

Tesis Doctoral

***Mecanismo Molecular de la activación del enhancer del locus
de la cadena alfa del receptor de linfocitos T (Tcra)***



Beatriz del Blanco Pablos

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra"

Consejo Superior de Investigaciones científicas (CSIC)

Universidad de Granada

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología

Granada, 2011

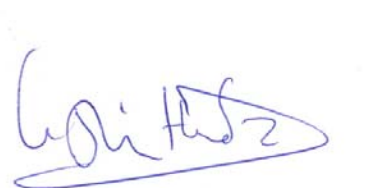
Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Beatriz del Blanco Pablos
D.L.: GR 2097-2011
ISBN: 978-84-694-2949-5

D^a María Cristina Hernández López de Munain, Investigador Científico del Departamento de Biología Celular e Inmunología del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra” del CSIC en Granada.

CERTIFICA que **D^a Beatriz del Blanco Pablos**, Licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Biología Celular e Inmunología del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra” del CSIC en Granada, el trabajo titulado: “**Mecanismo Molecular de la activación del enhancer del locus de la cadena alpha del receptor de linfocitos T (*Tcra*)**”, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

En Granada, a 21 de febrero del 2011.

V^oB^o Director



M^a Cristina Hernández López

La interesada



Beatriz del Blanco Pablos

ÍNDICE

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS.....	2
II. RESUMEN.....	7
III. INTRODUCCIÓN.....	10
1.- Estructura del receptor del antígeno de los linfocitos T (TCR).	
1.1.-Estructura molecular del TCR.....	10
1.2 Organización genómica de los loci de los TCR (Tcrs).....	11
2.- Recombinación V(D)J	
2.1.- Reacción de recombinación V(D)J: Iniciación, corte y ensamblaje de segmentos génicos.....	13
2.2.- Regulación de la recombinación V(D)J: Modelo de accesibilidad.....	15
2.3.- Transcripción germinal y recombinación V(D)J.....	16
2.4.- Organización de la cromatina.....	18
2.5.- Complejos moduladores de la cromatina.....	19
2.6.- Elementos reguladores en cis.....	21
2.6.1.- Enhancers.....	21
2.6.2.- Promotores.....	22
2.6.3.- Holocomplejos enhancer-promotor.....	23
3.- Desarrollo de los linfocitos T en el timo	
3.1.- Precursores hematopoyéticos.....	25
3.2.- Etapas del desarrollo de los timocitos. Generación de los linajes $T_{\alpha\beta}$ y $T_{\gamma\delta}$	25
3.3.- Señalización intracelular mediada por el pre-TCR.....	28

3.4.- Factores de transcripción activados durante la señalización por el pre-TCR.....	30
3.4.1.- Factores NFAT.....	30
3.4.2.- Complejos AP-1.....	32
3.4.3.- Factores Egr.....	33
3.4.4.- Proteínas E.....	34
4.- Regulación de la expresión génica en el locus <i>Tcrad</i>	
4.1.- Regulación de la transcripción y recombinación V(D)J en los loci <i>Tcrd</i> y <i>Tcra</i> durante el desarrollo.....	35
4.2.- Enhancer del locus <i>Tcrd</i> ($E\delta$).....	38
4.3.- Enhancer del locus <i>Tcra</i> ($E\alpha$).....	41
IV. Objetivos.....	46
V. Resultados	
A. La composición e interacciones estereoespecíficas entre complejos nucleoproteicos ensamblados en $E\alpha$ son flexibles	
- Resumen.....	49
<i>Flexible stereospecific interactions and composición within nucleoprotein complexes assembled on the <i>TCRα</i> gene enhancer.....</i>	50
- Conclusiones.....	66
B. Activación de $E\alpha$ por factores inducibles por señalización a través del pre-TCR	
- Resumen.....	69

	<i>Tcra enhancer activation by inducible transcription factors downstream of pre-TCR signaling</i>	70
-	Conclusiones	108
C. Anexos (datos no publicados)		
Anexo I. Análisis de la unión de los factores NFAT y Ets-1 a 5'Tα1		
-	Resumen	111
	Análisis de la unión de los factores NFAT y Ets-1 a 5'T α 1.....	112
-	Conclusiones	122
Anexo II. Análisis de la actividad de Eα durante la maduración de los linfocitos T		
-	Resumen	124
	Análisis de la actividad de E α durante la maduración de los linfocitos T.....	125
-	Conclusiones	140
VI.	Discusión	142
VII.	Conclusiones	158
VIII.	Perspectivas	161
IX.	Bibliografía	163

I.- Abreviaturas

I.- ABREVIATURAS

2-ME: 2-mercaptoetanol

3C: Captura de la conformación de la cromatina

Ab: Anticuerpo

ADN: Ácido dexosi-ribonucleico

AMP: Monofosfato 5' de adenosina

ATP: Trifosfato de adenosina

AP-1: Proteína de activación-1

ATF: Factor de activación de la transcripción

BSA: Seroalbúmina bovina

C: Región constante de las cadenas de TCRs o Igs

cADN: ADN complementario

cAMP: AMP cíclico

CBP: Proteína de unión a CREB

CDR: Regiones determinantes de la complementariedad

ChIP: Inmunoprecipitación de cromatina

CRE: Elemento de respuesta al AMP cíclico

CREB: Proteína de unión a CRE

CS: Sitio consenso de unión al ADN

CsA: Ciclosporina A

D: Segmento génico de diversidad del TCR

DBD: Dominio de unión al ADN

DLL: Ligando Delta-like

DMS: dimetilsulfato

DN: Dobles negativos

DNasa: Deoxirribonucleasa

DP: Dobles positivos

DTT: Ditionitrito

E α : Enhancer del locus *Tcra*

E α i: Secuencia de E α introducida ectópicamente en el genoma

E β : Enhancer del locus *Tcrb*

E δ : Enhancer del locus *Tcrd*

EDTA: Ácido etiléndiaminotetracético

Egr: Factores tempranos de respuesta al crecimiento

EGTA: Ácido etiléntrico bis-(b-aminoetiléster) N,N,N',N'tetraacético

E κ : Enhancer del locus *Igk*

E μ : Enhancer del locus *Igh*

EMSA: Ensayo de retardo de la movilidad electroforética

ERK: Quinasa de regulada por señal extracelular

ETP: Precursor de células T

FBS: Suero fetal bovino

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

H(1-4): histonas 1-4

HAT: acetiltransferasa de histonas

HEB: Proteína de HeLa de unión a caja-E

HDAC: desacetilasa de histonas

HMT: metiltransferasa de histonas

IMDM: Medio de Dulbecco modificado por Iscove

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

Igh: Locus de la cadena pesada de Ig

Igk: Locus de la cadena ligera κ de Ig

Igl: Locus de la cadena ligera λ de Ig

IL: interleuquina

J: Segmento génico de unión o “joining” del TCR

J α 49p: Promotor asociado al segmento génico J α 49

LEF: Factor de unión a enhancer de linfocitos

LMPP: progenitores multipotentes linfoides

mCS: Sitio consenso mutado de unión al ADN

Mage: Gen 2 del antígeno de melanoma

mARN: ARN mensajero

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MAR: Región de unión a matriz nuclear

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MNasa: Nucleasa de micrococo

NFAT: Factor nuclear de células T activadas

NHEJ: Reparación de ADN no homólogo

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

pb: Par de bases

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

PE: Ficoertrina

PCR: Reacción en cadena mediada por polimerasa

PKC: Proteína quinasa C

PMA: Ester de acetato miristato de forbol

PMSF: Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo

PTK: Proteína tirosina-quinasa

RAG: Gen activador de la recombinación

RNAPII: ARN polimerasa II

RSS: Secuencia señal de recombinación

RT-PCR: PCR mediada por retrotranscriptasa

SCID: Inmunodeficiencia severa combinada

SDS: Dodecilsulfato sódico

TEA: Promotor del transcrito temprano de T α

TCF: Factor de células T

TCR: Receptor de linfocitos T

Tcra: Locus de la cadena TCR α

Tcrb: Locus de la cadena TCR β

Tcrd: Locus de la cadena Tcr δ

Tcrg: Locus de la cadena Tcr γ

TdT: Deoxinucleotidiltransferasa terminal

TNF: Factor de necrosis de tumores

TPA: Ester de acetato de tetradecanoilforbol

TRE: Elemento de respuesta al TPA

V: Segmento génico variable del TCR

ZAP70: Proteína 70 asociada a la cadena ζ

II.- Resumen

RESUMEN

El enhancer del locus de la cadena α del receptor para antígeno de linfocitos T (*Tcra*), $E\alpha$, es esencial para la activación de la transcripción germinal y recombinación $V\alpha J\alpha$ durante el desarrollo de los linfocitos T, y por tanto para la generación de los linfocitos $T\alpha\beta$. $E\alpha$ se ha considerado un paradigma de los enhanceosomas, definidos como complejos multiproteicos muy compactos ensamblados en una secuencia reguladora. $E\alpha$ está formado por cuatro elementos denominados $T\alpha 1$ - $T\alpha 4$, albergando $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ las secuencias necesarias para la actividad transcripcional y recombinacional de $E\alpha$ en vivo. Está aceptado que para la actividad de $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ se precisa una estructura muy rígida del enhanceosoma formado en esta secuencia, sin embargo hemos creado una versión mutada del $E\alpha$, $E\alpha MC$, que sorprendentemente resultó ser un enhancer más potente que $E\alpha$, indicando que la identidad y las interacciones estéreo-específicas entre las proteínas que forman $E\alpha$ pudieran ser más flexibles de lo que se supone. $E\alpha MC$ ha proporcionado, además, información sobre las interacciones requeridas entre los distintos factores de transcripción de unión a $E\alpha$ para su correcta activación temporal durante el desarrollo de los timocitos. La posibilidad del ensamblaje de distintos enhanceosomas en $E\alpha$ podría representar una forma más flexible para el procesamiento de información durante el desarrollo de los linfocitos T.

