de una gráfica regulatoria grande y el modelo lógico que se genera a partir de ella. GINSim provee una plataforma amigable al usuario para modelado lógico, usando el formalismo propuesto por R. Thomas (111). Además, cuenta con un conjunto de herramientas, como la de reducción de modelos y la definición de mutantes, que nos permitirían hacer un análisis dinámico de redes grandes bajo distintas condiciones. La reducción del modelo consiste en esconder los nodos intermedios, que no participan en la dinámica del sistema, asignando sus reguladores a los nodos que son blanco de estos y ajustando el modelo en concordancia con esto. Aún más, GINSim permite exportar la gráfica y/o el modelo a varios formatos y formalismos, para su posterior análisis con herramientas hechas para diferentes propósitos, tales como Cytoscape, MaBoSS, NuSMV, etc.

GINSim consta de 3 componentes principales: Una interface de usuario, un *core* de simulación (construcción de STG) y herramientas para el análisis de gráficas (111).

### ***Definición del modelo lógico***

GINSim tiene herramientas básicas de dibujo para la creación de una gráfica regulatoria. Los modelos creados en GINSim se guardan con el formato GINML (formato XML). Además, es

posible exportar la gráfica en una variedad de formatos (PNG, SVG, Graphviz, Biolayout, xgmml (cytoscape)), lo que permite realizar análisis complementarios con otro tipo de software.

A cada nodo de la gráfica se le atribuye: un rango de actividad (la variable asociada puede tomar sólo valores discretos pertenecientes a este rango) y parámetros lógicos (que describen el nivel de actividad del nodo dependiendo de sus interacciones). De esta manera, al definir las interacciones entre los componentes, los rangos de actividad y los valores objetivo para cada nodo, se está definiendo el modelo lógico (111).

La figura 7a muestra la gráfica regulatoria muy reducida del modelo de la diferenciación Th1/Th2 propuesto por Mendoza (2006) pero implementado en GINsim.

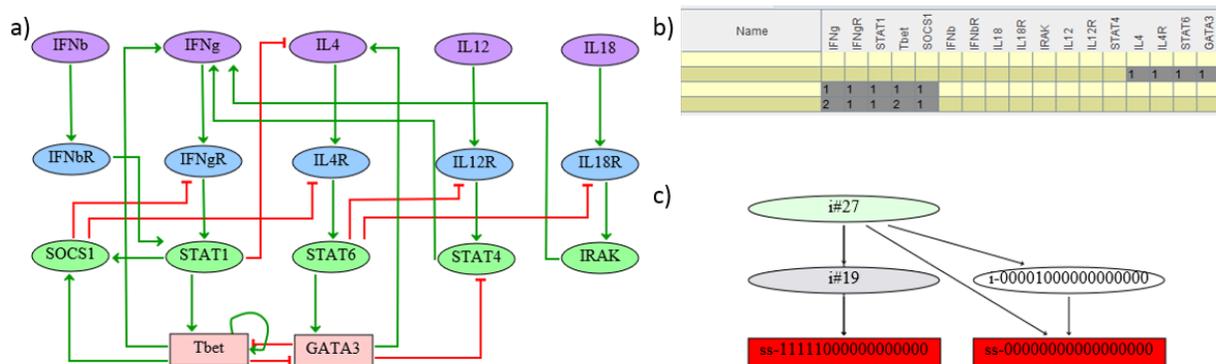


Figura 7. Análisis dinámico de un modelo lógico de la diferenciación Th1 vs Th2. El panel a) muestra la gráfica regulatoria del modelo de la diferenciación Th1 vs Th2 publicado por Mendoza et al. (2006) como se implementó en GINsim. El panel b) muestra los 4 atractores del modelo cuando no se especifican condiciones iniciales, los atractores son: No diferenciación, Th2, Th1 (1) y Th1 (2). El panel c) muestra la HTG del modelo cuando se especifica el estado inicial pro-Th1 (IL-12 en el medio), en rojo se muestran los nodos correspondientes a los 2 atractores obtenidos bajo estas condiciones.

### Simulaciones

Una vez definida la gráfica regulatoria y asignado el modelo lógico, GINsim puede evaluar el comportamiento del sistema y plasmarlo en una gráfica STG. En esta gráfica los nodos representan los estados (un valor es asignado para cada componente) y los arcos representan las transiciones entre estados.

Para realizar simulaciones es necesario:

- La definición de uno o un grupo de estados iniciales (opcional). La especificación de estados iniciales reduce el cómputo requerido para la simulación.
- La selección de un tipo de actualización (updating): Síncrono (todas las variables se actualizan al mismo tiempo), asíncrono (actualización de variables uno a uno) o mixto (definición de clases de prioridad).
- La definición de perturbaciones (opcional), tales como knock outs, knock ins, etc. Útil para estudiar el papel de las inhibiciones, o activaciones constitutivas, específicas de nodos particulares en la dinámica del sistema.

En ocasiones, la visualización de la gráfica STG no es soportada por GINsim, puesto que el tamaño crece exponencialmente con el número de componentes. En este sentido, GINsim permite el cálculo de los estados estables sin necesidad de calcular la STG (111, 113).

Cuando el número de nodos de la gráfica regulatoria es muy grande, y por consiguiente se dificulta el cálculo y la visualización de la STG, GINsim tiene una serie de herramientas que permiten superar estas dificultades, una de ellas es la generación de la gráfica gerárquica de transición (HTG).

La figura 7b muestra todos los estados estables del modelo de Mendoza et al (2006) y la figura 7c muestra la gráfica HTG obtenida cuando se especifica como condición inicial condiciones de estimulación pro-Th1. El modelo fue descargado de la página [www.ginsim.org](http://www.ginsim.org) y este fue importado en Ginsim para poder hacer las simulaciones, para lo cual se eligió el modo asíncrono de actualización.

### *Reducción del modelo*

A partir de un modelo detallado, es posible generar un modelo reducido mediante la eliminación de componentes intermedios, este modelo reducido deberá ser dinámicamente consistente con el modelo original. Si se elimina el componente G, se deben re-asignar todos los blancos del componente G como blancos de los reguladores de G. GINsim implementa un algoritmo que permite hacer esta re-asignación automáticamente (115).

Se siguen reglas específicas para la eliminación de componentes. Por ejemplo, componentes auto-regulados no son blancos para reducción, puesto que esto podría afectar el comportamiento dinámico del sistema. En este método de reducción, se asegura la preservación de una serie de propiedades dinámicas del modelo original. En particular, los estados estables y otros atractores complejos se conservan, pero podría ocurrir que surjan nuevos atractores cíclicos (113, 115).

#### *Prioridad de clases*

Otra estrategia para facilitar el cómputo de la STG consiste en asignar distintas clases de componentes con distinta jerarquía de prioridad (mixto). De esta forma, GINsim empezará haciendo la actualización de los componentes con mayor prioridad y en seguida el de los de menor prioridad (113). De esta forma, se acelera el cómputo considerablemente.

La creación y el estudio de modelos lógicos de redes regulatorias (tanto de señalización como genéticas) ha mostrado ser una herramienta muy útil para la exploración de las propiedades de tanto redes biológicas, como para la predicción del efecto de ciertas perturbaciones (27).

## **ANTECEDENTES**

A la fecha, se ha reportado la expresión de los TLRs en la mayoría de los tipos celulares, entre ellos los linfocitos T (84, 116). Aunque su función en estas células no está bien caracterizada.

En nuestro laboratorio hemos encontrado que de los TLRs expresados en Linfocitos T, el TLR5 parece expresarse más que el resto, tanto en células de neonato como de adulto (Tesis de licenciatura de Otoniel Rodríguez Jorge) y que su activación mediada por la flagelina induce la activación de NF- $\kappa$ B en estas células (Tesis de Maestría de Otoniel Rodríguez Jorge). Además, se ha reportado que el TLR5 es una molécula co-estimuladora para la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, promoviendo la proliferación y la producción de citocinas (84). Por lo tanto, el TLR5 es un candidato interesante para promover una mejor respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales mediante una estimulación directa.

En los últimos años se ha propuesto el uso de la flagelina (ligando de TLR5) como adyuvante para vacunas, ya que sus señales pueden promover una respuesta pro-inflamatoria de las APCs y mejorar su capacidad como células presentadoras de antígeno, lo que podría mejorar la respuesta contra patógenos (117–119). Incluso, hay vacunas en pruebas preclínicas que usan a la flagelina

como adyuvante (117, 120, 121). Sin embargo, las APCs de los neonatos no se activan eficientemente por los ligandos de los TLRs, en términos de producción de citocinas y capacidad de presentación de antígenos (20, 122).

En linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos, se ha reportado que la flagelina induce la proliferación y la producción de citocinas como IFN $\gamma$  cuando se usa como co-estimulo. En este mismo estudio, se reportó que el efecto es mayor en células de memoria que en células activadas y vírgenes (84). Por otra parte, en linfocitos T CD8<sup>+</sup> neonatales, se ha reportado que el co-estímulo de flagelina induce su proliferación y la producción de IFN $\gamma$  (6). Mientras que más recientemente, se ha reportado que el pretratamiento de linfocitos T CD4 de adulto con flagelina promueve su posterior respuesta al estímulo por el TCR, en términos de la producción de citocinas como IFN $\gamma$  (86).

Un estudio reciente muestra que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales presentan una baja activación de AP-1 y un elevado flujo de calcio (relacionado con la activación de NFAT) (123). Sin embargo, no se ha evaluado esto cuando se adiciona la señal del TLR5, la cual podría favorecer la activación de AP-1 y reestablecer el balance de los factores transcripcionales en las células neonatales. Un estudio reportó que el TLR5 es una señal co-estimuladora importante para la producción de IL-8 por los linfocitos T CD4 neonatales, pero no fueron más allá en la descripción del mecanismo ni la caracterización de la respuesta (124).

En nuestro laboratorio ya se caracterizó la respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonato y de adulto ante los estímulos del TCR, la flagelina y las señales conjuntas, en términos de la expresión de citocinas y la proliferación. Se encontró que las señales del TLR5 permiten la activación de las células de neonato y de adulto, favoreciendo la producción de IFN $\gamma$  (tesis de doctorado de Rosario Labastida Conde).

La comprensión de la regulación del balance de AP-1, NFAT, NF- $\kappa$ B y CREB durante la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y su importancia en el establecimiento de la respuesta celular, se puede abordar desde un enfoque de la biología de sistemas. Para ello, es necesario emplear herramientas computacionales que nos brinden un primer acercamiento al problema, como la construcción de un modelo lógico (cualitativo) de la red regulatoria. Un modelo validado sería de utilidad para el estudio de la regulación del balance de NFAT, AP-1, NF- $\kappa$ B y CREB en células T CD4<sup>+</sup> de adultos humanos, que servirá de base para la comparación con las células neonatales.

Ya se han estudiado algunos aspectos de la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> a través del empleo de modelos matemáticos, pero la respuesta de estas células de neonato a las señales del TLR5 usando modelos computacionales no se ha hecho. A continuación, se muestra una tabla que resume los modelos publicados sobre la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

**TABLE 1 | Selected logical models of T cell signal transduction and gene regulation.**

Publication	Characteristics (nb components)	Dynamics	Availability
Mendoza, 2006	Multilevel model; CD4+ T cell differentiation regulatory network (17)	Stable state analysis, perturbation analysis, circuit analysis	GINsim
Saez-Rodriguez et al., 2007	Boolean model; T cell receptor signal transduction network (94)	Stable state analysis, input and perturbation analysis	Cell Collective
Zhang et al., 2008; Saadatpour et al., 2011	Boolean model; T cell survival signal transduction network (60)	Asynchronous update, perturbation analysis, model reduction, attractor identification	GINsim Cell Collective
Naldi et al., 2010	Multilevel model; CD4+ T cell differentiation regulatory network (65)	Asynchronous update, model reduction, circuit analysis, Th cell plasticity	GINsim
Martinez-Sosa and Mendoza, 2013	Boolean model; CD4+ and CD8+ T cells regulatory network (50)	Synchronous update, attractor analysis, perturbation analysis	Cell Collective
Miskov-Zivanov et al., 2013	Multilevel model; TCR signaling pathways (38)	Random asynchronous update, introduction of delays, duration of input stimuli modeled as a number of updating rounds	Cell Collective
Conroy et al., 2014	Boolean model; TCR and Integrin signaling network and T cell differentiation regulatory network (188)	Synchronous update, stochastic inputs, perturbation effects on downstream components	Cell Collective
Oyeyemi et al., 2015	Boolean model; HIV-T cell interaction network (137)	Stable state analysis, perturbation analysis	Cell Collective
Abou-Jaoudé et al., 2015	Multilevel model; CD4+ T cell differentiation regulatory network (101)	Asynchronous update, model reduction, stable state analysis, model checking, Th cell plasticity	GINsim
Martinez-Sanchez et al., 2015	Boolean model; CD4+ T cell differentiation regulatory network (85)	Model reduction, attractor analysis, perturbation analysis, Th cell plasticity	Cell Collective BioModels DB (non-curated branch)

Tabla 1. Modelos matemáticos que estudian la función de los linfocitos T CD4. Tomado de Abou-Jaoudé, *et al.* (112).

Un ejemplo de cómo el modelado computacional de la activación de linfocitos T CD4 aporta información relevante acerca del funcionamiento del proceso es el artículo publicado por Sáez-Rodríguez, *et al* en el 2007 (27). Ellos generan un modelo lógico de la red de señalización inducida por las señales del TCR, CD28 y CD4 y son capaces de recapitular el comportamiento global de la red, y posteriormente, predicen algunos eventos de señalización inesperados que luego validan experimentalmente.

## HIPÓTESIS

Un modelo dinámico, enriquecido con datos de transcriptoma y epigenéticos, de la señalización a través del TCR y del TLR5, nos permitirá encontrar los nodos desregulados en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales y encontrar vías alternas funcionales, que permiten su activación equilibrada.

## OBJETIVOS

### General:

Analizar el transcriptoma y el mapa epigenético de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos y adultos humanos y la señalización a través del TCR y el TLR5, con el fin de generar un modelo dinámico predictivo de los posibles nodos afectados en las células neonatales.