La activación de $E\alpha$ ocurre durante la transición de timocitos $CD4^-CD8^-$ dobles negativos (DN)3a a $CD4^+CD8^+$ dobles positivos (DP), a través de la señalización mediada por el pre-TCR, y viene acompañada de importantes cambios en la estructura de la cromatina del enhancer y de su área de influencia. Para entender el mecanismo molecular de activación de $E\alpha$ durante el desarrollo de los timocitos, hemos estudiado los requerimientos para su activación, demostrando que se necesita una señalización constante a través de la fosfolipasa $C\gamma$ y mediada por Ca^{2+} /calcineurina y las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y de respuesta extracelular (ERK). Mediante el análisis comparativo de las secuencias de $E\alpha$ humano y murino, y validación experimental *in vitro*, hemos identificado una intrigante concentración de sitios de unión para factores de transcripción inducibles en $5'T\alpha 1$ - $T\alpha 2$, coincidentes con sitios esenciales previamente descritos para factores de transcripción constitutivos de timocitos. En concreto, hemos demostrado la presencia de dos sitios para NFAT en $5'T\alpha 1$, un sitio para NFAT y un sitio para AP-1 en $T\alpha 1$ y un sitio para NFAT en $T\alpha 2$,

además de varios sitios de unión para factores Egr en 5'T α 1-T α 2 y 3'T α 4. Estos factores son capaces de ensamblarse en vivo en un enhanceosoma E α activo mediado por la señalización a través del pre-TCR, reclutando co-activadores con actividad acetilasa de histonas. La coincidencia exacta entre sitios en E α de unión para los factores constitutivos de timocitos y factores inducibles a través del pre-TCR apoya que el nuevo enhanceosoma se forme mediante un intercambio de factores mediado por competición en su unión al ADN. Estos datos proporcionan el mecanismo molecular de activación de E α y una explicación molecular para la paradoja de su activación en ausencia de cambios detectables en experimentos de *footprinting* genómico con dimetilsulfato (DMS) realizados en timocitos DN3a y DP.

La inducción de los factores NFAT, AP-1 y Egr se produce de manera transitoria durante una primera fase de la señalización a través del pre-TCR, lo cual sugiere que éstos pudieran dejar de formar parte del enhanceosoma E α cuando su disponibilidad disminuye en el núcleo en una segunda fase de señalización. Por esa razón, hemos analizado la actividad de E α durante la maduración de los linfocitos T. Nuestros datos indican que las señalizaciones mediadas por los complejos pre-TCR o TCR $\alpha\beta$ son indistinguibles en su capacidad de activar E α en timocitos DN4/DP. Además, hemos analizado la funcionalidad de E α en linfocitos T periféricos en vivo, tanto en el locus *Tcra* endógeno como en una localización ectópica, demostrando que E α se encuentra inactivo en periferia. Estos datos están en concordancia con el mecanismo molecular propuesto para la activación del enhanceosoma de E α , demostrando que su actividad es transitoria, estando E α inactivo en timocitos DN3a, activo en timocitos DN4/DP e inactivo en linfocitos T periféricos.

III. Introducción

III.- INTRODUCCIÓN

1.- ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE ANTÍGENO EN LINFOCITOS T (TCR)

1.1.-Estructura molecular del TCR

El complejo del TCR, el cual identifica a los linfocitos T maduros, se trata de un complejo glicoproteico transmembrana que incluye varias cadenas estructural y funcionalmente distintas, no unidas covalentemente, pertenecientes a dos subcomplejos: el receptor clonotípico, que se conoce como TCR dando el nombre a todo el complejo, y el subcomplejo CD3 (Fig. 1). El receptor TCR, consiste en un heterodímero formado por dos cadenas variables denominadas α y β , unidas covalentemente entre sí mediante un puente disulfuro formando un heterodímero. Existe otro tipo de TCR menos habitual, que se encuentra en una pequeña subpoblación de células T, compuesto por un heterodímero formado por otras dos cadenas, γ y δ . Debido a que cada linfocito T solo expresa un TCR, los linfocitos T se diferencian en dos tipos en función de la expresión de un heterodímero $\text{TCR}\alpha\beta$ o un heterodímero $\text{TCR}\gamma\delta$: linfocitos $\text{T}\alpha\beta$ y linfocitos $\text{T}\gamma\delta$. El subcomplejo CD3 está formado por varias cadenas invariables, $\text{CD3}\gamma$, δ y ϵ , y una cuarta cadena ζ , que se asocia al TCR en forma de dímeros de dos cadenas $\zeta\zeta$ unidas covalentemente.

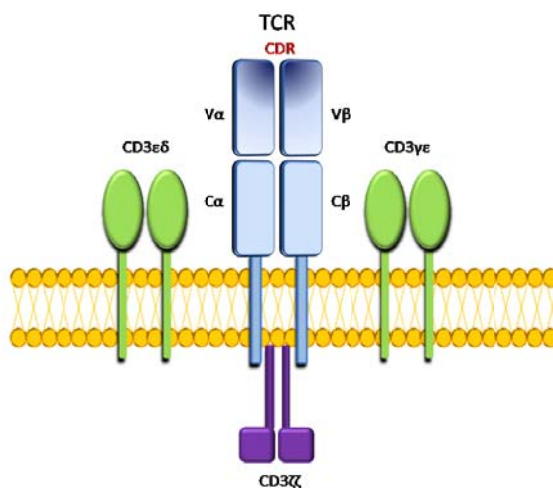


Figura 1.- Estructura molecular de complejo del $\text{TCR}\alpha\beta$. El $\text{TCR}\alpha\beta$ está formado por dos unidades estructurales: El TCR formado, por las cadenas variables que reconocen el antígeno, y el CD3, que transmiten la información al interior celular a través de sus motivos con tirosinas, que una vez fosforilados reclutan otras quinasas y disparan toda la cascada de señalización.

Los heterodímeros $\text{TCR}\alpha\beta$ o $\text{TCR}\gamma\delta$ son responsables del reconocimiento antigénico, mientras que CD3 es responsable del transporte y expresión del complejo en la membrana y de la transducción de señales intracelulares. Los receptores $\text{TCR}\alpha\beta$ o $\text{TCR}\gamma\delta$ reconocen fundamentalmente fragmentos peptídicos asociados a complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I o clase II, o antígenos glicolipídicos asociados a moléculas CD1.

Cada cadena del TCR, α , β , γ o δ , consta de un dominio variable N-terminal y una región constante (C) similar a la de las inmunoglobulinas (Ig), consistente en una región transmembrana hidrófoba y una región citoplásmica corta. Las regiones variables de cada cadena del TCR contienen tramos cortos de secuencias en los que se concentran la variabilidad entre las diferentes cadenas y que forman las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o hipervariables. Tres CDRs, denominados V (de variable), D (de diversidad) y J (de "joining" o unión) de una cadena $\text{TCR}\beta$ o $\text{TCR}\delta$ se encuentran yuxtapuestos con dos CDRs (V y J) de una cadena $\text{TCR}\alpha$ o $\text{TCR}\gamma$, respectivamente, formando así la zona de reconocimiento específico de cada $\text{TCR}\alpha\beta$ o $\text{TCR}\gamma\delta$.

1.2 Organización genómica de los loci de los TCRs (Tcrs)

La diversidad y especificidad de los TCRs se genera a través de un proceso de recombinación somática que sufren los segmentos génicos V, D y J (correspondientes a las CDRs) durante el desarrollo de los linfocitos, denominado recombinación V(D)J. Este proceso, conservado desde el tiburón, permite la generación de un enorme repertorio de receptores distintos con una mínima inversión en material genético. La existencia de este mecanismo de generación de distintos TCRs e Igs es la base de la inmunidad específica o adaptativa, a diferencia de la inmunidad innata basada en la activación de fagocitos, mastocitos, linfocitos NK ("natural-killer") y complemento.

Los segmentos génicos V(D)J se distribuyen a lo largo de los loci que codifican cada una de las distintas cadenas de los TCR con una distribución compleja y muy conservada entre ratón y humano [1]. El locus del $\text{TCR}\beta$ (*Tcrb*) se expande aproximadamente a lo largo de 1 Mb en el cromosoma 6 en ratón (Fig. 2). La región 5' del locus está compuesta por 35 segmentos $V\beta$, 14 de los cuales son pseudogenes no

funcionales. La región 3' del locus está formada por dos subgrupos de segmentos génicos $D\beta$ y $J\beta$, conteniendo un segmento $D\beta$ y seis segmentos $J\beta$ funcionales. En la zona 3' de cada subgrupo de segmentos $D\beta$ y $J\beta$ se encuentra una región constante, $C\beta 1$ o $C\beta 2$, respectivamente. Hacia 3' del $C\beta 2$ se localiza el segmento $V\beta 14$ con una dirección transcripcional invertida.

Los segmentos génicos que codifican las cadenas $TCR\alpha$ (*Tcra*) y $TCR\delta$ (*Tcrd*) están localizados en el mismo locus, denominado *Tcrd*, y están expandidos a lo largo de 1,5 Mb en el cromosoma 14 de ratón [1-2]. La región 5' del locus consta de 100 segmentos V, algunos de los cuales sólo reordenan con $J\alpha$, otros sólo con $D\delta$, y algunos indistintamente con ambos [3]. A continuación hacia 3', se encuentran los segmentos génicos $D\delta$ y $J\delta$, la región $C\delta$ y el segmento $V\delta 5$, con orientación transcripcional invertida, que constituyen el *Tcrd*. En la región 3' del *Tcrd* se encuentra el cluster de 60 segmentos $J\alpha$ y la región $C\alpha$, pertenecientes al locus *Tcra* (Fig. 2)