### Específicos:

1. Caracterizar globalmente las vías que regulan la función de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales a partir del estudio de los genes diferencialmente expresados en linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes de neonatos y adultos humanos, así como las marcas epigenéticas que regulan su expresión.
2. Crear modelos lógicos de las redes de señalización del TCR y el TLR5 que regulan la activación del linfocito T CD4<sup>+</sup> y validar la expresión de todos los componentes de los modelos usando los datos epigenéticos y de transcriptoma.
3. Crear un modelo fusionado de las vías del TCR, CD28 y el TLR5 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de humano.
4. Evaluar experimentalmente la activación de NF- $\kappa$ B, AP-1 y CREB cuando se estimulan mediante el TCR, TLR5, TCR + CD28, o TCR + TLR5, linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos.
5. Adaptar los modelos con los datos experimentales y usarlos para hacer predicciones acerca del funcionamiento de las vías de señalización en linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales.

## METODOLOGÍA

### *Modelado de las vías de señalización.*

La generación de los modelos lógicos se realizó usando el software GINsim, por lo que consistió en 3 pasos principales: la generación de la red de regulación, la definición del modelo lógico, y la

definición de escenarios (condiciones iniciales, reducciones y mutantes). La generación de la gráfica de regulación implica la descripción detallada de las vías de señalización en la forma de una red (gráfica) de señalización. Ésta es un modelo gráfico estático, que debe ser cuidadosamente anotado de acuerdo a las fuentes de interacciones (bases de datos, literatura, etc.), y que sirve como andamio para la generación de un modelo dinámico. La estrategia de modelado dinámico que se implementa en GINsim es el modelado lógico discreto, en su variante multinivel (111). A cada nodo de la red se le asignó una regla lógica que determina su nivel de activación, así mismo, se asignó un rango de activación, ambas cosas conforman el modelo lógico. Las simulaciones con el modelo lógico se realizaron mediante un esquema de actualización (*updating*) asíncrono y/o usando clases de prioridad, debido al tamaño y la conectividad entre los nodos. Independientemente, los modelos fueron reducidos (algoritmo implementado en GINsim) y se generó la gráfica jerárquica de transición (HTG). Para simular el efecto de nodos específicos sobre la dinámica del sistema se simularon *Knock outs* de los componentes.

#### *Análisis bioinformático de datos obtenidos mediante ChIP-seq.*

Los datos de ChIP-seq se obtuvieron del consorcio Blueprint (<http://www.blueprint-epigenome.eu/>), que tiene datos de linfocitos T CD4 de adultos y neonatos humanos. Este consorcio es un esfuerzo de la comunidad científica para caracterizar el epigenoma y transcriptoma de células humanas. Se obtuvieron los archivos BED correspondientes a los picos de 6 marcas de cromatina: H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, H3K27me3, H3K9me3 y H3K36me3, de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos humanos (3 neonatos y 5 adultos). Estos datos se usaron para generar modelos de Markov de los estados de la cromatina usando ChromHMM (<http://compbio.mit.edu/ChromHMM/>) (125). ChromHMM es un programa de línea de comandos, desarrollado en Java, que permite entrenar un modelo de Markov a partir de distintas marcas de cromatina y genera los segmentos del genoma correspondientes a cada estado (combinación de marcas). Usamos R para obtener los segmentos correspondientes a los estados que identifican a promotores y enhancers activos y los usamos para obtener las listas de genes asociados a estas regiones regulatorias.

Tanto los análisis epigenéticos como los datos de transcriptoma sirvieron para validar los modelos lógicos. Específicamente, para verificar que los nodos incluidos en los modelos efectivamente estén siendo expresados en estas células.

#### *Análisis de datos obtenidos mediante RNA-seq*

Se usaron los archivos gff reportados por el consorcio Blueprint, se obtuvieron los conteos de reads (fragmentos secuenciados) y a partir de ellos se realizó el análisis de expresión diferencial con las paqueterías DESeq2 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>) y EdgeR (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>) en R.

### *Purificación y cultivo celular*

La purificación se realizó en varios pasos secuenciales. Primero se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs y CBMCs) a partir de concentrados leucocitarios y de sangre de cordón umbilical, mediante centrifugación con gradiente de Ficoll. Las células mononucleares fueron puestas en medio en cajas de cultivo durante toda la noche, para deshacerse de las células adherentes. Posteriormente, las células fueron recuperadas y se realizó una incubación de 40 min con 1 ml de eritrocitos de la misma muestra, guardados un día anterior, y cocktail RosetteSep (StemCell Technologies) para enriquecimiento de células T CD4<sup>+</sup>, en seguida se realizó una centrifugación con gradiente de Ficoll y se recuperaron los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Posteriormente, se eliminaron las células de memoria, o las impurezas en el caso de las muestras de neonato, mediante una incubación con anticuerpos acoplados a perlas magnéticas (Pierce) y con ayuda de un Rack magnético (StemCell Technologies). Para la eliminación de células de memoria se usaron anticuerpos contra CD45RO y CD44, mientras que para mejorar la pureza de las células de neonato se usaron anticuerpos para CD11b y B220.

### *Tinción intra y extracelular*

La tinción intra y extracelular se realizó incubando las células con anticuerpos específicos durante 30 min a 4°C. La tinción intracelular requiere dos pasos previos: Fijación con formaldehído al 1.5% y permeabilización con MeOH absoluto frío. Tras la incubación se hacen dos lavados con solución de facs (PBS + SFB 2%), y se fijan las células con formaldehído 1%.

### *Citometría de flujo*

Se empleó citometría de flujo para evaluar la expresión de proteínas extra e intracelulares. Las proteínas que se evaluaron: p65 (rabbit polyclonal; Santa Cruz Technologies), CREB (Rabbit monoclonal, Cell Signalling Technologies) y cJun (rabbit monoclonal, Genetex), y la fosforilación de IKK $\alpha/\beta$  (rabbit monoclonal, Thermo Fisher), cJun (rabbit monoclonal, GeneTex), CREB (Rabbit monoclonal, Cell Signalling Technologies) y p65 (Miltenyi Biotec). Además, se evaluó la

presencia de marcadores de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes (CD3, CD4, CD45RO y CD45RA, CCR7 y CD62L).

## RESULTADOS

### **Generación y validación de un modelo de la señalización por medio del TCR.**

Al reconocer a su antígeno por medio del TCR, se desencadena una red intrincada de eventos de señalización intracelular en los linfocitos T. Para facilitar su estudio, se pueden distinguir en dicha vía 5 grupos de eventos importantes: (1) La señalización temprana, (2) la formación del señalosoma (signalosome) de LAT o moléculas alternativas, (3) la vía de PKC $\theta$ , (4) las vías de las MAP cinasas, y (5) la vía dependiente de Calcio. Para una revisión a detalle de las vías de señalización que dirigen la activación del linfocito T, ver el capítulo “Recent insights in T cell activation and differentiation” que publicamos en el libro “Recent trends in Immunology” (Anexo 1). El estudio de la señalización mediada por el TCR es un reto, y para abordarlo decidimos generar un modelo lógico que describiera los eventos más importantes y que al mismo tiempo nos permitiera un análisis de la dinámica del proceso. Por tal motivo, tomamos un modelo previamente publicado (2007) por Julio Sáez-Rodríguez y lo actualizamos ampliamente a la literatura más reciente. Para la generación y anotación (y posteriormente, el análisis) de tal red usamos el software GINsim (<http://www.ginsim.org/>). Para actualizar este modelo revisamos la información contenida en las bases de datos de REACTOME (<http://www.reactome.org/>; [R-HSA-202403.4](#)) y KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>; [map04660](#)) relativa a esta vía hasta Septiembre del 2016. Así mismo, revisamos la información publicada en revistas científicas especializadas a la misma fecha. En general, las bases de datos no contienen la información más reciente, y fue requerida la curación manual de la información. En la medida de lo posible, se utilizó información concerniente a linfocitos T CD4<sup>+</sup> de humano. Sin embargo, en muchos casos se tomó en cuenta información reportada para otros tipos celulares relacionados, como lo son los linfocitos T CD8 de humano, algunas líneas celulares como la Jurkat, y linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratón. Dicha información está plasmada en la anotación correspondiente del modelo. Consideramos que, siempre que las proteínas que participan en un evento de señalización en un tipo celular diferente a los linfocitos

T CD4<sup>+</sup>, también estén expresadas en estos últimos, podemos proponer que dicho evento de señalización puede tener lugar en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Esto es más probable si existe una relación cercana, respecto a la especie y el linaje celular, entre los tipos celulares en consideración y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de humano, tal es el caso de las células antes mencionadas. La literatura utilizada para la construcción del modelo está citada en el mismo modelo, que además tiene las ligas (hyperlinks) correspondientes a las entradas de Pubmed y a HUGO. Posteriormente, la expresión de todos los componentes del modelo en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de humano fue verificada con los datos publicados por el consorcio BLUEPRINT (<http://www.blueprint-epigenome.eu/>). Específicamente, para considerar que un gen está expresado en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de humanos, se verificó que este tuviera un valor de al menos 1 RPKM (reads per kilobase per million) en los datos de RNA-seq, y que tuviera marcas epigenéticas de promotor activo, enhancer activo, o de transcripción activa traslapando la región génica (Sección 3 de los resultados). El modelo resultante describe a detalle la vía de señalización del Receptor de Células T (TCR) en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de humano (Figura 8). Dicho modelo consiste en: 110 componentes (nodos) y 229 interacciones (arcos) que los conectan. De los 110 nodos, 2 son entradas (TCR y CD28) y 6 son salidas del modelo; los cuales son 6 fenotipos (Anergia, Citocinas pro-inflamatorias, citocinas anti-inflamatorias, progresión del ciclo celular, supervivencia y remodelación del citoesqueleto). Además, incluimos a 6 factores transcripcionales importantes (NF-κB, AP-1, NFAT, SRF, CREB y β-catenina). La tabla 2 muestra cómo se asignaron las reglas de los nodos fenotípicos, de acuerdo a su capacidad de ser promovidos por los factores transcripcionales antes mencionados. En la figura 8 se aprecian las entradas en verde, los factores transcripcionales en amarillo y los fenotipos en gris. Los arcos verdes y rojos que conectan a los distintos componentes representan las influencias sobre la activación de estos componentes, donde la activación es representada por un arco verde y la inhibición por un arco rojo.

Para asignar el modelo lógico a la red de regulación, se especificaron los parámetros lógicos y los umbrales de activación que regulan la activación de cada nodo en GINsim. Para los detalles del formalismo lógico usado en GINsim, vea el capítulo introductorio de modelado lógico y los materiales y métodos.

Validamos y afinamos el modelo lógico de 2 formas: Primero, verificamos que el comportamiento correspondiera con los datos publicados en la literatura; es decir, que para determinada entrada se produjera la salida esperada. Como se puede ver en la figura 9, al estimular con CD3 + CD28 se

activan las proteínas de señalización (Por ejemplo: IKK y PI3K), los factores de transcripción (NFAT, CREB, AP-1 y NF- $\kappa$ B) y los nodos fenotípicos. Segundo, verificamos que cuando realizamos perturbaciones a la red (mutaciones) se reprodujera lo reportado en la literatura para esas perturbaciones. Específicamente, se simularon los *Knock outs* (KO) para PKC $\theta$  y PI3K, y se verificó que estos reprodujeran los datos de la literatura; es decir, que cuando se muta PKC $\theta$  no se activa NF- $\kappa$ B ni la expresión de citocinas pro-inflamatorias y que cuando se muta PI3K no se activa NF- $\kappa$ B, AP-1 ni los nodos fenotípicos, excepto Anergia. Fue necesario revisar detalladamente el modelo para poder realizar las afinaciones correspondientes y lograr que este reprodujera los resultados experimentales reportados. La figura 9 muestra el resumen de las validaciones por medio de las simulaciones del modelo.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> expresan otros receptores además del TCR, como receptores de citocinas y receptores de moléculas co-estimuladoras, que suministran señales que son integradas por la célula y que regulan su activación y diferenciación. Algunos de los receptores que son importantes para la activación del linfocito T CD4<sup>+</sup> son los TLRs. El TLR5, el TLR2 y el heterodímero TLR7/8 ya han sido reportados como importantes receptores co-estimuladores que regulan la activación y función de los linfocitos T.

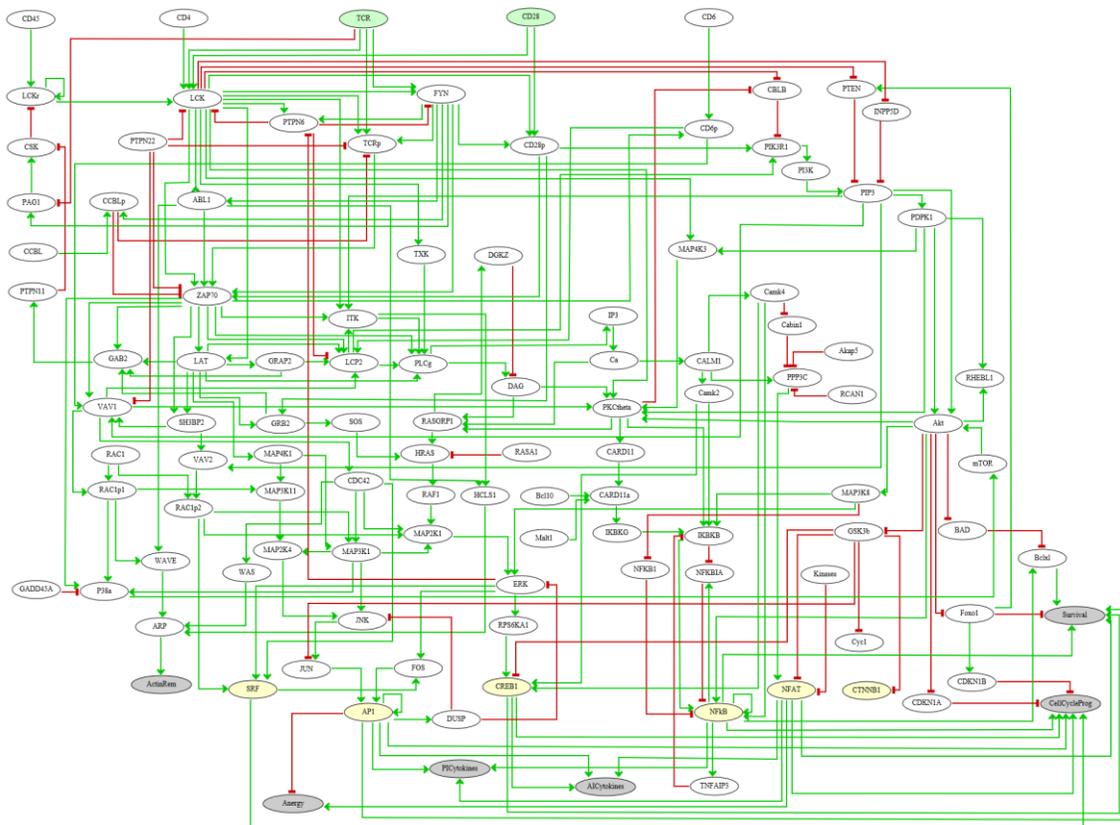


Figura 8. Modelo de la señalización mediada por el Receptor de Células T (TCR). El modelo del TCR consta de 110 nodos y 229 arcos que los conectan. 2 entradas (nodos verdes), 6 factores transcripcionales clave (amarillo), 6 salidas correspondientes a nodos fenotípicos (grises) y 96 componentes intermedios (nodos blancos) conforman la red.