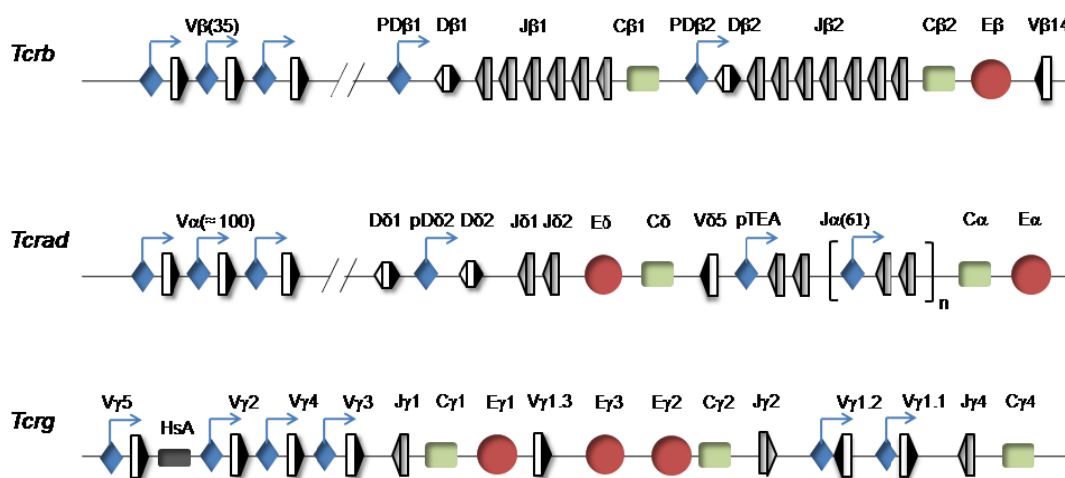


Figura 2 Representación esquemática de los loci de *Tcr*. Se representa la estructura génica de los loci *Tcrb*, *Tcrd* y *Tcrg*. Los segmentos génicos están representados con rectángulos y las RSSs están representadas con triángulos (23pb y 12pb, negro y blanco-sombreado, respectivamente). Los segmentos génicos V y D se representan como rectángulos blancos, los segmentos génicos J se representan como rectángulos grises y las regiones constantes se representan como rectángulos verdes. Los promotores y enhancers se representan como rombos azules y círculos rojos, respectivamente. La representación no está hecha a escala. (Adaptado de (Oleg Osipovich 2006).

El locus que codifica la cadena del TCR γ (*Tcrg*) está localizado en una pequeña región de ADN de unas 200 kb dentro del cromosoma 13 de ratón [1]. Este locus está formado por siete segmentos V γ y un pseudogen V γ , intercalados en tres unidades J γ -C γ funcionales y una no funcional (Fig. 2).

2.- RECOMBINACIÓN V(D)J

2.1.- *Reacción de recombinación V(D)J: Iniciación, corte y ensamblaje de segmentos génicos codificantes*

El proceso de recombinación V(D)J se inicia por la acción de unas endonucleasas específicas de linfocitos inmaduros, RAG-1 y RAG-2 (“Recombination Activation Gene”), las cuales se coordinan para generar rupturas de doble cadena que son reparadas a través de las proteínas de reparación del ADN de segmentos no homólogos (NHEJ) [4-5]. RAG-1/2 están codificadas por dos genes adyacentes [6-7], *Rag1* y *Rag2*, cuyo origen parece ser un transposon bacteriano [8]. Las proteínas RAG-1/2 además de su papel como endonucleasa, pueden actuar como una recombinasa, ya que múltiples estudios encuentran que se trata de un complejo enzimático multifacético que participa a distintos niveles durante la regulación de la recombinación V(D)J [9].

La recombinación V(D)J consiste en el ensamblaje de los segmentos génicos V, D y J para generar genes que codifiquen las cadenas funcionales de TCRs o Igs, durante el desarrollo de los linfocitos T o B, respectivamente. Las proteínas RAG-1/2 reconocen unas secuencias específicas que flanquean los distintos segmentos génicos, denominadas secuencias señal de recombinación (RSSs). Una RSS está formada por un heptámero y un nonámero ricos en AT, ambos altamente conservados, y una secuencia que separa a ambos, denominada espaciador, que puede ser de 12 o 23 pares de bases (pb). Para que pueda darse una correcta recombinación entre dos segmentos génicos es necesario que ésta ocurra entre una RSS con un espaciador de 12 pb y otra con un espaciador de 23 pb [10], condición llamada “regla 12/23”. Por tanto la primera etapa de recombinación V(D)J comienza con la unión del complejo RAG-1/2 a dos RSSs compatibles, es decir que mantengan la regla del 12/23 bp de los RSSs, para dar lugar a una sinapsis recombinacional. Aún

así, la regla 12/23 no es suficiente para explicar la especificidad de los reordenamientos de los segmentos $V\beta$ con los segmentos $D\beta$ y no con los segmentos $J\beta$. Esta especificidad viene determinada por una segunda restricción denominada “beyond 12/23” (traducida como “más allá de la regla 12/23”), por la cual determinantes específicos en las secuencias de los espaciadores del mismo tamaño restringen las recombinaciones entre los segmentos $V\beta$ y $J\beta$ [11-14]. Investigaciones recientes revelan un nivel adicional de restricción en la unión directa de las RAGs a las RSSs que involucra su trimetilación de la H3 en la K4 (H3K4me3) y dimetilación de la H3 en la R2 (H3R2me2) [15].

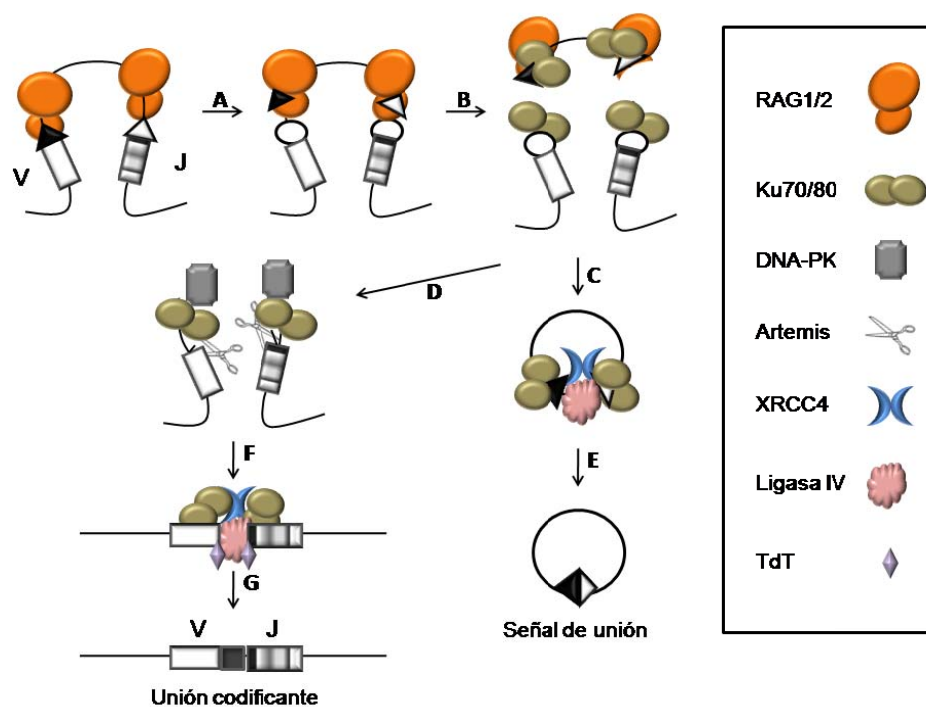


Figura 3. Mecanismo de recombinación V(D)J. Se representan principales las proteínas implicadas en el proceso de recombinación V(D)J. Las flechas indican el orden secuencial del proceso. El segmento génico V se representa como un rectángulo blanco, el segmento génico J se representa como un rectángulo gris, los nucleótidos N añadidos por TdT se representan como un rectángulo negro, las RSSs se representan como triángulos (RSS con espaciador de 12 pb: triángulo negro y RSS con un espaciador de 23 pb: triángulo blanco), y los lazos terminales formados entre hebras complementarias se representan como círculos blancos (Adaptado de (Darry D. Dudley, 2005)).

Una vez unidas específicamente las proteínas RAG-1/2 a las RSSs se produce la ruptura del ADN de doble cadena liberándose grupos hidroxilo 3' terminales, que son capaces de reaccionar con la hebra complementaria dando lugar a la formación de un lazo terminal en la secuencia codificante de los segmentos que están reordenando (Fig. 3A). Proceso que precisa la ayuda de las proteínas de alta movilidad HMG-1 y HMG-2, facilitando el ensamblaje del complejo de la recombinasa RAG-1/2 a las RSSs [16]. En una segunda etapa los lazos terminales son cortados por un complejo formado por las propias RAG-1/2 y las proteínas Ku70/80; éstas últimas reclutan al componente catalítico de la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PK), que fosforila a otras proteínas como Artemis implicada en la apertura de los lazos y en la formación de extremos palindrómicos (P) (Fig. 3B-D), y la variante de histona H2AX, la cual se fosforila en una región amplia en el sitio de corte. La enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT) adiciona un número de nucleótidos variables denominados N a estos extremos P, aumentando aún más la diversidad de las posibles cadenas resultantes (Fig 3F). La resolución de los extremos se lleva a cabo por la proteína XRCC4, a la cual se une y activa la ligasa IV de ADN y otras proteínas de la maquinaria de NHEJ (Fig 3G). Como resultado de este proceso se ligarán las zonas reordenadas codificantes ("coding joint") produciéndose una nueva estructura genómica del locus, la cual, en caso de ser productiva, generará una cadena del TCR o Ig. Como consecuencia de este proceso, se liberarán los subproductos de recombinación ligados a través de las RSSs ("signal joints"), formados por las secuencias existentes entre los segmentos génicos reordenados, en forma de un círculo extracromosomal (Fig. 3C-E).

2.2.- Regulación de la recombinación V(D)J: Modelo de accesibilidad

La recombinación V(D)J está regulada a varios niveles: (1) A nivel de linaje linfocitoide: Los reordenamientos de los loci de *Tcrs* ocurre solo en linfocitos T inmaduros, mientras que los reordenamientos de los loci de *Igs* ocurre solo en linfocitos B inmaduros; (2) A nivel de estadio del desarrollo: Los loci *Tcrb*, *Tcrg* y *Tcrd* reordenan en células pro-T, mientras que el locus *Tcra* lo hace más tarde, en células pre-T; el locus que codifica a la cadena pesada de Igs (IgH), *Igh*, reordena en células pro-B, mientras que los loci que codifican a las cadenas ligeras de las Igs (Igκ e Igλ), *Igl* e *Igk*, lo hacen más tarde, en células pre-B. (3) A nivel del orden en el ensamblaje de los

segmentos génicos: En el locus de *Tcrb*, primero ocurren los reordenamientos de D β a J β y después, los reordenamientos de V β a D β J β ; similarmente, en el locus de *Igh*, primero ocurren los reordenamientos de D_H a J_H y después los reordenamientos de V_H a D_HJ_H. Y (4) A nivel de especificidad alélica: Existe una exclusión alélica en los reordenamientos que ocurren en los loci de *Tcrb* e *Igs*.

Todos los reordenamientos que ocurren en los loci de *Tcrs* e *Igs* se producen por acción de una maquinaria recombinasa común, las proteínas RAG-1/2, que reconocen de manera indistinguible todas las RSSs presentes en estos loci [17-18]. Este hecho estableció un enigma en el entendimiento del mecanismo molecular para la regulación de la recombinación V(D)J en vivo, que ha sido desentrañado, en gran parte, gracias al llamado “modelo de accesibilidad” propuesto hace ya 25 años por el grupo de Frederick W. Alt [19]. Este modelo está ya ampliamente aceptado ya que ha sido avalado por muchas investigaciones y explica cómo la maquinaria de recombinación es capaz de actuar con esta especificidad tan compleja [20]. El modelo de accesibilidad está basado en que es la estructura de cromatina de los distintos loci, y de los distintos segmentos génicos dentro de un locus, lo que determina que las proteínas RAG-1/2 reconozcan las RSSs específicas y que, por tanto, el proceso de recombinación ocurra. Así, se comprobó que las proteínas RAG-1/2, junto con las proteínas implicadas en NHEJ, son suficientes para una adecuada recombinación de los segmentos génicos localizados en estructuras extracromosomales, tanto *in vitro* como en vivo [6, 21]. Sin embargo, estos componentes por sí solos no son capaces de recombinar en vivo los segmentos génicos de receptores del antígeno endógenos. La demostración definitiva de la existencia de una diferente estructura de cromatina en los distintos loci de *Tcrs* e *Igs*, dependiente del linaje celular y del momento del desarrollo, y como ésta determina la accesibilidad de la maquinaria recombinasa, se estableció experimentalmente en vivo mediante la adición de las proteínas RAG-1/2 a núcleos procedentes de células purificadas de los distintos estadios de diferenciación de linfocitos T y B inmaduros [22]. *In vitro*, se ha observado que el corte generado por las proteínas RAG-1/2 en mononucleosomas conteniendo fragmentos de ADN con secuencias RSSs se ve altamente inhibido en comparación con el mismo ADN no cromatinizado [23-24]. Recientemente se ha observado que la unión en vivo de las proteínas RAG-1/2 a las RSSs ocurre solo en aquellas regiones con una conformación abierta de la cromatina, lo cual determinaría la especificidad del proceso dependiente de estadio y tipo celular [25]. Todos estos resultados hacen ver la necesidad de un

cambio conformacional de la cromatina que exponga a las secuencias RSSs para ser accesibles a la maquinaria de recombinación. Estos cambios son altamente regulados por complejos de remodelamiento de la cromatina que son reclutados a través de la cooperación de las secuencias reguladoras en *cis* presentes en estos loci, en concreto por enhancers y promotores (Fig. 2)

2.3.- Transcripción germinal y recombinación V(D)J

Precediendo a la recombinación V(D)J, se produce la transcripción de transcritos germinales (o estériles), procedentes de los segmentos génicos no reordenados [19, 26], la cual tiene una especificidad dependiente de estadio y tipo celular idéntica a la del proceso de recombinación V(D)J en sí mismo. Años atrás se pensaba que esta transcripción germinal era resultado inherente de la accesibilidad de la cromatina impartida por la activación de promotores y enhancers, de tal forma que la activación de estos elementos regularía conjuntamente la accesibilidad de ambas maquinarias, la maquinaria recombinasa y la maquinaria transcripcional. Resultados obtenidos en el estudio del papel de la elongación transcripcional en la activación de la recombinación V(D)J en el locus *Tcra* indican que la transcripción germinal iniciada en los segmentos $J\alpha$ tiene un papel causal en la iniciación de la recombinación $V\alpha J\alpha$ [27]. Por tanto, la transcripción germinal parece ser esencial en la regulación de clusters de segmentos génicos en loci largos, donde la accesibilidad de la cromatina dirigida por los promotores necesite propagarse a grandes distancias. Dado que esta transcripción es regulada por los mismos elementos, enhancers y promotores localizados en los loci de los receptores de los linfocitos, es posible que sea la propia transcripción germinal la que reclute la maquinaria recombinasa a las RSSs específicas.

En el caso del locus de *Igh*, además de los clásicos transcritos germinales que ocurren en el sentido normal de transcripción, se han identificado varios transcritos antisentido específicos de células pro-B que abarcan largas regiones de segmentos génicos V_H y $D_H J_H$, y que se originan cerca de E_μ , siendo dependientes de E_μ [28-29]. Se ha propuesto que estos transcritos intergénicos antisentido jueguen un papel fundamental en la apertura de la cromatina en amplias regiones de *Igh*. Aunque esta hipótesis no ha sido demostrada, la transcripción intergénica se ha asociado funcionalmente con la activación génica y la apertura de la cromatina en el locus de β -

globina [30]. Así pues, el locus de *Igh* tiene transcripción germinal sentido y antisentido originada desde los promotores y el enhancer, respectivamente. De hecho, recientes análisis del transcriptoma indican que los enhancers específicos de tejido conducen transcripción bidireccional, la cual puede ser necesaria para sus funciones reguladoras. En conjunto, los estudios de transcripción indican que ésta tiene un posible papel en la generación de cromatina accesible importante para la regulación génica a largas distancias.

La transcripción germinal y la accesibilidad de la cromatina son fenómenos fundamentales y necesarios para la activación de la recombinación V(D)J, pero no parecen ser suficientes ya que existen casos claros en los que la transcripción activa y la apertura de la cromatina no son capaces, por sí mismas, de llevar a un eficiente reordenamiento [31-32], indicando la existencia de un mecanismo de regulación “más allá” de la accesibilidad relacionado con la regulación a nivel de la localización subnuclear de estos loci durante el desarrollo de los linfocitos [33-34].

2.4.- Organización de la cromatina

El ADN genómico de los eucariotas está empaquetado dentro de la cromatina en nucleosomas, las subunidades básicas de la cromatina. Este empaquetamiento además de permitir almacenar 2 metros de ADN en un núcleo de 10 micras, crea el ambiente para una estricta regulación de la expresión de los genes. Los nucleosomas están formados por aproximadamente 146 pb de ADN asociados a un octámero de cuatro pares de histonas (H): H2A, H2B, H3 y H4 [35-36]). Entre nucleosomas existe un fragmento de 20-60 pb de ADN libre llamado espaciador, el cual garantiza flexibilidad a la cromatina. Existe un segundo nivel de organización superior gracias a la acción de la histona H1 que se une al ADN espaciador internucleosomal y ayuda a unir nucleosomas entre sí para dar una conformación más compacta [35].

Un componente clave en el control de la accesibilidad del ADN a las distintas maquinarias nucleares consiste en la modulación de la compactación de la cromatina [37]. Existen tres tipos de configuración de la cromatina: 1) La heterocromatina constitutiva, la cual es una forma altamente compactada de cromatina, que representa su estado más inaccesible donde se encuentran la mayoría de los genes silenciados; 2) La eucromatina, la cual es una cromatina en el estado más abierto, donde se encuentran la mayoría de los genes transcripcionalmente activos; y 3) La

heterocromatina facultativa, la cual es una forma de compactación intermedia, donde se encuentran loci silenciados que pueden ser activados a nivel transcripcional mediante complejos de remodelamiento de la cromatina.

En general, el mecanismo que lleva a una modulación dinámica de la cromatina conlleva modificaciones covalentes de la cromatina, tanto de las histonas como del ADN [38-39]. Estas modificaciones son llevadas a cabo por complejos que se reclutan al ADN a través de factores de transcripción y co-activadores transcripcionales unidos a las regiones reguladoras en *cis*. Las modificaciones epigenéticas más habituales incluyen las modificaciones que sufren las histonas en su extremo N-terminal, siendo las más generales y mejor conocidas la acetilación de lisinas (Kac), la metilación de lisinas (Kme), pudiendo ésta ser tri, bi, y monometilación, la metilación de argininas (Rme), la fosforilación de serinas y la ubiquitinación de lisinas. Otras modificaciones epigenéticas comunes incluyen la metilación de regiones CpG. Todas estas modificaciones actúan como parte de un patrón llamado “código epigenético”. Debido a que las modificaciones epigenéticas son reversibles y que sus patrones pueden cambiar rápidamente en respuesta a estímulos externos o durante distintos estadios del desarrollo, las células pueden dirigirse hacia un camino u otro durante su diferenciación de forma dependiente de la regulación epigenética.

2.5.- Complejos moduladores de la cromatina

La mayoría de las proteínas modificadoras de histonas carecen de motivos de reconocimiento al ADN, y por tanto necesitan ser reclutadas a través de su asociación a determinados factores de transcripción unidos a regiones reguladoras en *cis*, enhancers y/o promotores, principalmente. La descompactación de la cromatina hace visibles nuevas secuencias de ADN dentro de estas regiones, como los promotores, por ejemplo, donde se unirán factores transcripcionales adicionales, como ocurre con la proteína de unión a la secuencia TATA (TBP), la cual es un componente muy general del complejo de iniciación de la transcripción [40], y la ARN polimerasa II (RNAPII), para dar lugar a un complejo de iniciación competente con la transcripción. El ensamblaje de nuevos factores permitirá, a su vez, el reclutamiento adicional de nuevas actividades modificadoras de histonas que permitirán que el gen tenga una estructura de la cromatina abierta favoreciendo la transcripción activa.