TCR model stable States

	TCR CD28	PKCtheta	PI3K	IKBKB	P38a	JNK	ERK	GSK3b	NFkB	AP1	NFAT	CREB1	AICytokines	PICytokines	CellCycleProg	Survival	ActinRem	Energy
Unstimulated																		
TCR	■																	
TCR + CD28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Unstimulated																		
TCR	■																	
TCR + CD28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Unstimulated																		
TCR	■																	
TCR + CD28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

WT  
PKC KO  
PI3K KO

Figura 9. *Cómputo de los estados estables del modelo del TCR*. Esta figura muestra los atractores (estados estables) que se obtienen con 3 condiciones de estimulación: Sin estímulo (Unstimulated), TCR, y TCR + CD28; además de 3 condiciones iniciales: *Wild type* (WT), *Kock-out* (KO) de PKC $\theta$  (PKC KO) y KO de PI3K (PI3K KO). En esta figura las celdas azules representan los valores 1 (estado activo), mientras que las celdas blancas representan valores 0 (estado inactivo).

Fenotipos	Factores transcripcionales o activadores
Citocinas proinflamatorias	NF- $\kappa$ B(76, 126–129), NFAT(127, 129–133), AP-1(129, 133–135)
Citocinas antiinflamatorias	NFAT(136), AP-1(129, 137), CREB(129, 137–139)
Progresión del ciclo celular (proliferación)	NF- $\kappa$ B(140), NFAT(133, 141, 142), AP-1(133, 143), CREB(139, 144)
Supervivencia	NF- $\kappa$ B(145), NFAT(142, 146), AP-1(143, 147), CREB(139)
Remodelado del citoesqueleto de actina	WAS(148–152), WAVE(148, 149, 151), ARP2/3(148, 151, 152)

Tabla 2. Nodos fenotípicos y proteínas que los inducen.

### Generación y validación de un modelo de la señalización mediada por el TLR5.

Los receptores tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés) son receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y/o daño celular (DAMPs). Hay 10 TLRs descritos en humano (TLR1-10), y su papel en la respuesta inmune innata ha sido ampliamente estudiado durante muchos años(153–155). Sin embargo, su papel como moléculas co-estimuladoras en la respuesta adaptativa está menos descrito (6, 83). El TLR5 reconoce al monómero de flagelina, una proteína que forma parte del flagelo de muchas bacterias (89, 156). El papel del TLR5 como molécula co-estimuladora fue demostrado por Caron *et al.* (2005). Ellos mostraron que la flagelina puede promover la proliferación y la producción de IFN $\gamma$  por parte de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (84). La flagelina es actualmente un prometedor coadyuvante para vacunas (121). Por lo tanto, un modelo dinámico de la respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> a la flagelina sería una herramienta muy útil, sobre todo si se usa en combinación con un modelo del TCR. Por todo lo anterior, decidimos generar un modelo de la activación de la vía del TLR5 por la flagelina, validado para los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.

Debido a que no había suficiente información acerca del papel del TLR5 en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tuvimos que tomar información proveniente de otros tipos celulares. Sin embargo, tal como lo hicimos con el modelo del TCR, validamos la expresión de todos los componentes del modelo del TLR5 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> con la información del consorcio BLUEPRINT. Para validar la expresión de cada componente, consideramos que este estaba expresado si tenía un RPKM de al menos 1 así marcas de promotores y/o enhancers activos o transcripción traslapando las regiones regulatorias o génicas.

Nuestro modelo del TLR5 consiste de 2 vías principales, la que depende de la formación del macro-complejo que contiene a MyD88 y/o TRIF y la dependiente de PI3K. La vía del mydosoma lleva a la activación de TAK1, la cual se encarga de activar a las MAP cinasas y a IKK, produciendo la activación de AP-1 y NF-κB. La vía dependiente de PI3K lleva a la activación de CREB y AP-1. La figura 10 muestra nuestro modelo de la vía del TLR5, el cual consiste en 1 entrada, el TLR5 (verde) y 3 salidas (gris), además incluye a 3 factores transcripcionales (amarillo) importantes. En total, el modelo del TLR5 consta de 42 nodos y 77 arcos que los conectan. La figura 11 muestra la validación del modelo del TLR5 con base en las simulaciones. Esta figura es similar a la figura 9, y muestra (parcialmente) el estado estable obtenido cuando se estimula (o no) a las células T CD4<sup>+</sup>. Dos perturbaciones son simuladas para verificar que el modelo reproduce los datos esperados bajo condiciones de mutación (*knock-out*). En la figura se observa que cuando se muta TAK1 no es posible la activación de los factores transcripcionales ni de los fenotipos. Así mismo, cuando se muta PI3K no se activan los nodos fenotípicos de citocinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias, ni supervivencia. Ya que no contábamos con información en la literatura respecto a la activación de la vía de señalización del TLR5 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, decidimos validar experimentalmente el funcionamiento de la vía en condiciones wild type y estimulación, como se muestra en una sección más adelante (Validación experimental del modelo del TLR5).



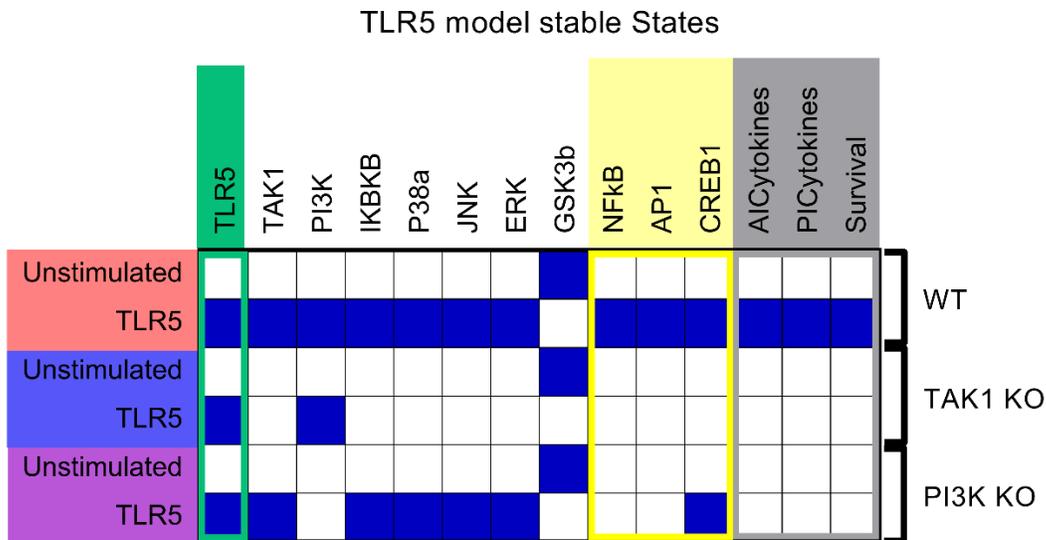


Figura 11. Cómputo de los estados estables del modelo del TLR5. El cómputo de los atractores estables se hizo con 2 condiciones de estimulación y 3 condiciones iniciales. Las 3 condiciones iniciales fueron: Wild type, KO de TAK1 y KO de TLR5. Al igual que en la figura 8, las celdas azules representan los valores 1, mientras que las celdas blancas representan valores 0.

### Validación de la expresión de los componentes de los modelos.

En la medida de lo posible, para la construcción de los modelos se consideró solo información proveniente de linfocitos T CD4<sup>+</sup> humanos. Sin embargo, algunas interacciones y regulaciones postraduccionales han sido reportadas solo para linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> de ratón, o para líneas celulares. Cuando había suficiente información (al menos dos reportes) para considerar relevantes a estas interacciones y/o modificaciones, estas fueron incluidas en los modelos. Toda la literatura que se usó para la construcción del modelo está referida en el modelo mismo, suministrado como material suplementario.

Como resultado, se obtuvieron modelos extensos y no exclusivamente para linfocitos T CD4 de humano, por lo tanto, tuvimos que validar la expresión de todos los componentes de los modelos en nuestras células. Para realizar esto, usamos los datos públicos del consorcio BLUEPRINT. El

cual, es un esfuerzo multinacional para describir la expresión génica y la regulación epigenómica de diversos organismos y tipos celulares de humano.

Para validar la expresión de todos los componentes de los modelos, tomamos los datos de expresión génica de BLUEPRINT y verificamos la expresión de todos los componentes de los modelos (RPKM  $\geq 1$ ). Para esto, tomamos el archivo de cuantificación de genes (.gff) reportado por BLUEPRINT y comparamos estos datos con las listas de genes de los modelos del TCR y el TLR5. También extrajimos las regiones promotoras ( $\pm 1000$ bp del inicio del gen) de todos los genes, además de las regiones génicas, y verificamos que estas regiones tuvieran marcas de promotores activos ( $H3K4me3^+H3K27ac^+$ ), enhancers activos ( $H3K4me1^+H3K27ac^+$ ), y de transcripción ( $H3K36me3$ ). La identificación de promotores activos, enhancers activos y transcripción fue realizada usando el programa ChromHMM, que genera un modelo de los estados de la cromatina a partir de los datos de picos de las marcas de cromatina. La figura 12 muestra como ejemplo a la proteína LCK, sus niveles de expresión y la presencia de los estados de la cromatina característicos de promotor activo, enhancer activo y transcripción.

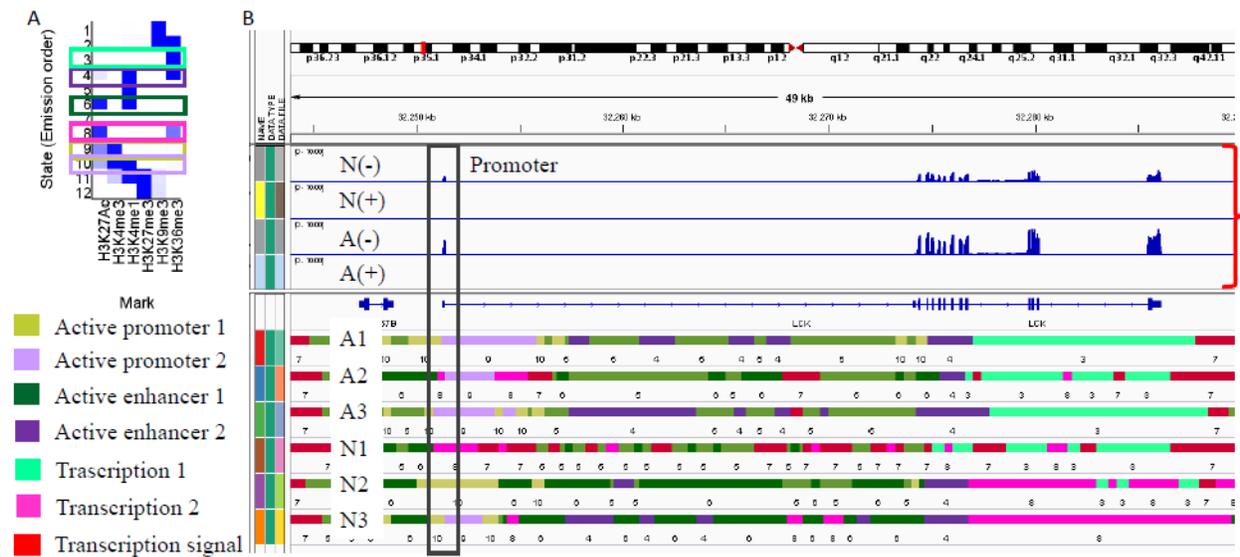


Figura 12. *Ejemplo de validación de la expresión de los nodos.* Esta figura muestra a LCK, los niveles de expresión (RNA-seq) y los estados de la cromatina y su distribución a lo largo de la región promotora y génica. De acuerdo a esta figura, LCK se expresa en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adulto (A) y de neonato (N).

## **Validación experimental del modelo del TLR5.**

Caron *et al* (2005) reportaron la expresión del TLR5 (a nivel del mensajero) en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y demostraron su importancia como molécula co-estimuladora al promover la expresión de IFN- $\gamma$  y la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (84). Ellos encontraron que este efecto era más fuerte en células de memoria que en células vírgenes. Pero el mecanismo molecular por el cual el TLR5 ejercía esta función fue solamente sugerido. Nosotros propusimos, de acuerdo a nuestro modelo, que el TLR5 promueve la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> al promover la activación de NF- $\kappa$ B, AP-1 y CREB, y validamos nuestro modelo a través de la evaluación experimental de las vías de señalización que inducen la activación de estos factores transcripcionales. Para esto último, evaluamos la fosforilación de IKK $\alpha/\beta$  y p65, así como de cJun, en linfocitos vírgenes estimulados con flagelina, como una medida de la activación de las vías de NF- $\kappa$ B y AP-1, respectivamente. Para esto, usamos anticuerpos monoclonales dirigidos a tales epítopes, y los evaluamos mediante citometría de flujo. Por tal motivo fue necesario purificar células vírgenes, lo cual se realizó usando el cocktail RosetteSep<sup>TM</sup> (STEMCELL) y la eliminación de CD45RO y CD44 mediante anticuerpos acoplados a perlas magnéticas (Pierce). Para los detalles de la purificación, ver la metodología. Además, en nuestro laboratorio se evaluó la expresión de citocinas y la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos en respuesta a las señales del TCR y flagelina, y se comparó con la respuesta inducida por las señales del TCR y CD28. Tanto en las células de adulto como de neonato se encontró una mejor respuesta a las señales del TCR + flagelina, particularmente en cuanto a la expresión de IFN $\gamma$  (157).

La figura 13 muestra un ejemplo de la pureza de las células aisladas usando nuestro método, la expresión del TLR5 (al nivel de la proteína) y la expresión de los marcadores CCR7 y CD62L, que son marcadores de direccionalidad a la zona T de los nodos linfáticos, característica de los linfocitos vírgenes, así como la depleción del CD45RO. Como puede observarse, más del 98% de las células son CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, y son positivas para CCR7 y CD62L y negativas para CD45RO<sup>hi</sup>.

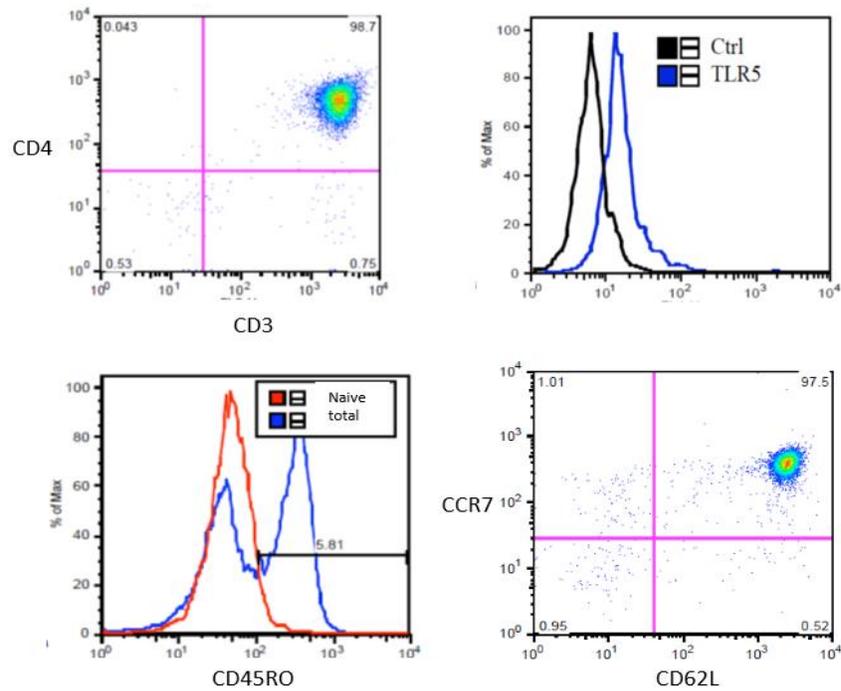


Figura 13. *Pureza de las células y expresión de marcadores.* Esta figura muestra un ejemplo de la pureza de las poblaciones celulares obtenidas mediante nuestro método, también muestra la depleción de CR45RO, y la expresión de CCR7, CD62L y el TLR5.

Por otra parte, la figura 17 muestra la evaluación de fosfo-cJun y fosfo-p65 después de la estimulación de células vírgenes con diferentes combinaciones de estímulos.

Aunque pudimos observar un aumento en la fosforilación de IKK, p65 y cJun, con el estímulo solo de Flagelina, dicho cambio no fue estadísticamente significativo. Sin embargo, considerando que pudimos demostrar experimentalmente la expresión del TLR5 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes y ver la activación de la vía de señalización del TLR5 tras la estimulación con flagelina, no se puede descartar el posible rol del TLR5 como receptor co-estimulador. A continuación, procedimos con la fusión de los modelos del TCR y el TLR5 para evaluar este hecho.

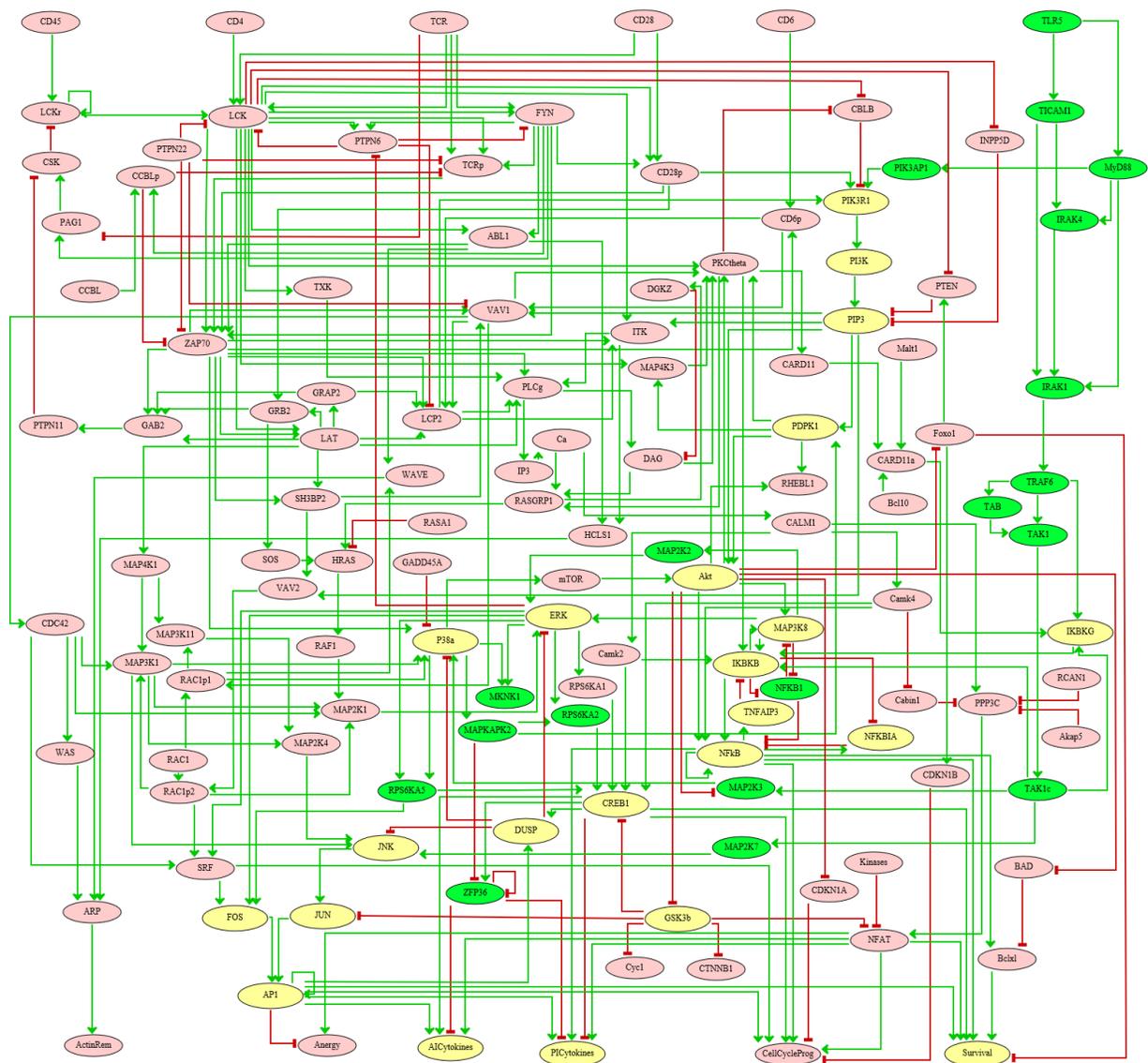
### **Fusión de los modelos del TCR y el TLR5.**

Los dos modelos (el del TCR y el del TLR5) validados independientemente fueron útiles para estudiar el papel de los estímulos clásicos TCR + CD28 y explorar el rol del TLR5, pero el estudio del rol como receptor co-estimulador de TLR5 requirió de la fusión de ambos modelos, puesto que para esto se requiere el estudio de la regulación cruzada de estas vías.

La fusión de modelos no es un proceso trivial. La forma más correcta de fusionar dos modelos, aunque la más difícil, es realizar una fusión manual, en la que el modelador pueda curar las interacciones entre los componentes comunes a los modelos y las ecuaciones, o las reglas lógicas en este caso, para decidir las reglas resultantes después de la fusión. Nosotros realizamos una fusión a dos niveles: Al nivel de la gráfica de regulación y al nivel de las reglas lógicas. A nivel de la gráfica, tanto GINsim como Cytoscape tienen integradas herramientas que realizan este trabajo de manera automática. Sin embargo, la gráfica sola no es tan útil y si quisiéramos un modelo de la nueva gráfica tendríamos que re-asignar el modelo totalmente. En el otro extremo está la fusión de los modelos (al nivel del archivo GINML), pero tras la edición manual del modelo (el archivo ginml es un tipo de archivo XML) se pueden tener muchos errores y el archivo resultante puede estar corrupto. Ambas metodologías presentaron muchas dificultades. La forma más eficiente que encontramos de fusionar dos modelos generados en GINsim, aunque nada automática y aún propicia a errores, fue la fusión de dos gráficas (copy/paste), que cambia los nombres de los nodos comunes, y la posterior edición manual de los nodos comunes (tanto la gráfica como la reasignación de las reglas lógicas). Sin embargo, los parámetros gráficos y lógicos de los nodos no comunes son conservados. Afortunadamente, las vías del TCR y el TLR5 no tienen muchos nodos comunes, por lo que la fusión de los modelos fue posible aun considerando el tamaño de los modelos.

La figura 14 muestra el modelo fusionado (TCR + TLR5). Como se aprecia en esta figura, el modelo fusionado consta de 129 componentes entre nodos originalmente correspondientes a cada modelo independiente (los nodos rojos corresponden al TCR y los verdes al TLR5) y nodos comunes (nodos azules), y 272 arcos representando las interacciones entre los distintos nodos. En total, el modelo fusionado tiene 3 entradas (TCR, CD28 y TLR5) y 6 salidas, estas últimas corresponden a los fenotipos presentes en los modelos independientes: citocinas pro-inflamatorias, citocinas anti-inflamatorias, progresión del ciclo celular, supervivencia, remodelación del citoesqueleto y Anergia. Es claro que todas las salidas del modelo fusionado eran ya salidas en el modelo del TCR, lo que nos muestra que ambas moléculas regulan los mismos procesos celulares. Sin embargo, las vías para llegar a la activación de los factores transcripcionales y procesos celulares son mayoritariamente independientes. Sólo comparten la vía de PI3K.

Figura 14. *Modelo fusionado (TCR/CD28 + TLR5)*. En total 129 nodos conforman el modelo fusionado, y 272 arcos los conectan. En rojo se muestran los nodos correspondientes al TCR, en verde los correspondientes al TLR5, y en amarillo los nodos comunes.



Un modelo de tal magnitud es muy complicado de simular, pero gracias a la herramienta de reducción de modelos implementada en GINSim, pudimos generar varias versiones reducidas de los modelos originales y el fusionado. Dicha herramienta consiste en que el usuario selecciona los nodos a reducir (esconder), que deben cumplir con la característica de no ser nodos auto-regulados positivamente, de forma que no sean nodos relevantes para la dinámica del sistema, que afecten el número o la obtención (reachability) de atractores. GINSim elimina automáticamente los nodos seleccionados, y asigna las interacciones y reglas lógicas entrantes del nodo reducido al nodo

blanco. Lo anterior permite la obtención de redes más pequeñas, con una alta conectividad, pero que facilitan las simulaciones. La figura 15 nos muestra una versión muy reducida del modelo fusionado.

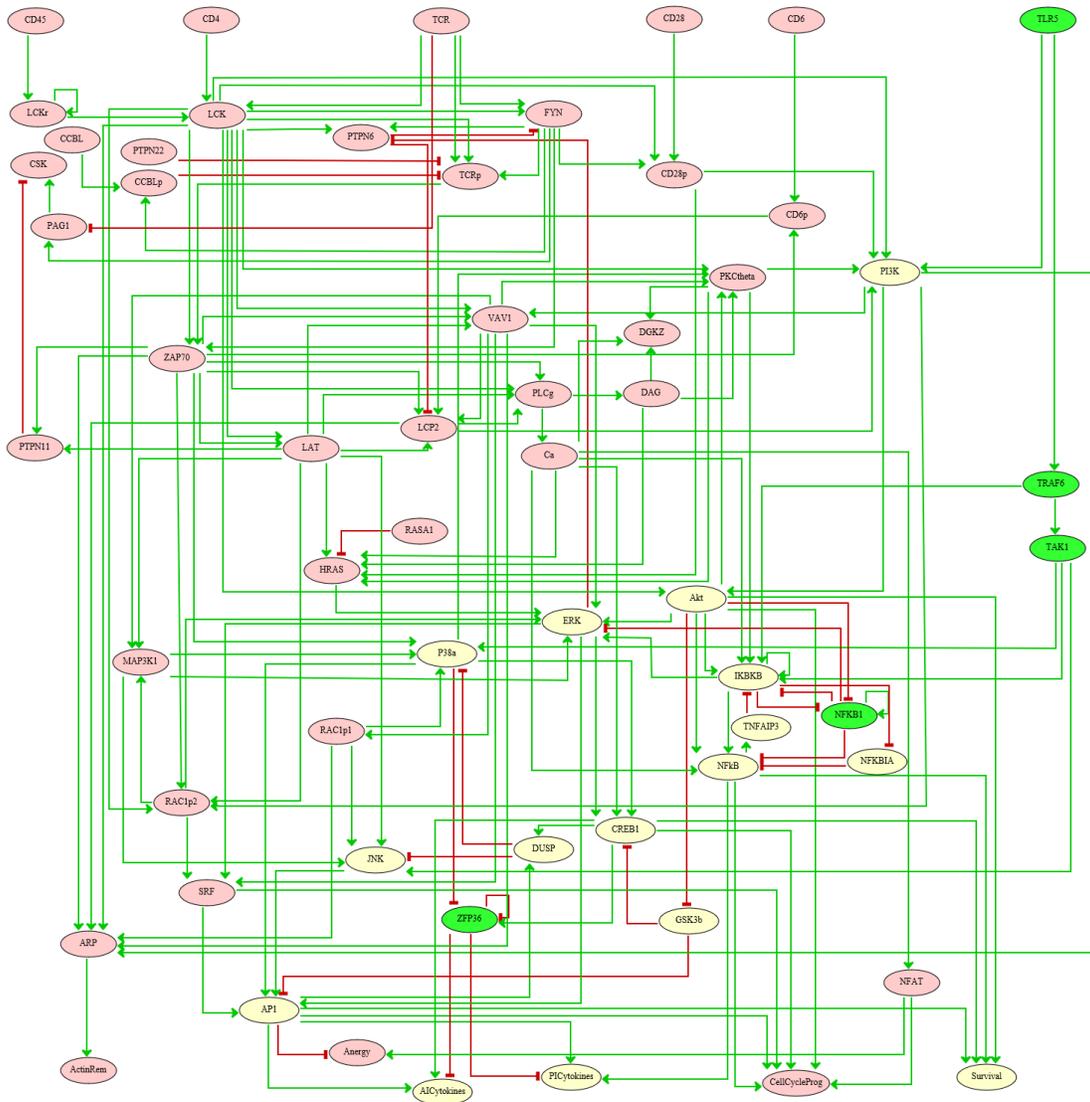


Figura 15. *Modelo fusionado reducido.* Versión “core” del modelo fusionado. Esta versión consiste en 59 nodos y 159 arcos. Dicha versión fue utilizada para la obtención de la gráfica jerárquica de transición.