Existe un extenso grupo de proteínas capaces de mantener la dinámica de la estructura de la cromatina. Entre las proteínas encargadas de las modificaciones más relevantes se encuentran las acetiltransferasas de histonas (HATs) y las desacetilasas de histonas (HDACs), encargadas de acetilar y desacetilar las lisinas del extremo N-terminal de las histonas, respectivamente. Estas actividades enzimáticas son reclutadas por factores de transcripción a las regiones reguladoras, y desde allí son capaces de propagar esa modificación a las regiones de la cromatina adyacentes, cuya estructura va a ser modulada. Los genes activos transcripcionalmente están empaquetados en nucleosomas hiperacetilados en las lisinas de H3 y H4, en cambio los silenciados están empaquetados en nucleosomas hipoacetilados [41]. Como ocurre con la transcripción, los loci activos para el reordenamiento V(D)J están asociados con hiperacetilación de histonas en vivo, mientras que los loci reprimidos para el reordenamiento tienen sus histonas hipoacetiladas [42-44] (Fig. 3). Recientemente se ha comprobado que las marcas de hiperacetilación de histonas coinciden con los sitios de reclutamiento de la maquinaria de recombinación V(D)J, con la especificidad predicha dentro de los loci de *Igs* y *Tcrs* [25]. La acetilación de las histonas genera, a su vez, el reclutamiento de otros complejos de remodelamiento de la cromatina, como el complejo SWI/SNF dependiente de ATP, el cual se ha comprobado que tiene un efecto sinérgico con la recombinasa V(D)J en el corte de sus dianas [45].

La metilación en la cromatina puede darse a nivel de las histonas y/o a nivel del ADN. La metilación de las lisinas de la histona H3 (H3K9me y H3K27me) están asociadas a la represión de genes, por cambios en la conformación de la cromatina [41, 46], y se produce a través del reclutamiento de metiltransferasas de histonas (HMTs) [47]. Esta metilación en H3 produce, a su vez, el reclutamiento subsecuente de diferentes complejos de remodelamiento que inhiben la transcripción génica. Así, se ha comprobado que la modificación H3K9me inhibe la recombinación V(D)J de los *Tcrs*, por inhibición de la accesibilidad de las RSSs a la maquinaria recombinasa [48-49]. Otras metilaciones, en cambio, como la H3K4me2 y H3K4me3, están asociadas con la activación de la expresión génica y se encuentran asociadas a la transcripción germinal de los loci de *Igs* y *Tcrs* predispuestos para la recombinación V(D)J. La metilación del ADN establece un segundo nivel de metilación a través del estado de metilación de los dinucleótidos CpG, que también regula la recombinación V(D)J de ciertos loci [50], como se ha demostrado en la regulación de la exclusión alélica en la

recombinación $V_{\kappa}J_{\kappa}$ del locus *Igk* durante el desarrollo de las células B [51]. En otros loci, como el del locus *Tcra*, la metilación CpG no tiene efecto, ya que segmentos génicos V_{α} y J_{α} reordenan estando sus regiones CpG hipermetiladas durante el desarrollo [52-53].

2.6.- Elementos reguladores en cis

2.6.1.- Enhancers

La clásica definición de un enhancer es la de un elemento genético que confiere competencia transcripcional a promotores situados a largas distancias y de una forma independiente de la orientación [54]. Desde un punto de vista epigenético, los enhancers sirven para que a través de sus factores de transcripción unidos se recluten actividades modificadoras de las histonas, generando áreas accesibles de cromatina e, incluso, zonas de cromatina libres de nucleosomas. De hecho, el ensayo de hipersensibilidad a la digestión por DNasa I es un método muy poderoso ampliamente utilizado para la identificación de enhancers. Los estudios epigenéticos han demostrado que los enhancers suelen ser elementos específicos de tejido con marcas epigenéticas comunes, como son el reclutamiento de las HATs CBP/p300 [55], altos niveles de H3K4me1 y bajos niveles de H3K4me3, por reclutamiento de HMTs [56-57]. Además a través del reclutamiento de complejos SWI/SNF por estas secuencias, los nucleosomas se reposicionan a lo largo del ADN en toda el área de influencia del enhancer. De esta forma, el promotor asociado es expuesto para el reconocimiento subsecuente de la maquinaria de transcripción y, a su vez, otras secuencias dentro del enhancer y/o promotor pueden ser reconocidas por otros factores de transcripción para formar complejos multiproteicos funcionales [58].

Todos los loci de *Igs* y *Tcrs* contienen elementos enhancers, normalmente situados en la región 3' terminal de cada locus [20] (Fig.2). Los estudios funcionales para establecer el papel de estos enhancers mediante su delección en cada uno de los loci *Tcrs* e *Igs* (ratones knock-out), o mediante la integración de construcciones reporteras de recombinación dirigidas por estas secuencias (ratones transgénicos), han revelado su papel esencial en la activación de la recombinación V(D)J [20, 59]. Por ejemplo, la delección del enhancer de *Tcrb* (E_{β}) y del enhancer de *Tcra* (E_{α}) impide la transcripción germinal y reordenamiento génico de los loci *Tcrb* y *Tcra* en cada

locus respectivo. Estos datos funcionales coinciden con la disminución de acetilación de histonas H3 y H4, lo cual que se traduce en una inaccesibilidad de la cromatina de las regiones D β -J β y V α -J α por parte de las maquinarias de transcripción y de recombinación V(D)J [53, 60]. Lo mismo ocurre en los loci de *Igs*; por ejemplo, la eliminación del enhancer intrónico del locus *Igh* (E μ) reduce la recombinación de los segmentos D H J H y bloquea completamente la de segmentos V H a D H J H [61]. Estos datos han revelado que los enhancers sirven como elementos de control de la accesibilidad a largas distancias. Por tanto, los enhancers son los elementos clave que inician la apertura de la cromatina en estos loci a nivel general, llegando así a modular la activación de la transcripción y el reordenamiento génico durante el desarrollo.

2.6.2.- Promotores

Los promotores dirigen la iniciación de la transcripción proporcionando una plataforma para la organización de un complejo de RNAPII competente y funcional, dirigiendo a su vez la recombinación V(D)J de segmentos o grupos de segmentos génicos concretos. Los promotores se distribuyen a lo largo de los loci de *Tcrs* e *Igs*, asociados a segmentos génicos concretos o a grupos de ellos [20, 59]. En configuración germinal (no reordenada), los promotores de estos loci dirigen la expresión de transcritos germinales. Sin embargo, una vez ha ocurrido una recombinación V(D)J productiva, los promotores asociados a cada segmento génico V dirige la transcripción de un gen de receptor de antígeno reordenado. La mayoría de los promotores de los loci de *Tcrs* e *Igs* son dependientes de enhancer, con una pequeña actividad transcripcional inherente. En conjunto, todas estas observaciones indican que, en contraste con la acción a largas distancias realizadas por los enhancers, los promotores germinales tienen un efecto localizado en la estructura de la cromatina, restringido a uno o a unos pocos segmentos génicos.

Varias evidencias apoyan la función localizada de los promotores como elementos modificadores de la cromatina: 1) La delección del promotor asociado al segmento D β 1 inhibe la transcripción y la recombinación de solo ese segmento génico dentro del cluster D β 1J β , sin afectar el cluster D β 2J β [62-63]; este efecto local se ha correlacionado con pérdidas de la acetilación de histonas en el área del promotor [63-64]. La delección del promotor asociado al segmento génico V β 14 inhibe su transcripción germinal y su recombinación sin afectar a los demás segmentos génicos

V β [65]. 3) En el caso del locus *Tcra*, el promotor TEA que dirige los reordenamientos que afectan a los segmentos J α génicos asociados, situados inmediatamente 3' del promotor, sin afectar a los situados inmediatamente 3' de su área de influencia [66-67].

Recientemente se ha propuesto un mecanismo para la acción localizada de los promotores como elementos modificadores de la estructura de la cromatina. La proteína RAG-2 tiene un dominio denominado "plant homeodomain" (PHD), que reconoce específicamente a H3K4me3 [68-69]. Esta modificación está altamente enriquecida en los sitios cercanos a la iniciación de la transcripción de promotores activos [70]. De hecho, experimentos por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) han demostrado que RAG-2 se une cerca de los promotores activos en todo el genoma, no solo de los loci de *Tcrs* e *Igs* [71]. Por tanto, el reclutamiento de la actividad recombinasa depende de la unión de RAG-1 a las RSSs accesibles, ya que la unión de RAG-2 es más generalizada. Sin embargo, la alta densidad de H3K4me3 cerca de los promotores germinales estabilizaría la asociación del complejo RAG-1/2, proporcionando una explicación a la función localizada de los promotores. Además, se ha observado que otra función de las interacciones RAG-2/H3K4me3 es aumentar la actividad enzimática de los complejos RAG-1/2 (Fig. 4) [72].

2.6.3.- Holocomplejos promotor-enhancer

La naturaleza de la arquitectura de los loci de *Tcrs* e *Igs* precisa de la comunicación entre enhancers y promotores a largas distancias en el genoma. Se han propuesto varios modelos para explicar estas interacciones espaciales [73-74], sin embargo, el mecanismo más comúnmente aceptado proviene de los estudios realizados en el locus de β -globina y propone que hay una interacción directa entre ambos complejos formándose un holocomplejo transcripcional [75]. Este puente molecular generaría un lazo con el ADN intermedio y permitiría al enhancer reclutar factores directamente a los promotores, facilitando la organización de complejos transcripcionales competentes (Fig. 4) [75-76].

Las evidencias iniciales de que los enhancers y promotores de los loci de receptores de antígeno forman holocomplejos vienen de los estudios en el locus de *Ig κ* . Mediante la técnica de captura de la conformación de la cromatina (3C), el grupo

de W.T. Garrard demostró que los enhancers del locus *Igκ* distales se posicionan espacialmente en la proximidad de los promotores V_{κ} en células B que estaban reordenando activamente $V_{\kappa}J_{\kappa}$ [77]. Similarmente, en el locus del *Tcrb* se ha observado, por ensayos de ChIP, que factores de transcripción asociados al promotor del segmento génico D β 1, como son Sp1 y TBP, están también asociados físicamente a E β , a través de la proximidad espacial entre ambos elementos [64].