Usando nuestro modelo fusionado evaluamos la obtención de los estados estables a partir de varias combinaciones de entradas (Sin estímulo, TCR + CD28 y TCR + TLR5) y varias condiciones iniciales. La figura 17 muestra los resultados de dichas simulaciones. Puede observarse que en el caso del *knock-out* para PKC $\theta$ , aún puede alcanzarse la activación de NF- $\kappa$ B, debido a la contribución de la vía del TLR5 mediante TAK1. Mientras que el *knock-out* de PI3K afecta

severamente la señalización. Realizando las mismas simulaciones con nuestro modelo fusionado reducido obtuvimos los mismos resultados.

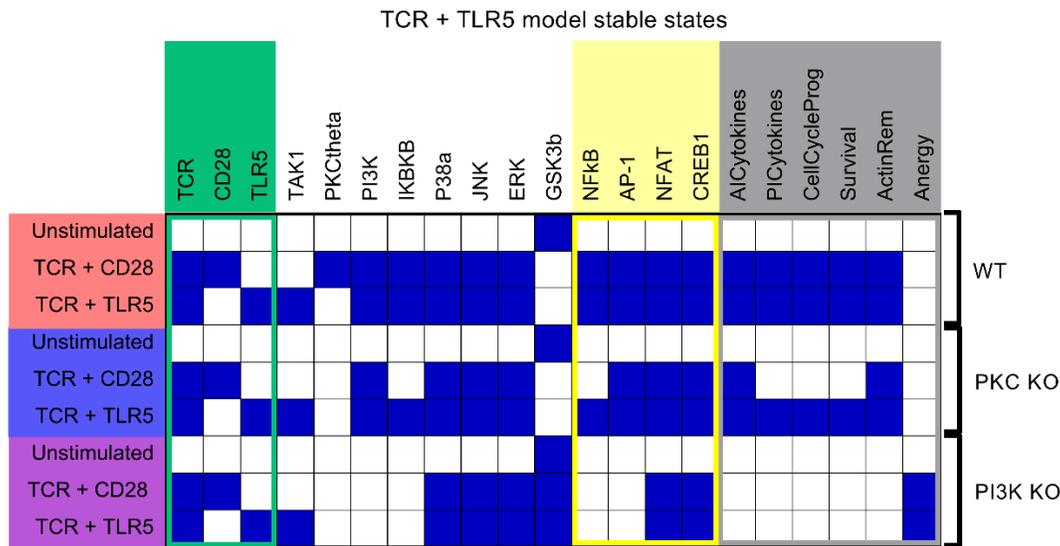


Figura 16. *Cómputo de los estados estables del modelo fusionado reducido (“core”).* Se realizaron simulaciones considerando 4 combinaciones de entradas (Sin estímulo, TCR + CD28, TCR + TLR5) y 3 condiciones iniciales (wild type, PKCth KO y PI3K KO).

Los resultados del cómputo de estados estables nos permitieron validar el funcionamiento de nuestro modelo fusionado, e incluso nos permitieron hacer predicciones acerca de la regulación cruzada de las vías. De acuerdo al cómputo de estados estables, se obtienen estados estables para la combinación de entradas: TCR+CD28, TCR+TLR5 y TCR+CD28+TLR5, pero no para el TLR5 solo. Aún más, cuando obtuvimos la HTG usando el modelo reducido los únicos atractores identificados corresponden a los estados estables ya mencionados. Una de las cosas que pudimos ver de la fusión de los modelos es que se enriquecieron los interactores para el modelo del TLR5, lo que agregó una regulación más fina, y lo que nos permitiría hacer simulaciones más realistas. No es extraño que al fusionar los modelos ya no fuera posible obtener un estado estable para la sola entrada de TLR5, como lo sería la sola estimulación con flagelina, debido a la inclusión de nuevos interactores a la vía como resultado de la fusión de los modelos. Se puede entender que al hacer la fusión de modelos se “homogeneizó” la definición de nodos fenotípicos, además de que las interacciones entre nodos comunes, que estaban reportadas solo para un modelo, prevalecieron en el modelo fusionado.

De acuerdo con los estados estables obtenidos como resultado de las simulaciones, un KO para PKC $\theta$ , o situaciones que afecten la activación de PKC $\theta$ , no afectaría severamente la activación del linfocito T si se logra la activación de NF- $\kappa$ B e través de otras vías. Debido a la existencia de vías alternativas, como la promovida por TLR5 y mediada por TAK1, se logra la activación de NF- $\kappa$ B. Esto implica que la vía de TLR5 podría compensar cuando existen deficiencias al nivel de PKC $\theta$ . Por otra parte, un KO para PI3K, o deficiencias en la activación de PI3K, afectaría severamente la activación de la célula, debido a que es una vía común para el TCR, CD28 y el TLR5, y debido a que regula la activación de NF- $\kappa$ B, AP-1, CREB y  $\beta$ -catenina y de todos los fenotipos, salvo la remodelación del citoesqueleto.

### **Activación de factores transcripcionales clave para la activación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adulto.**

Nuestro modelo fusionado es una herramienta útil para el estudio de la regulación cruzada de las vías de señalización. Sin embargo, quisimos evaluar experimentalmente la fosforilación de IKK $\alpha/\beta$ , p65, cJun y CREB, como medida de la activación de las vías comunes en el modelo fusionado y poder afinarlo con los datos experimentales, en caso de ser necesario. La figura 17 nos muestra los resultados experimentales de estimular linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes con distintas combinaciones de estímulos.

Los resultados experimentales validaron lo que ya habíamos obtenido con la fusión del modelo y no fue necesario afinar drásticamente el modelo fusionado. Como se aprecia en la figura 17, las señales combinadas del TCR + CD28 y TCR + TLR5 son prácticamente equivalentes en términos de la activación de las vías de AP-1 y NF- $\kappa$ B, de acuerdo con la fosforilación de IKK $\alpha\beta$ , p65 y cJun. Estos resultados nos permiten proponer que las señales de la flagelina pudieran activar directamente a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes, y que su papel es muy similar al de CD28 aunque la vía de señalización es distinta, además del rol que pudiera tener sobre otras células inmunes. Lo anterior sugiere que la flagelina podría ser una señal fuerte en formulaciones de vacunas.

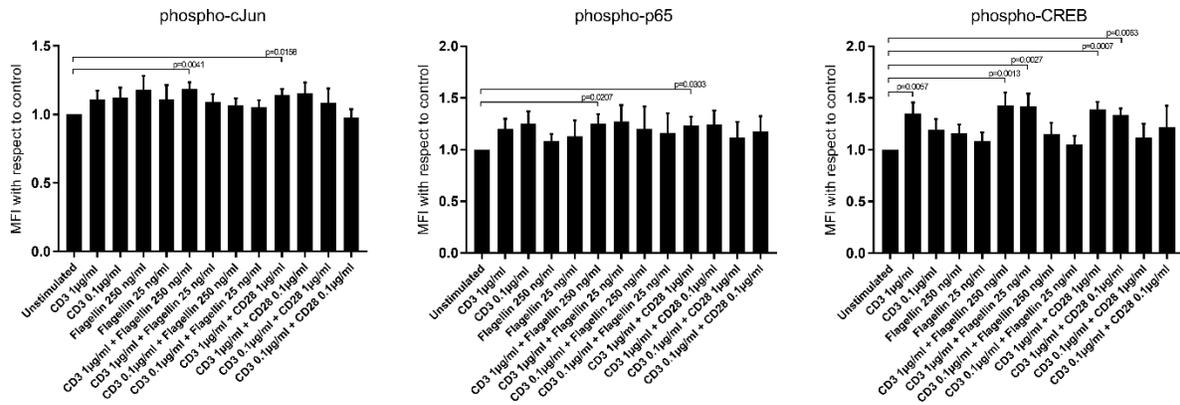


Figura 17. *Evaluación experimental de la fosforilación de p65, cJun y CREB.* Evaluamos mediante citometría de flujo la fosforilación de cJun, IKK $\alpha/\beta$  y CREB, como medida de la activación de las vías de AP-1, NF- $\kappa$ B y CREB.

### Transcriptómica del estado basal de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y neonatos humanos.

Para el laboratorio, es de particular interés conocer la inmunobiología de los linfocitos T neonatales. Se sabe que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonatos tienen un alto umbral de activación, y que tienen algunos defectos en la señalización, como una alta señalización mediada por calcio y deficiencias en la activación de AP-1 (123, 158). También se sabe que la polarización de linfocitos T CD4<sup>+</sup> neonatales hacia un perfil Th1 es deficiente, y que se favorecen los perfiles Th2 y Treg (159, 160). Además, es conocido que las células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos en neonatos son inmaduras, presentan antígenos deficientemente y aportan bajas señales co-estimuladoras. Todo lo anterior, hace particularmente interesante y urgente la búsqueda de moléculas co-estimuladoras alternativas que favorezcan la activación de los linfocitos T neonatales.

El consorcio BLUEPRINT ha generado datos de RNA-seq de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de cordón umbilical (neonato) y de adulto. Como un primer acercamiento decidimos hacer un análisis de expresión diferencial usando los datos generados por BLUEPRINT, para lo cual usamos DESeq2 y EdgeR. La figura 19 muestra una gráfica con los genes diferencialmente expresados en neonatos versus adultos. Al realizar la anotación funcional de los genes sobreexpresados en neonatos encontramos que estaban enriquecidas las vías de metabolismo, ciclo celular y respuesta inmune innata. Por otra parte, estaban disminuidos algunos componentes de la vía de activación de

linfocitos T, tales como Fyn y SLP-76, así como receptores de citocinas y quimiocinas. Sin embargo, muy pocos genes sobreexpresados en los neonatos eran anotados a vías descritas. Todo lo anterior sugiere que hay deficiencias en las funciones clásicas pero podría haber funciones alternativas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de neonato. Recientemente, en el laboratorio publicamos un artículo donde mostramos que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> tienen funciones de inmunidad innata (Galindo-Albarrán, *et al.* 2016). De igual manera, en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> neonatales encontramos una sobre expresión de genes que codifican para péptidos antimicrobianos y vías de inflamación características de neutrófilos.