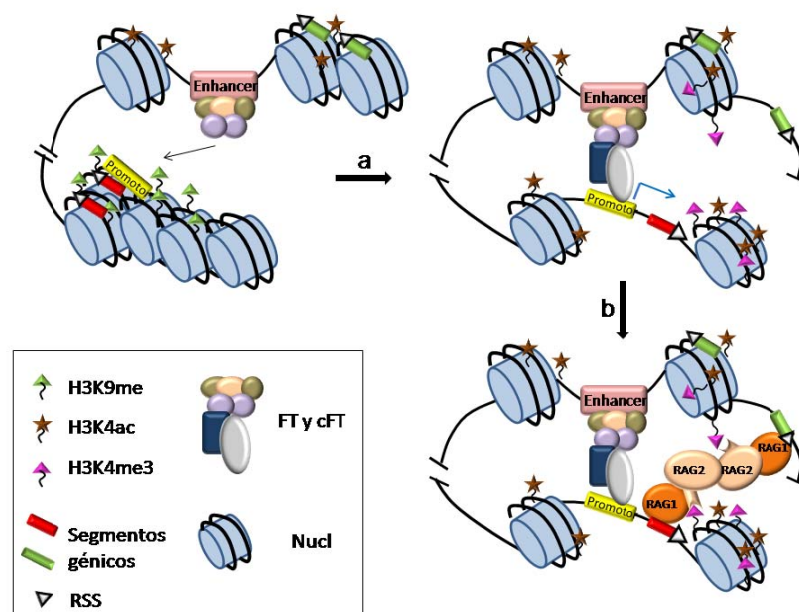


Figura 4. Regulación de la accesibilidad de la cromatina a las proteínas RAG-1/2. Los cambios en la cromatina promovidos por el promotor y el enhancer generan una accesibilidad de las secuencias RSSs a las proteínas RAG-1/2. En una primera configuración, los promotores que flanquean los segmentos génicos están inactivos y mantienen la cromatina compactada, haciendo inaccesible las RSSs a las proteínas RAG-1/2. (a) La activación del enhancer, a través del ensamblaje de determinados factores de transcripción (FT) y cofactores (cFT) modula la unión de la maquinaria de transcripción al promotor, dando lugar a la formación de un holocomplejo promotor/enhancer, activando la transcripción germinal (flecha azul), la reposición de los nucleosomas (Nucl) y modificaciones de los extremos N-terminales de las histonas presentes en el área cercana: H3K9me (representa una marca de represión), y H3K4me3 y H3K4ac (representan marcas de activación). (b) La apertura de la cromatina promovida por la transcripción germinal deja accesibles las RSSs, que son reconocidas por las proteínas RAG1/2. El dominio PHD de la proteína RAG-2 reconoce y se une con alta afinidad a las marcas de H3K4m3, que se encuentran adyacentes a los segmentos génicos, lo cual estabiliza la unión a las RSSs y da lugar al inicio del proceso de recombinación V(D)J.

3.- DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T EN EL TIMO

3.1.- *Precursores hematopoyéticos*

Los progenitores multipotentes linfoides (LMPPs) derivan de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea (o hígado fetal en el embrión). Los LMPPs tienen un fuerte potencial mieloide y linfóide dependiendo de la expresión de distintos factores. Los LMPP pueden llegar a colonizar el timo debido a la influencia de los receptores de quimioquina CCR9, CCR7 y un ligando de la P-selectina expresado en el epitelio tímico, PSGL1. El epitelio tímico promueve y mantiene la diferenciación, proliferación y supervivencia de los LMPPs que pasaran a ser los precursores tempranos de células T (ETPs) $c\text{-kit}^+CD44^+CD25^-$, consideradas la población tímica más inmadura. Las células epiteliales tímicas contribuyen a la diferenciación de esta población a través de receptores de ligando y factores de crecimiento. El factor más importante en el mantenimiento de este proceso son los ligandos de los receptores de superficie Notch, específicamente los ligandos Delta-like (DLL) 1 y 4. El desarrollo de los linfocitos T comienza cuando las ETPs reciben la señalización de Notch al exponerse a DLL1/4 presentes en el microambiente del timo. La señalización a través de Notch inicia y mantiene el programa de diferenciación de las células del linaje T a lo largo de su desarrollo tímico.

3.2.- *Etapas del desarrollo de los timocitos. Generación de los linajes $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$*

Las células T inmaduras o timocitos pasarán por distintas etapas del desarrollo marcadas por la expresión superficial de los co-receptores CD4 y CD8 (Fig. 5). Los timocitos más inmaduros constituyen aproximadamente el 2% de los timocitos totales y se conocen como células pro-T o timocitos doble-negativos (DN), ya que carecen de la expresión en superficie de los co-receptores CD4 y CD8. Los timocitos DN diferencian de DN1 a DN4 a lo largo de su desarrollo, distinguibles en base a la expresión de CD44 y CD25: DN1 ($CD25^-CD44^+$), DN2 ($CD25^+CD44^+$), DN3 ($CD25^+CD44^-$) y DN4 ($CD25^-CD44^-$). Para el establecimiento de este programa de diferenciación se requiere, además de la señalización a través de Notch, la cooperación con determinados factores de transcripción, incluyendo Gata-3, c-Myc, Runx, T-cell factor (TCF)-1 y proteínas E [78-79]. Además, las células epiteliales tímicas activan otras señalizaciones importantes, como la ruta Wnt/ β -catenina y

secreción de determinadas citoquinas, como el factor de células madre ligada a c-kit , SCF, y la interleuquina (IL)-7, los cuales son críticos para mantener una correcta transición a través de las distintas etapas de diferenciación de la población DN [80-81]. La migración de las células DN a través de distintas zonas del timo puede promover cambios en las señales del microambiente que ayudan al programa de diferenciación.

El compromiso al linaje de los linfocitos T ocurre en el tránsito de los timocitos DN2 a DN3, y coincide con un pico de expresión de las proteínas RAG-1/2, las cuales activan una extensiva recombinación en tres de los loci de *Tcrs*: *Tcrb*, *Tcrd* y *Tcrg* [82-83]. En el caso de los loci *Tcrd* y *Tcrg*, se comienzan a detectar reordenamientos completos en timocitos DN2 y de forma completa en timocitos DN3. En el caso del locus *Tcrb*, los reordenamientos parciales D β J β ocurren en timocitos DN2 y los reordenamientos completos V β D β J β ocurren en timocitos DN3 [84-85]. En el estadio DN3, las células que hayan reordenando productivamente los loci *Tcrg* y *Tcrd* podrán llegar a diferenciar directamente, vía la población DN4, hacia el linaje de células T $\gamma\delta$, a través de un proceso de selección a través del TCR $\gamma\delta$, llamado selección- $\gamma\delta$ [86]. Aquellos timocitos DN3 que no hayan conseguido expresar un TCR $\gamma\delta$ pero que hayan tenido un reordenamiento productivo en el locus de *Tcrb* podrán diferenciarse hacia el linaje de células T $\alpha\beta$, a través de un proceso de selección mediada a través de la cadena TCR β y otras señalizaciones conjuntas, llamado selección- β . La selección- β determina la transición de timocitos DN3 a timocitos dobles positivos (DP) CD4⁺CD8⁺, vía una población inmadura simple positiva (ISP) CD8⁺ en ratón o CD4⁺ en humano [87-88]. La selección- β viene determinada por una señalización conjunta a través de un TCR inmaduro, denominado pre-TCR, constituido por una cadena TCR β y una cadena invariable denominada pre-T α (p-T α) [87, 89-90] el receptor de Notch y Wnt/ β -catenina, entre otras [91-92]. La señalización mediada por el pre-TCR provoca una proliferación muy activa, de forma que los timocitos DP constituyen aproximadamente el 85% de los timocitos totales, mientras que las otras señalizaciones cooperan con la del pre-TCR para la transición de timocitos DN3 a DP.

Los timocitos DN3 se subdividen en dos poblaciones, DN3a y DN3b. Los timocitos DN3a progresan a DN3b tras recibir una señalización a través de un pre-TCR o de un TCR $\gamma\delta$. Los timocitos DN3a y DN3b pueden distinguirse en función de la expresión de CD27 y/o CD28, siendo los timocitos DN3a CD27⁻CD28^{-/lo} y los timocitos

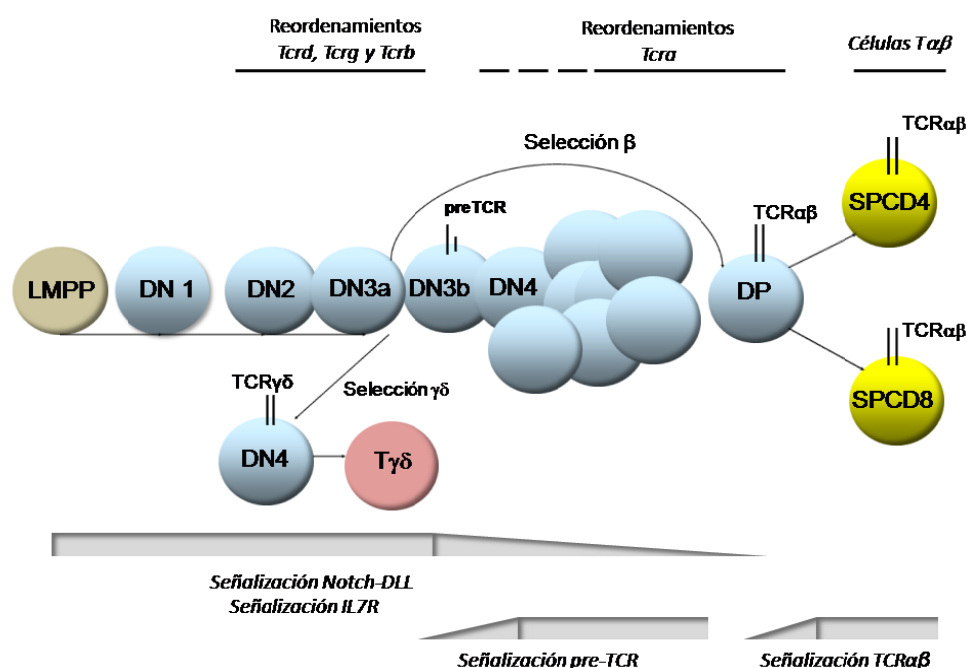


Figura 5. Etapas de desarrollo de los timocitos. Diagrama básico de la progresión de las distintas poblaciones tímicas: LMPPs, timocitos DN1-DN4, DP, SP CD4 y SP CD8. Se indica el orden temporal de los reordenamientos de los loci de *Tcr* a través de su detección en las distintas poblaciones tímicas. Se representan los procesos de selección-β y selección-γδ, para generación de células $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$, respectivamente. Las señalizaciones intracelulares implicadas en el desarrollo de los timocitos están indicadas; (la intensidad de las mismas se representa con los rectángulos-triángulos grises).

DN3b $CD27^+CD28^+$ [93-94]. Recientemente se han diferenciado seis poblaciones distintas dentro de la transición de DN3 a DP dependiendo de la expresión de CD28 y CD25, lo cual redefine el esquema de desarrollo durante la selección-β [95]. Así podríamos seguir un orden en el desarrollo que pasaría por una población DN3a ($CD25^+CD28^{-/lo}$) → DN3b ($CD25^+CD28^+$) → DN3c ($CD25^{int}CD28^+$) → DN4a ($CD25^-CD28^+$) → DP (yendo hacia el linaje de células $T\alpha\beta$), y dentro de DN4 encontramos DN4b ($CD25^-CD28^{hi}$) y DN4c ($CD25^-CD28^{-/lo}$), las cuales no tienen capacidad para diferenciar a DP, pero que podrían constituir los precursores de células $T\gamma\delta$ [86].

Los procesos de selección- β y selección- $\gamma\delta$ mediarían la determinación de linajes $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$ a través de un mecanismo dependiente del TCR que podría explicarse con un modelo recientemente propuesto basado en la diferente intensidad de señal mediada a través de los $TCR\gamma\delta$ y $TCR\alpha\beta$ [96-97]. Además de un mecanismo dependiente de la expresión del TCR, mecanismos independientes del TCR también parecen estar implicados en la decisión de linaje entre linfocitos $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$, como es la señalización mediada por Notch [98-99]. El mantenimiento de una fuerte señalización por Notch es importante para la maduración de los timocitos DN1 a DN3 [91, 100]. Coincidiendo con el proceso de selección- β , la señalización de Notch decae fuertemente, pero la señalización débil de Notch remanente es esencial, junto con la del pre-TCR, para la diferenciación de timocitos DN3 a DP [91] (Fig. 5). Después de la selección- β comienzan los reordenamientos $V\alpha J\alpha$ en el locus de *Tcra*, los cuales son iniciados en la población DN4 y ocurren extensivamente en el estadio DP [101-102], de forma concomitante con un nuevo aumento en la expresión de RAG-1/2, que dejó de expresarse durante los procesos de selección- β y $\gamma\delta$ [103]. Los reordenamientos $V\alpha J\alpha$ en el locus de *Tcra* comprometen irreversiblemente a las células hacia un linaje de linfocitos $T\alpha\beta$ ya que, debido a la organización del locus del *Tcrd* (Fig. 2), se produce la delección del locus de *Tcrd* [104]. Por tanto, los estudios sobre el control de la recombinación V(D)J durante el desarrollo en el locus del *Tcrd* son esenciales para entender los mecanismos moleculares implicados en la diferenciación de los linajes de linfocitos $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$. El locus reordenado del *Tcra* dará lugar a la proteína de la cadena $TCR\alpha$, que se ensamblará en la superficie con la cadena $TCR\beta$ con la que esa célula fue seleccionada, así como con las cadenas del invariables del CD3 (Σ , γ , δ) y ζ , formando finalmente el complejo del $TCR\alpha\beta$ en la población DP, que será objeto de señalización en los procesos de selección positiva y negativa para dar lugar a los timocitos SP CD4 y SP CD8, que migrarán a la periferia como linfocitos $T\alpha\beta$ maduros (Fig. 5).

3.3.- Señalización intracelular mediada por el pre-TCR

El ensamblaje del pre-TCR en la superficie celular, junto con los componentes del CD3, media una señalización independiente de ligando que promueve supervivencia celular, extensiva proliferación y diferenciación celular [105]. La cascada de señalización inducida a través del pre-TCR comienza por la activación de proteínas tirosina-quinasa (PTKs) de la familia de las Src, como las proteínas Lck

y Fyn, las cuales fosforilan diversas serinas del dominio intracelular del receptor, lo que a su vez promueve la unión y activación de otras PTKs, como SyK y ZAP70 [106-107]. Estas quinasas fosforilan los adaptadores SLP-76 y LAT, lo que llevará a la activación de PLC γ , que conducirá a la movilización de Ca $^{2+}$, a la activación de la proteína quinasa C (PKC) y a la activación de la ruta de señalización de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y de respuesta extracelular (ERKs), mediadas por Ras. Estas cascadas de señalización inducirán la activación de diversos factores de

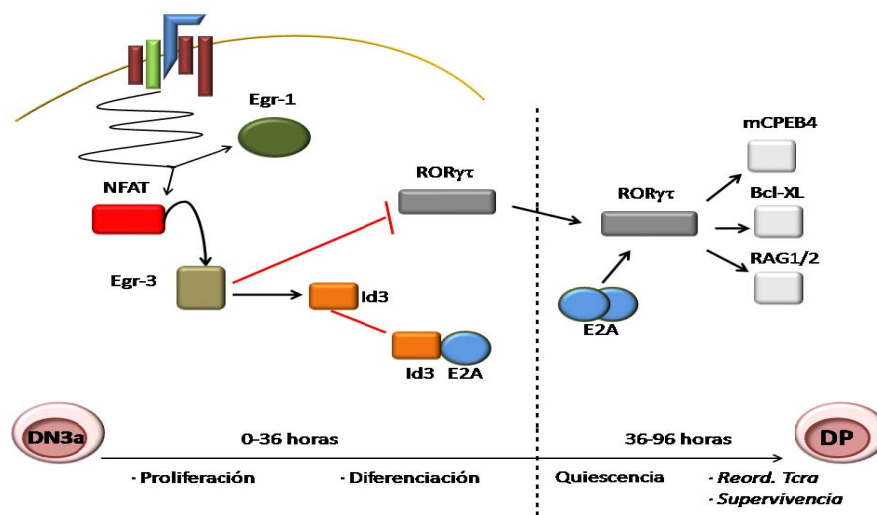


Figura 6. Regulación bi-fásica en respuesta a la señalización del pre-TCR. Se representan la cascada de factores inducidos durante la señalización por el pre-TCR. La señalización del pre-TCR desencadena dos fases diferenciables (separadas por una línea discontinua) que transcurren durante la diferenciación de timocitos DN3a a DP. Los factores de transcripción implicados en cada fase están indicados, así como su acción sobre otras proteínas: flechas negras (activación) y líneas rojas cortadas (represión). Los fenómenos de proliferación, diferenciación, quiescencia y supervivencia, coincidiendo con los reordenamientos del locus *Tcra*, están indicados.

transcripción necesarios para la progresión de la selección- β . La activación de la cascada de señalización del Ca $^{2+}$ activa la traslocación al núcleo de los factores nucleares de células T activadas (NFAT), así como, indirectamente, la activación de la transcripción de los factores tempranos de respuesta al crecimiento (Egr)-2/3. A su vez la activación de PKC induce la traslocación de los factores Rel/NF- κ B. La ruta de señalización de las Ras/MAPKs (ERKs, JNKs y p38) induce la transcripción del factor

Egr-1 y promueve la formación de complejos AP-1 por activación y fosforilación de los factores de la familia de Fos y Jun [108-113].

La señalización por el pre-TCR se divide en dos fases (Fig. 6) [112]: Una fase inicial de proliferación celular que coincide con la diferenciación de los timocitos DN3a a ISP, caracterizada por altos niveles de NFAT nucleares y de expresión de Egr-3 e Id3 (factor de transcripción inhibidor de la unión al ADN de proteínas E), concomitante con una disminución de la expresión de CD25, una represión de la expresión de la cadena p-T α y de las proteínas RAG-1/2, y la inducción de los transcritos germinales del locus del *Tcra*. En una segunda etapa se inhibe la proliferación, se induce la expresión de las proteínas RAG-1/2 y comienza el reordenamiento extensivo del locus del *Tcra*, para llegar a una población DP. Esta última fase se caracteriza por bajos niveles de Egr-3 e Id3, lo que conlleva a un aumento de la capacidad de las proteínas E de unirse al ADN y a la subsecuente inducción del factor de transcripción ROR γ t, el cual activa la expresión de *Rag2*, que promueve la recombinación del locus *Tcra*, la expresión del factor de elongación mCpeb4, que promueve la quiescencia, y la expresión de Bcl-XL, que promueve la supervivencia.

3.4.- Factores de transcripción activados durante la señalización por el pre-TCR

3.4.1.- Factores NFAT

Las proteínas NFAT fueron inicialmente identificadas como un complejo de proteínas de unión a la secuencia GGA del promotor del gen de IL-2 [114]. Posteriormente se han encontrado sitios de unión para proteínas NFAT en distintos elementos reguladores de múltiples genes de factores solubles inducibles en células inmunes [115].

Las proteínas NFAT son la principal diana de activación para la cascada de señalización del Ca²⁺ [115-116]. En células T en reposo, las proteínas NFAT se mantienen en el citoplasma altamente fosforiladas. Cuando las células son estimuladas a través del TCR, la activación de PLC γ media la liberación desde la membrana citoplasmática del segundo mensajero inositol 1-4-5 trifosfato, el cual al unirse a su receptor en la membrana del retículo endoplásmico induce la liberación de los reservorios de Ca²⁺, dando lugar a un incremento en los niveles del Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i), por depleción de estos reservorios intracelulares [117]. La disminución de la concentración de Ca²⁺ en el retículo endoplasmático dispara la

entrada de Ca^{2+} extracelular a través de canales citoplasmáticos denominados canales CRAC ("Ca²⁺ release-activated Ca²⁺") [117]. El $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se une a la proteína reguladora calmodulina activando a la serina/treonina fosfatasa calcineurina, la cual cataliza la desfosforilación de las proteínas NFAT. La desfosforilación de NFAT provoca un cambio conformacional en la proteína, por el cual se expone su señal de localización nuclear y se transloca al núcleo. NFAT nuclear se une a sus genes diana regulando positiva o negativamente la expresión génica.