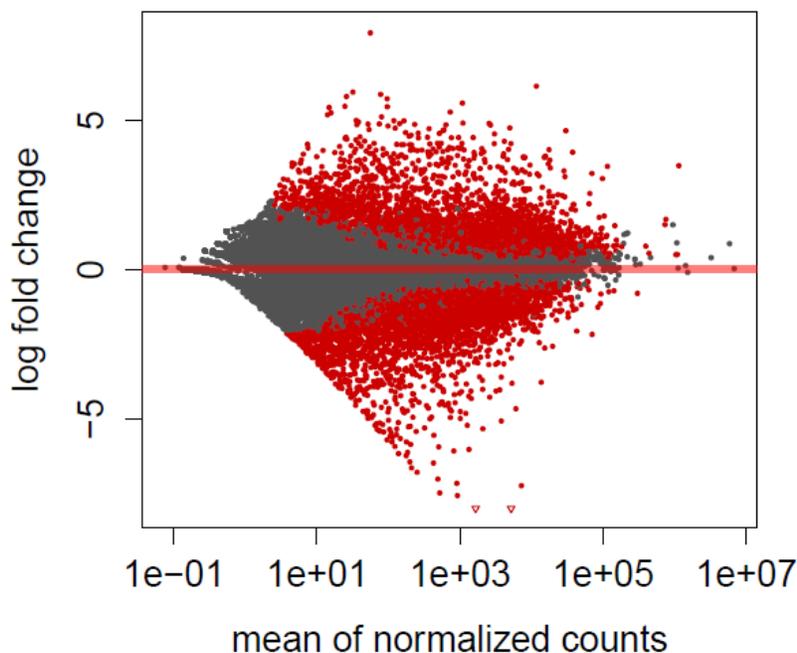
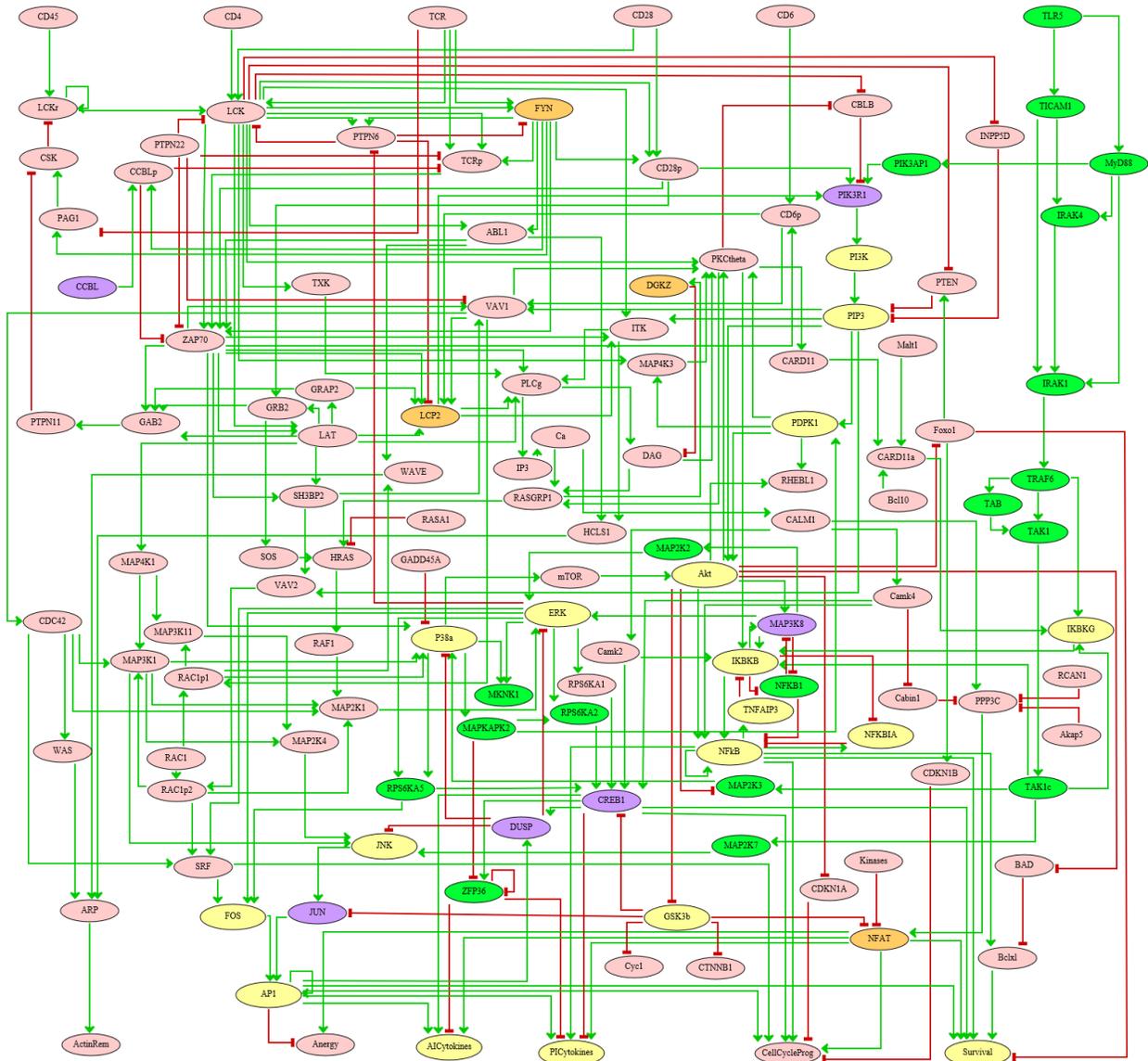


Figura 18. *Gráfica de expresión diferencial.* En rojo se muestran los genes diferencialmente expresados ( $padj < 0.05$ ) en neonato vs adulto.

Nuestros modelos están actualizados a la literatura más reciente, y representan vías detalladas que no están descritas en ninguna base de datos. Por tal motivo, decidimos mapear los resultados de la expresión diferencial de genes a nuestro modelo fusionado. La figura 19 muestra el modelo fusionado con los nodos sobreexpresados y menos expresados en células de neonato.

Figura 19. *Mapeo de genes diferencialmente expresados en neonatos.* Se tomaron los genes diferencialmente expresados en neonatos de acuerdo a nuestro análisis y estos fueron mapeados al modelo fusionado. En naranja se aprecian genes menos expresados en neonatos mientras que en morado se muestran genes sobreexpresados en neonatos.



Como se observa en la figura 19, un regulador negativo (cCBL) de la señalización temprana por el TCR se encuentra sobreexpresado en las células de neonatos. Esta proteína es una E3 ubiquitin ligasa, que estaría mandando a degradación a los complejos de señalización que el TCR formara. Además, un regulador negativo (DUSP) de la vía de AP-1 también está sobreexpresado, este es una fosfatasa que eliminaría los fosfatos de varias MAP cinasas, bloqueando la activación de AP-1. Esto sugiere que la vía del TCR está bloqueada a varios niveles en células neonatales. Por otra parte, varios reguladores positivos de la señalización por el TCR se encuentran menos expresados en las células de neonatos, tal es el caso de Fyn, SLP-76, NFATc2. De manera interesante, PI3K y CREB se encuentran sobreexpresados en neonatos, lo que pudiera significar una mayor

activación de la vía de PI3K. También Tpl2, otra molécula de la vía de TLR5, se encuentra sobreexpresada en neonato. En conjunto, estos resultados apuntan a que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tienen varias particularidades en la señalización mediada por el TCR que explican su mayor umbral de activación. Además, sugieren que la vía del TLR5 pudiera compensar por este alto umbral de activación y permitir la activación eficiente de las células neonatales.

Una vez con el análisis de expresión diferencial, decidimos evaluar las marcas de cromatina abierta y cerrada en las regiones promotoras de dichos genes, para lo cual usamos los datos reportados por BLUEPRINT. Como se aprecia en la figura 21, los genes sobre expresados en células T CD4<sup>+</sup> de adulto presentan un enriquecimiento claro en los niveles globales de la marca H3K4me3 (de apertura), y solo un ligero enriquecimiento de H3K27ac y una ligera disminución de H3K27me3. Por otra parte, los genes sobreexpresados en neonatos presentan sobre todo una disminución en H3K27me3, mientras que su H3K4me3 se encuentra similar a los genes sobreexpresados en adulto.

Todo lo anterior sugiere diferencias en la regulación epigenética de los genes que regulan funciones específicas en neonatos y en adultos. Parecería que las células de adulto expresan sus genes específicos mediante mecanismos que llevan a la adquisición de la marca H3K4me3 de los genes característicos de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de adultos y la adquisición de la marca de cierre de la cromatina H3K27me3 en genes específicos de las células neonatales. Análisis posteriores de estos mecanismos serían importantes para clarificar los mecanismos moleculares detrás de estas diferencias.

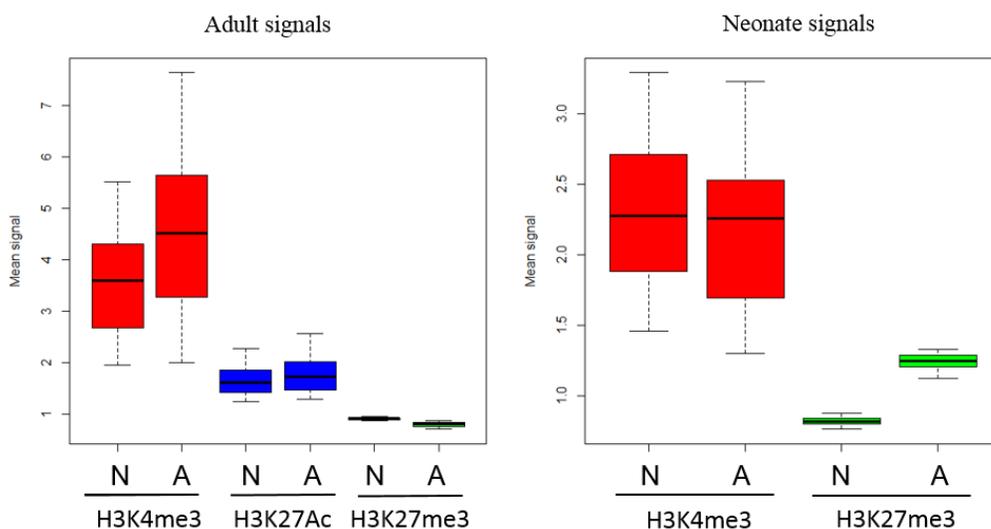


Figura 20. *Marcas de histonas en regiones promotoras*. Se muestran los valores promedios de las marcas H3K27ac, H3K4me3 y H3K27me3 en los promotores de los genes sobreexpresados en neonatos (N) y Adultos (A), según los datos en BLUEPRINT. Para realizar esta gráfica usamos extrajimos información de los archivos de señal (bigwig) reportados por BLUEPRINT usando la herramienta bwtool y los graficamos en R.

## DISCUSIÓN

En este trabajo generamos plataformas teóricas (modelos) comprensibles para el estudio de las vías de señalización del TCR, CD28 y el TLR5. Estos modelos fueron validados y adaptados para linfocitos T CD4+ usando datos de secuenciación masiva y datos experimentales. Estos modelos son una herramienta útil para el estudio de las vías de señalización en linfocitos T CD4+, además de que pueden ser adaptados para otros tipos celulares usando la metodología que aquí se presenta.

Generamos un modelo que contiene las 3 vías mediante la fusión de los modelos originales. El modelo resultante nos sirvió para estudiar la contribución de algunos componentes de las vías al desempeño global de la red, específicamente, TAK1, PKC $\theta$  y PI3K. De esta manera, mostramos cómo se puede predecir la respuesta de los linfocitos T CD4+, mediante la simulación de mutantes, que se puede interpretar como perturbaciones en la activación de los nodos, y la definición de las entradas y condiciones iniciales. Este procedimiento se puede aplicar para cualquier componente de la red y de esta manera evaluar el efecto de ciertas perturbaciones de nodos de interés en la respuesta de los linfocitos T CD4+.

Comprobamos la coherencia del modelo mediante la evaluación experimental de la activación de cJun, p65 y CREB en linfocitos T CD4+ vírgenes. Encontramos que la vía del TLR5 aporta señales coestimuladoras equivalentes a la vía de CD28 en cuanto a la activación de IKK, NF- $\kappa$ B, CREB y cJun. Por otra parte, en otro trabajo del laboratorio se demuestra que las señales coestimuladoras del TLR5 promueven la expresión de IFN $\gamma$  (Tesis de doctorado de Rosario labastida). Además, hay otro reporte que demuestra la importancia del TLR5 para la proliferación y producción de IFN $\gamma$  en linfocitos T CD4+, aunque ellos encuentran que son los linfocitos de memoria los que mejor responden (84). En conjunto, podemos decir que la importancia del TLR5 para la activación de linfocitos T CD4+ vírgenes radica en su capacidad de inducir la activación de los factores transcripcionales NF- $\kappa$ B, AP-1 y CREB.

En el laboratorio, es de particular interés conocer la respuesta de los linfocitos neonatales y encontrar vías que induzcan eficientemente su activación. Es por eso que extendimos nuestro estudio a los linfocitos T CD4+ neonatales. Los linfocitos T CD4+ de neonatos presentan un alto umbral de activación y su respuesta es deficiente ante muchos estímulos. Usamos datos de RNA-seq disponibles públicamente (BLUEPRINT) para comparar globalmente la expresión génica de linfocitos de adultos y neonatos. Encontramos que los linfocitos CD4+ neonatales tienen deficiencias en la expresión de genes de las vías del TCR, citocinas y quimiocinas pero tienen una sobreexpresión de genes asociados a vías de glucólisis y ciclo celular. Además, cuando mapeamos estos resultados a nuestro modelo fusionado pudimos identificar varios reguladores negativos de la vía del TCR que están sobreexpresados en neonatos, así como varios reguladores positivos que están menos expresados. Mientras que la vía del TLR5 no está afectada, y de hecho tiene algunos componentes sobreexpresados, como Tpl2. Lo anterior nos indica que los linfocitos T CD4+ neonatales presentan una baja respuesta a los estímulos clásicos (TCR + CD28) debido a que la vía está bloqueada a diferentes niveles y a que hay una deficiencia en la expresión de reguladores positivos como FYN y SLP-76. Además de que hay indicios de que las células T CD4+ neonatales presentan una proliferación homeostática, tal como la presentan las células T CD8+ como recientemente reportamos (161).

Como es probable que las diferencias en la expresión génica estén enmarcadas por una regulación epigenética específica, evaluamos la presencia de las marcas de histonas H3K4me3, H3K27ac y H3K27me3 en las regiones promotoras de los genes diferencialmente expresados. Encontramos niveles más bajos de H3K27me3 y niveles equivalentes de H3K4me3 en los promotores de los genes sobreexpresados en neonato, así como niveles más altos de H3K4me3, H3K27ac en los genes sobreexpresados en adulto. Lo anterior nos indica que los neonatos y los adultos utilizan mecanismos de regulación epigenética diferentes para controlar los niveles de expresión de genes. Los neonatos bajan sus niveles de H3K27me3 para sobreexpresar genes, mientras que los adultos aumentan su H3K4me3 y H3K27ac.

En conjunto, generamos plataformas teóricas para el estudio de las vías del TCR y el TLR5, particularmente para el estudio de la regulación cruzada entre tales vías, y demostramos su utilidad. Comprobamos que las señales del TLR5 son tan importantes como las señales de CD28 para inducir la activación de linfocitos T CD4+ vírgenes de adulto. También mostramos que las células T CD4+ de neonatos presentan deficiencias funcionales ante los estímulos clásicos del TCR y

CD28 y que es probable que estén haciendo una proliferación homeostática. Asimismo, mostramos que las diferencias en la expresión génica entre células de neonato y adulto está enmarcada por diferencias en las marcas epigenéticas. Finalmente, propusimos, basados en toda la evidencia, que la vía del TLR5 será una importante señal coestimuladora para las células de neonato también.

## CONCLUSIONES

La estimulación de linfocitos T CD4 vírgenes con flagelina nos mostró que la vía del TLR5 es funcional en estas células, como lo demuestra la activación de las vías de NF- $\kappa$ B y AP-1.

La fusión de los modelos individuales nos permitió ver que la vía del TCR y el TLR5 son independientes, sin embargo, comparten la vía de PI3K. Además, pudimos ver que aunque usando vías diferentes, ambas llevan a la activación de NF- $\kappa$ B, AP-1 y CREB. Aún más, pudimos demostrar la contribución de algunos componentes de la red en la respuesta de los linfocitos T CD4, como lo son PKC $\theta$  y PI3K.

Al tratar linfocitos T CD4 vírgenes con los siguientes estímulos: TCR, Flagelina, TCR + Flagelina, y TCR + CD28, encontramos que las señales del TCR + TLR5 son similares a las de TCR + CD28, más aún, las señales TCR + TLR5 fueron más eficientes para generar la fosforilación de CREB.

El análisis de expresión diferencial de genes entre linfocitos T CD4 de adultos y neonatos, nos permitió identificar nodos que están afectados en linfocitos de neonato, como lo son CCLB y DUSP, los cuales están sobreexpresados y podrían ser una de las causas del alto umbral de activación de los linfocitos neonatales. Por otra parte, este análisis nos permitió ver que la vía del TLR5 no está afectada en los neonatos, y que esta podría compensar y permitir la activación eficiente de los factores transcripcionales importantes para la activación de los linfocitos T CD4.

Finalmente, el análisis de las marcas epigenéticas en los genes diferencialmente expresados nos permitió ver que las diferencias en la expresión de los genes está enmarcada por mecanismos epigenéticos particulares que involucran a las marcas H3K4me3, H3K27ac y H3K27me3.

## BIBLIOGRAFÍA

1. J. L. Wynn, O. Levy, Role of innate host defenses in susceptibility to early-onset neonatal sepsis. *Clin. Perinatol.* **37**, 307–37 (2010).
2. L. Marodi, MINIREVIEW Neonatal Innate Immunity to Infectious Agents. *Infect. Immun.* **74**, 1999–2006 (2006).
3. E. Gómez-Mora *et al.*, Impaired CD4 T-cell response to autophagy in treated HIV-1-infected individuals. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 1 (2016).
4. M. Buggert *et al.*, CD4+ T cells with an activated and exhausted phenotype distinguish immunodeficiency during aviremic HIV-2 infection. *Aids.* **30**, 2415–2426 (2016).
5. A. Ciurea, L. Hunziker, P. Klenerman, H. Hengartner, R. M. Zinkernagel, Impairment of CD4(+) T cell responses during chronic virus infection prevents neutralizing antibody responses against virus escape mutants. *J Exp Med.* **193**, 297–305. (2001).
6. M. McCarron, D. J. Reen, Activated human neonatal CD8+ T cells are subject to immunomodulation by direct TLR2 or TLR5 stimulation. *J. Immunol.* **182**, 55–62 (2009).
7. S. Schüller *et al.*, The TLR-specific Adjuvants R-848 and CpG-B Endorse the Immunological Reaction of Neonatal Antigen Presenting Cells. *Pediatr. Res.*, 1–8 (2016).
8. J. R. Kim *et al.*, Inclusion of Flagellin during Vaccination against Influenza Enhances Recall Responses in Nonhuman Primate Neonates. *J. Virol.* **89**, 7291–7303 (2015).
9. O. Levy, Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 379–90 (2007).
10. K. Sadeghi *et al.*, Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling. *J. Infect. Dis.* **195**, 296–302 (2007).
11. T. Strunk, A. Currie, P. Richmond, K. Simmer, D. Burgner, Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity. *J. Matern. Fetal. Neonatal*

- Med.* **24**, 25–31 (2011).
12. J. L. Wynn *et al.*, Time for a Neonatal-Specific Consensus Definition for Sepsis. *Pediatr. Crit. Care Med.*, 1–6 (2014).
  13. M. Z. Oestergaard *et al.*, Neonatal mortality levels for 193 countries in 2009 with trends since 1990: a systematic analysis of progress, projections, and priorities. *PLoS Med.* **8**, e1001080 (2011).
  14. B. Adkins, C. Leclerc, S. Marshall-Clarke, Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 553–64 (2004).
  15. J. Chipeta *et al.*, Neonatal (cord blood) T cells can competently raise type 1 and 2 immune responses upon polyclonal activation. *Cell. Immunol.* **205**, 110–9 (2000).
  16. D. C. Hodgins, P. E. Shewen, Vaccination of neonates: problem and issues. *Vaccine.* **30**, 1541–59 (2012).
  17. V. J. Philbin, O. Levy, implications for neonatal and infant vaccine development. **65**, 1–17 (2010).
  18. H. S. Yoon, Neonatal innate immunity and Toll-like receptor. *Korean J. Pediatr.* **53**, 985–8 (2010).
  19. J. Walk *et al.*, Inhibitory receptor expression on neonatal immune cells. *Clin. Exp. Immunol.* **169**, 164–71 (2012).
  20. O. Levy, S. Goriely, T. R. Kollmann, Immune response to vaccine adjuvants during the first year of life. *Vaccine.* **31**, 2500–5 (2013).
  21. M. A. Pettengill *et al.*, Distinct TLR-mediated cytokine production and immunoglobulin secretion in human newborn naive B cells. *Innate Immun.* (2016), doi:10.1177/1753425916651985.
  22. T. R. Kollmann, O. Levy, R. R. Montgomery, S. Goriely, Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. *Immunity.* **37**, 771–83 (2012).
  23. Bona, pp. 193–218.

24. R. V. Luckheeram, R. Zhou, A. D. Verma, B. Xia, CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 925135 (2012).
25. J. Zhu, W. E. Paul, CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* **112**, 1557–69 (2008).
26. J. Zhu, H. Yamane, W. E. Paul, Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 445–89 (2010).
27. J. Saez-Rodriguez *et al.*, A logical model provides insights into T cell receptor signaling. *PLoS Comput. Biol.* **3**, e163 (2007).
28. C. D. T. C. Populations, J. Zhu, H. Yamane, W. E. Paul, Differentiation of Effector (2010), doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101212.
29. A. Iwasaki, R. Medzhitov, Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science.* **327**, 291–5 (2010).
30. G. P. Morris, P. M. Allen, How the TCR balances sensitivity and specificity for the recognition of self and pathogens. *Nat. Immunol.* **13**, 121–8 (2012).
31. P. Riha, C. E. Rudd, CD28 co-signaling in the adaptive immune response. *Self. Nonself.* **1**, 231–240 (2010).
32. M. Sanchez-Lockhart *et al.*, T cell receptor signaling can directly enhance the avidity of CD28 ligand binding. *PLoS One.* **9**, e89263 (2014).
33. D. a. Chisolm, A. S. Weinmann, TCR-Signaling Events in Cellular Metabolism and Specialization. *Front. Immunol.* **6**, 10–14 (2015).
34. J. hong Shi, S. C. Sun, TCR signaling to NF- $\kappa$ B and mTORC1: Expanding roles of the CARMA1 complex. *Mol. Immunol.* **68**, 546–557 (2015).
35. Q. Tang *et al.*, The Src Family Kinase Fyn Mediates Signals Induced by TCR Antagonists. *J. Immunol.* **168**, 4480–4487 (2002).
36. A. Hashimoto-Tane, T. Saito, Dynamic regulation of TCR-microclusters and the microsynapse for T cell activation. *Front. Immunol.* **7**, 1–8 (2016).
37. X. Wang, H.-C. Chuang, J.-P. Li, T.-H. Tan, Regulation of PKC- $\theta$  function by phosphorylation in T cell receptor signaling. *Front. Immunol.* **3**, 197 (2012).

38. C. M. Porter, N. a Clipstone, Sustained NFAT signaling promotes a Th1-like pattern of gene expression in primary murine CD4+ T cells. *J. Immunol.* **168**, 4936–4945 (2002).
39. M. L. Dustin, D. Depoil, New insights into the T cell synapse from single molecule techniques. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 672–84 (2011).
40. R. J. Salmond, A. Filby, I. Qureshi, S. Caserta, R. Zamoyka, T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunol. Rev.* **228**, 9–22 (2009).
41. D. Filipp *et al.*, Lck-dependent Fyn activation requires C terminus-dependent targeting of kinase-active Lck to lipid rafts. *J. Biol. Chem.* **283**, 26409–22 (2008).
42. R. L. Smeets *et al.*, Molecular pathway profiling of T lymphocyte signal transduction pathways; Th1 and Th2 genomic fingerprints are defined by TCR and CD28-mediated signaling. *BMC Immunol.* **13**, 12 (2012).
43. R. R. Bartelt, J. C. D. Houtman, The adaptor protein LAT serves as an integration node for signaling pathways that drive T cell activation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **5**, 101–10 (2013).
44. R. Roncagalli *et al.*, Quantitative proteomics analysis of signalosome dynamics in primary T cells identifies the surface receptor CD6 as a Lat adaptor-independent TCR signaling hub. *Nat. Immunol.* **15**, 384–92 (2014).
45. A. Braiman, M. Barda-Saad, C. L. Sommers, L. E. Samelson, Recruitment and activation of PLCgamma1 in T cells: a new insight into old domains. *EMBO J.* **25**, 774–84 (2006).
46. E. K. Shim, S. H. Jung, J. R. Lee, Role of two adaptor molecules SLP-76 and LAT in the PI3K signaling pathway in activated T cells. *J. Immunol.* **186**, 2926–35 (2011).
47. R. R. Bartelt, N. Cruz-Orcutt, M. Collins, J. C. D. Houtman, Comparison of T cell receptor-induced proximal signaling and downstream functions in immortalized and primary T cells. *PLoS One.* **4**, e5430 (2009).
48. C. Pelzer, M. Thome, IKKA takes control of canonical NF-KB activation. **12**, 12–13 (2011).
49. S. Mitchell, J. Vargas, A. Hoffmann, Signaling via the NF-??B system. *Wiley Interdiscip.*

- Rev. Syst. Biol. Med.* **8**, 227–241 (2016).
50. F. Macian, NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 472–84 (2005).
  51. E. Lupino, C. Ramondetti, M. Piccinini, I $\kappa$ B kinase  $\beta$  is required for activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 in CD3/CD28-stimulated primary CD4(+) T cells. *J. Immunol.* **188**, 2545–55 (2012).
  52. A. Oeckinghaus, M. S. Hayden, S. Ghosh, Crosstalk in NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Nat. Immunol.* **12**, 695–708 (2011).
  53. T. H. Tan *et al.*, Kappa B site-dependent activation of the interleukin-2 receptor alpha-chain gene promoter by human c-Rel. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 4067–75 (1992).
  54. M. S. Sundrud, M. a Nolan, Synergistic and combinatorial control of T cell activation and differentiation by transcription factors. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 286–92 (2010).
  55. L. Zhou, M. M. W. Chong, D. R. Littman, Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity.* **30**, 646–55 (2009).
  56. M. Afkarian *et al.*, T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* **3**, 549–57 (2002).
  57. T. Usui *et al.*, T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J. Exp. Med.* **203**, 755–66 (2006).
  58. W. Zheng, R. a Flavell, The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell.* **89**, 587–96 (1997).
  59. A. Kanhere *et al.*, T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. *Nat. Commun.* **3**, 1268 (2012).
  60. R. Yagi, J. Zhu, W. E. Paul, An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *Int. Immunol.* **23**, 415–20 (2011).
  61. G. R. Lee, P. E. Fields, T. J. Griffin, R. a Flavell, Regulation of the Th2 cytokine locus by a locus control region. *Immunity.* **19**, 145–53 (2003).

62. N. Morishima, I. Mizoguchi, K. Takeda, J. Mizuguchi, T. Yoshimoto, TGF-beta is necessary for induction of IL-23R and Th17 differentiation by IL-6 and IL-23. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386**, 105–110 (2009).
63. R. D. Hatton, TGF- $\beta$  in Th17 cell development: the truth is out there. *Immunity.* **34**, 288–90 (2011).
64. W.-J. Wang *et al.*, Increased prevalence of T helper 17 (Th17) cells in peripheral blood and decidua in unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *J. Reprod. Immunol.* **84**, 164–70 (2010).
65. F. Birzele *et al.*, Next-generation insights into regulatory T cells: expression profiling and FoxP3 occupancy in Human. *Nucleic Acids Res.* **39**, 7946–60 (2011).
66. S. Z. Josefowicz, L.-F. Lu, A. Y. Rudensky, Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–64 (2012).
67. W. Liao *et al.*, Opposing actions of IL-2 and IL-21 on Th9 differentiation correlate with their differential regulation of BCL6 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 3508–13 (2014).
68. M. H. Kaplan, The transcription factor network in Th9 cells. *Semin. Immunopathol.* (2016), doi:10.1007/s00281-016-0600-2.
69. P. Muranski, N. P. Restifo, Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood.* **121**, 2402–14 (2013).
70. R. J. Johnston, Y. S. Choi, J. a. Diamond, J. a. Yang, S. Crotty, STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. *J. Exp. Med.* **209**, 243–250 (2012).
71. S. Rutz, C. Eidenschenk, W. Ouyang, IL-22, not simply a Th17 cytokine. *Immunol. Rev.* **252**, 116–32 (2013).
72. S. Frischbutter, K. Schultheis, M. Pätzelt, A. Radbruch, R. Baumgrass, Evaluation of calcineurin/NFAT inhibitor selectivity in primary human Th cells using bar-coding and phospho-flow cytometry. *Cytom. Part A.* **81 A**, 1005–1011 (2012).
73. S. L. Nutt, D. M. Tarlinton, Germinal center B and follicular helper T cells: siblings, cousins or just good friends? *Nat. Immunol.* **131**, 472–477 (2011).

74. N. Hermann-Kleiter, G. Baier, NFAT pulls the strings during CD4<sup>+</sup> T helper cell effector functions. *Blood*. **115**, 2989–2997 (2010).
75. S. L. Peng, a J. Gerth, a M. Ranger, L. H. Glimcher, NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity*. **14**, 13–20 (2001).
76. H. Oh, S. Ghosh, NF-κB: roles and regulation in different CD4(+) T-cell subsets. *Immunol. Rev.* **252**, 41–51 (2013).
77. L. Chen, D. B. Flies, Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 227–242 (2013).
78. I. Dufait *et al.*, Europe PMC Funders Group PD-L1 / PD-1 Co-Stimulation , a Brake for T cell Activation and a T cell Differentiation Signal, 1–14 (2013).
79. B. Jin, T. Sun, X.-H. Yu, Y.-X. Yang, A. E. T. Yeo, The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 836485 (2012).
80. N. K. Crellin *et al.*, Human CD4<sup>+</sup> T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *J. Immunol.* **175**, 8051–8059 (2005).
81. R. A. Lisboa, M. V. Andrade, J. R. Cunha-Melo, Toll-like receptor activation and mechanical force stimulation promote the secretion of matrix metalloproteinases 1, 3 and 10 of human periodontal fibroblasts via p38, JNK and NF-κB. *Arch. Oral Biol.* **58**, 731–9 (2013).
82. T. Feng, Y. Cong, K. Alexander, C. O. Elson, Regulation of Toll-like receptor 5 gene expression and function on mucosal dendritic cells. *PLoS One*. **7**, e35918 (2012).
83. H.-H. Oberg, M. Juricke, D. Kabelitz, D. Wesch, Regulation of T cell activation by TLR ligands. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 582–92 (2011).
84. G. Caron *et al.*, Direct Stimulation of Human T Cells via TLR5 and TLR7/8: Flagellin and R-848 Up-Regulate Proliferation and IFN- Production by Memory CD4<sup>+</sup> T Cells. *J. Immunol.* **175**, 1551–1557 (2005).
85. R. Simone, A. Floriani, D. Saverino, Stimulation of human CD4<sup>+</sup> T lymphocytes via TLR3, TLR5 and TLR7/8 up-regulates expression of costimulatory and modulates

- proliferation. *Open Microbiol. J.* **3**, 1–8 (2009).
86. M. M. Tremblay, M. Y. Bilal, J. C. D. Houtman, Prior TLR5 induction in human T cells results in a transient potentiation of subsequent TCR-induced cytokine production. *Mol. Immunol.* **57**, 161–170 (2014).
  87. Y. J. Choi, E. Im, H. K. Chung, C. Pothoulakis, S. H. Rhee, TRIF mediates Toll-like receptor 5-induced signaling in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 37570–8 (2010).
  88. T. Tallant *et al.*, Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF-kappa B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol.* **4**, 33 (2004).
  89. S. E. Letran *et al.*, TLR5 functions as an endocytic receptor to enhance flagellin-specific adaptive immunity. *Eur. J. Immunol.* **41**, 29–38 (2011).
  90. H. R. Sang *et al.*, Role of MyD88 in phosphatidylinositol 3-kinase activation by flagellin/toll-like receptor 5 engagement in colonic epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 18560–18568 (2006).
  91. Y. Yu *et al.*, TLR5-mediated phosphoinositide 3-kinase activation negatively regulates flagellin-induced proinflammatory gene expression. *J. Immunol.* **176**, 6194–201 (2006).
  92. A. Naldi, J. Carneiro, C. Chaouiya, D. Thieffry, Diversity and plasticity of Th cell types predicted from regulatory network modelling. *PLoS Comput. Biol.* **6**, e1000912 (2010).
  93. J. Saez-Rodriguez *et al.*, Discrete logic modelling as a means to link protein signalling networks with functional analysis of mammalian signal transduction. *Mol. Syst. Biol.* **5**, 331 (2009).
  94. D. Thieffry, Logical modelling of cellular regulatory / signalling networks of biological regulatory systems (2013).
  95. M. L. Wynn, N. Consul, S. D. Merajver, S. Schnell, Logic-based models in systems biology: a predictive and parameter-free network analysis method. *Integr. Biol.* **4**, 1323 (2012).
  96. M. P. Creyghton *et al.*, Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and

- predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 21931–6 (2010).
97. M. R. Mansour *et al.*, An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element. *Science* (80-. ). **346**, 1373–1377 (2014).
  98. M. Bulger, M. Groudine, Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell*. **144**, 327–39 (2011).
  99. B. E. Russ *et al.*, Distinct epigenetic signatures delineate transcriptional programs during virus-specific CD8+ T cell differentiation. *Immunity*. **41**, 853–865 (2014).
  100. A. Pekowska *et al.*, H3K4 tri-methylation provides an epigenetic signature of active enhancers. *EMBO J.* **30**, 4198–210 (2011).
  101. L. Sun *et al.*, The promoter region of interferon-gamma is hypermethylated in neonatal foals and its demethylation is associated with increased gene expression. *Dev. Comp. Immunol.* **39**, 273–8 (2013).
  102. H. P. Shulha *et al.*, Human-specific histone methylation signatures at transcription start sites in prefrontal neurons. *PLoS Biol.* **10**, e1001427 (2012).
  103. Z. Zhang, X. Ma, M. Q. Zhang, Bivalent-like chromatin markers are predictive for transcription start site distribution in human. *PLoS One.* **7**, e38112 (2012).
  104. M. M. Hoffman *et al.*, Integrative annotation of chromatin elements from ENCODE data. *Nucleic Acids Res.* **41**, 827–41 (2013).
  105. M. Fernández, D. Miranda-Saavedra, Genome-wide enhancer prediction from epigenetic signatures using genetic algorithm-optimized support vector machines. *Nucleic Acids Res.* **40**, e77 (2012).
  106. M. Rye *et al.*, Chromatin states reveal functional associations for globally defined transcription start sites in four human cell lines. *BMC Genomics.* **15**, 120 (2014).
  107. A. J. Bannister, T. Kouzarides, Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381–395 (2011).
  108. A. MacNamara, C. Terfve, D. Henriques, B. P. Bernabé, J. Saez-Rodriguez, State-time spectrum of signal transduction logic models. *Phys. Biol.* **9**, 045003 (2012).

109. C. Terfve *et al.*, CellNOptR: a flexible toolkit to train protein signaling networks to data using multiple logic formalisms. *BMC Syst. Biol.* **6**, 133 (2012).
110. B. Ingalls, *Mathematical Modelling in Systems Biology : An Introduction* (2013).
111. A. Naldi *et al.*, Logical modelling of regulatory networks with GINsim 2.3. *Biosystems.* **97**, 134–139 (2009).
112. W. Abou-jaoudé *et al.*, Logical modeling and dynamical analysis of cellular networks. *Front. Genet.* **7**, 1–20 (2016).
113. D. Bérenguier *et al.*, Dynamical modeling and analysis of large cellular regulatory networks. *Chaos.* **23**, 0251141–0251149 (2013).
114. G. a Pavlopoulos *et al.*, Using graph theory to analyze biological networks. *BioData Min.* **4**, 10 (2011).
115. A. Naldi, E. Remy, D. Thieffry, C. Chaouiya, Dynamically consistent reduction of logical regulatory graphs. *Theor. Comput. Sci.* **412**, 2207–2218 (2011).
116. H. Macleod, L. M. Wetzler, T cell activation by TLRs: a role for TLRs in the adaptive immune response. *Sci. Signal.* **2007**, pe48 (2007).
117. S. H. Hong *et al.*, Intranasal administration of a flagellin-adjuvanted inactivated influenza vaccine enhances mucosal immune responses to protect mice against lethal infection. *Vaccine.* **30**, 466–74 (2012).
118. C. J. M. Braga *et al.*, CD8+ T cell adjuvant effects of Salmonella FliCd flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. *Vaccine.* **28**, 1373–82 (2010).
119. M. L. Mbow, E. De Gregorio, N. M. Valiante, R. Rappuoli, New adjuvants for human vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 411–6 (2010).
120. H. H. Salman, J. M. Irache, C. Gamazo, Immunoadjuvant capacity of flagellin and mannosamine-coated poly(anhydride) nanoparticles in oral vaccination. *Vaccine.* **27**, 4784–4790 (2009).
121. S. B. Mizel, J. T. Bates, Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J. Immunol.* **185**, 5677–5682 (2010).

122. T. R. Kollmann *et al.*, Neonatal Innate TLR-Mediated Responses Are Distinct from Those of Adults. *J. Immunol.* **183**, 7150–7160 (2009).
123. A. C. Palin, V. Ramachandran, S. Acharya, D. B. Lewis, Human neonatal naive CD4+ T cells have enhanced activation-dependent signaling regulated by the microRNA miR-181a. *J. Immunol.* **190**, 2682–91 (2013).
124. D. Gibbons *et al.*, Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants. *Nat. Med.* **20**, 1206–1210 (2014).
125. J. Wang, V. V Lunyak, I. K. Jordan, Chromatin signature discovery via histone modification profile alignments. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10642–56 (2012).
126. T. Lawrence, The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, 1–10 (2009).
127. A. Sica *et al.*, Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J. Biol. Chem.* **272**, 30412–30420 (1997).
128. M. Lappas, M. Permezel, H. M. Georgiou, G. E. Rice, Nuclear factor kappa B regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues in vitro. *Biol. Reprod.* **67**, 668–673 (2002).
129. X. Ma *et al.*, Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Research.* **4**, 1–13 (2015).
130. M.-G. Pan, Y. Xiong, F. Chen, NFAT gene family in inflammation and cancer. *Curr. Mol. Med.* **13**, 543–54 (2013).
131. H. Minematsu, Nuclear Factor of Activated T Cells Regulates Proinflammatory Cytokine Expression in Monocyte / Macrophage- Lineage Cells . Monocyte isolation from mouse bone marrow and culture Poster No . 849 • 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. **8**, 10032 (2007).
132. P. G. Hogan *et al.*, Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* **17**, 2205–32 (2003).
133. F. Macián, C. López-Rodríguez, a Rao, Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene.* **20**, 2476–89 (2001).

134. Y. Qiao *et al.*, AP-1 is a key regulator of proinflammatory cytokine TNF $\alpha$ -mediated triple-negative breast cancer progression. *J. Biol. Chem.* **291**, 5068–5079 (2016).
135. P. H. Schafer *et al.*, Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **305**, 1222–1232 (2003).
136. C. G. Lee *et al.*, A distal cis-regulatory element, CNS-9, controls NFAT1 and IRF4-mediated IL-10 gene activation in T helper cells. *Mol. Immunol.* **46**, 613–621 (2009).
137. X. Hu *et al.*, IFN- $\gamma$  suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity.* **24**, 563–74 (2006).
138. D. Avni, O. Ernst, A. Philosoph, T. Zor, Role of CREB in modulation of TNF $\alpha$  and IL-10 expression in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Mol. Immunol.* **47**, 1396–1403 (2010).
139. A. Y. Wen, K. M. Sakamoto, L. S. Miller, The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. *J. Immunol.* **185**, 6413–6419 (2010).
140. D. W. Ballard *et al.*, HTLV-1 tax induces cellular proteins that activate the kB element in the IL-2 receptor  $\alpha$  gene. *Science (80-. )*. **241**, 1652–1655 (1988).
141. C. W. Chow, M. Rincón, R. J. Davis, M. Rinco, R. J. Davis, Requirement for transcription factor NFAT in interleukin-2 expression. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2300–2307 (1999).
142. M. C. Serrano-Pérez *et al.*, NFAT transcription factors regulate survival, proliferation, migration, and differentiation of neural precursor cells. *Glia.* **63**, 987–1004 (2015).
143. E. Shaulian, M. Karin, AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene.* **20**, 2390–400 (2001).
144. U. Laresgoiti *et al.*, E2F2 and CREB cooperatively regulate transcriptional activity of cell cycle genes. *Nucleic Acids Res.* **41**, 10185–10198 (2013).
145. S. D. Catz, J. L. Johnson, Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene.* **20**, 7342–51 (2001).
146. W. T. Pu, Q. Ma, S. Izumo, NFAT transcription factors are critical survival factors that inhibit cardiomyocyte apoptosis during phenylephrine stimulation in vitro. *Circ. Res.* **92**,

- 725–731 (2003).
147. M. Eriksson, *Ap-1 Transcription Factor in Cell DIFFERENTIATION AND SURVIVAL* (2005).
  148. S. Kumari, S. Curado, V. Mayya, M. L. Dustin, T cell antigen receptor activation and actin cytoskeleton remodeling. *Biochim. Biophys. Acta.* **1838**, 546–56 (2014).
  149. D. D. Billadeau, J. C. Nolz, T. S. Gomez, Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 131–43 (2007).
  150. P. Beemiller, M. F. Krummel, Regulation of T-cell receptor signaling by the actin cytoskeleton and poroelastic cytoplasm. *Immunol. Rev.* **256**, 148–59 (2013).
  151. N. Joseph, B. Reicher, M. Barda-Saad, The calcium feedback loop and T cell activation: How cytoskeleton networks control intracellular calcium flux. *Biochim. Biophys. Acta.* **1838**, 557–568 (2014).
  152. A. S. Sechi, J. Wehland, Interplay between TCR signalling and actin cytoskeleton dynamics. *Trends Immunol.* **25**, 257–265 (2004).
  153. J. Brown, H. Wang, G. N. Hajishengallis, M. Martin, TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J. Dent. Res.* **90**, 417–427 (2011).
  154. H. Kumar, T. Kawai, S. Akira, Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **388**, 621–5 (2009).
  155. T. Kawasaki, T. Kawai, Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* **5**, 1–8 (2014).
  156. J.-C. Bambou *et al.*, In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal Escherichia coli strain. *J. Biol. Chem.* **279**, 42984–92 (2004).
  157. R. G. Labastida-conde *et al.*, Flagellin is a Th1 polarizing factor for human CD4 + T cells and induces protection in a murine neonatal vaccination model of rotavirus infection. *Vaccine.* **36**, 1–10 (2018).
  158. I. Debock, V. Flamand, Unbalanced Neonatal CD4(+) T-Cell Immunity. *Front. Immunol.*

- 5**, 393 (2014).
159. C. L. Langrish, J. C. Buddle, a J. Thrasher, D. Goldblatt, Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clin. Exp. Immunol.* **128**, 118–23 (2002).
  160. G. Wang *et al.*, “Default” Generation of Neonatal Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **185**, 71–8 (2011).
  161. A. O. Galindo-Albarrán *et al.*, CD8<sup>+</sup> T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response. *Cell Rep.* **17**, 2151–2160 (2016).