La familia de proteínas NFAT consiste en cinco miembros: NFAT1 (también conocidos como NFATp o NFATc2), NFAT2 (también conocido como NFATc o NFATc1), NFAT3 (también conocido como NFATc4), NFAT4 (también conocido como NFATc3) y NFAT5 (también conocida como TonEBP) [115-116]. Todas son reguladas por la señalización del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ menos la proteína NFAT5, que se expresa en respuesta al estrés osmótico. Estas proteínas tienen varios dominios moderadamente conservados, la región homóloga de NFAT (NHR), el dominio de unión a ADN (DBD) y el dominio C-terminal. El dominio NHR contiene los sitios de fosforilación en serinas que mantienen la proteína en el citoplasma, el dominio de transactivación y el sitio de unión de la calcineurina. En el dominio DBD se encuentran los puntos de contacto con otras proteínas como c-Jun y c-Fos, con los que NFAT forma complejos cuaternarios del tipo NFAT-Jun-Fos-ADN [116, 118].

Las proteínas NFAT tienen distintos patrones transcripcionales dependiendo de los complejos proteicos con los que se ensamblan en el ADN, pudiendo actuar como homodímeros o heterodímeros con otros factores de transcripción [116, 118]. Por ejemplo, los complejos NFAT/AP-1 se forman con interacciones moleculares directas cooperando en la inducción de numerosos genes específicos de células T, como son los genes de las linfoquinas IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13; aunque también se ha demostrado que pueden cooperar funcionalmente en ausencia de interacción física, como ocurre en la regulación del gen de TNF- α [119-120]. Las proteínas NFAT también interactúan molecularmente con otros factores de transcripción regulando genes específicos de células T; así coopera con Egr-1/4 en el promotor del gen de TNF- α , con GATA-3 en el enhancer del gen de IL-4, y con el factor 2 de potenciación de miocitos (MEF2) en el promotor del gen *Nurr7*.

La importancia de estos factores transcripcionales durante la selección- β se ha demostrado mayoritariamente a través de la creación de ratones deficientes en

dichas proteínas. Los ratones NFAT1^{-/-} no tienen un defecto en el desarrollo de los timocitos [121-122], mientras que los ratones NFAT2^{-/-} tienen un bloqueo parcial de la diferenciación tímica del estadio DN3 a DP, probablemente debido a una deficiencia en la proliferación de los timocitos DN4 [123-124]. Los ratones NFAT4^{-/-} tienen un defecto en la selección positiva y parcial bloqueo en el estadio DN3a que puede ser recuperado por activación constitutiva de NFAT2 [125-126], lo que apoya la redundancia entre miembros de la familia de NFAT observada en la regulación y diferenciación de las células T [122-124, 127-129]. La inhibición de la diferenciación de timocitos DN3a a DP *in vitro* mediante la adición del inhibidor de la calcineurina ciclosporina A, CsA, apoya el papel crucial de estos factores en la selección-β [111, 113].

3.4.2.- Complejos AP-1

Los factores que forman los complejos AP-1 (Proteína de Activación-1) forman parte de la familia de proteínas con dominio bZIP (cremallera de leucina). Estos factores transcripcionales consisten generalmente en un heterodímero formado por un miembro de la familia Fos, la cual incluye c-Fos (el homólogo humano del oncogen retroviral v-Fos), FosB, Fra-1 y Fra-2, y un miembro de la familia Jun, que incluye c-Jun, JunB y JunD. Otros complejos AP-1 consisten en dímeros formados por dos proteínas Jun o una proteína Jun con otras proteínas expresadas ubicuamente, como factor de activación de la transcripción (ATF)/proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB). Los heterodímeros Jun-Fos se unen preferentemente a la secuencia consenso en respuesta al éster del forbol TPA, acetato de tetradecanoil-forbol, (TRE) (5'-TGA(C/G)TCA-3'), mientras los dímeros ATF(CREB)/Jun se unen con alta afinidad al elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE) (5'-TGACGTCA-3') [130-131]. Los complejos AP-1 además pueden actuar con otras proteínas no relacionadas estructuralmente como NFAT, proteínas de las familias Ets y Smad para regular promotores y enhancers de diferentes genes [132].

La regulación de AP-1 es compleja y ocurre a distintos niveles, comenzando por la propia composición de los dímeros: Las distintas combinaciones de homodímeros y heterodímeros que forman los complejos AP-1 determinan qué genes van a ser regulados por estos complejos [132-133]. Otro nivel de regulación depende de la expresión diferencial de los distintos componentes de los complejos AP-1, ya que

la formación de estos complejos depende de la síntesis *de novo* de las proteínas Jun y Fos. La señalización a través de las MAPKs activa las quinasas ERK, JNK y p38 que regulan la expresión de Fos y, a su vez, Fos y MEF2 regulan la transcripción de Jun. Estas quinasas, además de regular la transcripción de Jun y Fos, potencian su actividad transcripcional a través de la fosforilación del extremo N-terminal de Jun, incrementando su potencial de trans-activación y promoviendo la unión al ADN. Esta fosforilación resulta en un incremento de la capacidad de Jun para interactuar con los co-activadores p300/CBP, capaces de potenciar la activación transcripcional por su actividad HAT [134-135].

Las proteínas Fos y Jun tienen distintos patrones de expresión durante el desarrollo de las células T lo que genera versatilidad en la composición de los complejos AP-1 en las distintas etapas de desarrollo [136-137]. Se ha demostrado que la pérdida de c-Jun en etapas tempranas del desarrollo de las células T produce un bloqueo parcial en el estadio DN3a con un aumento en la generación de células T $\gamma\delta$ [138]. Posiblemente la formación de complejos ternarios entre factores NFAT y AP-1 sea necesaria para la correcta activación de genes durante la selección- β .

3.4.3.- Factores Egr

Las proteínas Egr constituyen una familia de cuatro proteínas denominadas Egr-1, Egr-2, Egr-3 y Egr-4, las cuales tienen una homología del 90% en su dominio de unión al ADN, formado por dedos de zinc del tipo Cys₂-His₂, lo que les proporciona la capacidad de unirse a una secuencia común rica en GC, (5'-GCGGGGCG-3'). La expresión de la proteína Egr-1 se induce por activación del TCR, así como por ésteres de forbol, como el acetato miristato de forbol (PMA) [139-141] con una cinética muy rápida en la cual la expresión se ve detectada tras una hora de estimulación. Las proteínas Egr-2 y Egr-3 en cambio se regulan por la señalización intracelular del Ca²⁺ a través de la ruta de calcineurina/NFAT [142-143] [140]. Las proteínas Egr colaboran con otros factores para regular la transcripción de diversos genes específicos de linfocitos. Se ha comprobado que proteínas Egr-1 y Ets regulan la transcripción del gen del receptor β de IL-2, y heterodímeros formados por NFAT2 y Egr-1/4 inducen citoquinas pro-inflamatorias como IL2 y TNF α [144-145].

Las proteínas de la familia Egr juegan un importante papel durante la selección- β . Se ha comprobado que Egr-1, Egr-2 y Egr-3 se inducen durante la señalización por el pre-TCR y la sobre-expresión de estas proteínas en timocitos de ratones DN3a, en ausencia de señalización a través del pre-TCR, permite la progresión de los timocitos DN3a CD8⁺ ISP [140, 146-147]. Además, la sobre-expresión de proteínas Egr en timocitos DN3a disminuye la expresión de proteínas RAG-1/2 y p-T α , e induce la transcripción germinal del *Tcra*, eventos que ocurren durante la primera etapa de selección- β [146]. Los timocitos de ratones deficientes en Egr-1 tienen un pequeño, pero significativo, bloqueo en selección positiva pero no tienen ningún defecto aparente en selección- β [148]. En cambio los timocitos de ratones deficientes en Egr-3 tienen un bloqueo parcial en DN3, debido a una reducción en la proliferación de los timocitos DN4 [149]. Los timocitos de ratones deficientes en Egr-1 y Egr-3 tienen una mayor atrofia tímica y un mayor bloqueo en la diferenciación que los observados en los ratones *Egr3*^{-/-}, lo que indica que existe una compensación entre las distintas proteínas Egr [150]. Aunque la sobre-expresión de Egr-1 en timocitos de ratones *Rag2*^{-/-} no capacita para la progresión de la diferenciación más allá de la etapa CD8⁺ ISP, la cooperación con NFAT2 permite su diferenciación hasta la etapa DP [113]. Estos resultados demuestran que existe una cooperatividad funcional entre los factores transcripcionales NFAT, Egr y AP-1 para orquestar una apropiada regulación de la expresión de genes necesarios para la correcta progresión de los timocitos DN3a hasta timocitos DP.

3.4.4.- Proteínas E

Las proteínas E tipo I son miembros de una familia muy conservada de factores denominados “basic helix-loop-helix” (bHLH), caracterizadas por tener un dominio de dimerización consistente en dos α -hélices anfipáticas separadas por un lazo y una región adyacente básica importantes para la unión al ADN. Estas proteínas se unen a las cajas E (CANNTG), originalmente identificadas en E μ y E κ . Se han identificado cuatro miembros de esta familia: E12 y E47 (codificadas por el gen *E2A*), HEB y E2-2, implicadas en la regulación de la expresión génica en distintos procesos de diferenciación. Además de las proteínas HLH de tipo I, existen las llamadas de tipo II, denominadas Id1-4, las cuales carecen del dominio básico esencial para unirse al ADN, y que dimerizan con las anteriores inhibiendo así su unión al ADN.

Entre las funciones diferenciales de las proteínas bHLH, las codificadas por el gen *E2A* son esenciales para el desarrollo de los linfocitos B ya que es el miembro fundamental de la familia de proteínas E expresado en este linaje celular [151-152]. En cambio, los timocitos expresan los cuatro componentes, los cuales tienen funciones redundantes entre sí, lo que explica que el bloqueo de su diferenciación no sea total por la deficiencia aislada de cada una de ellas. Sin embargo, parecen existir funciones diferenciadas para cada una de ellas. Las proteínas E2A parecen tener un papel importante en estadios tempranos del desarrollo y en una pérdida de accesibilidad en el locus *Tcrb*, determinada por análisis de los transcritos V β y acetilación de H3 [153], mientras que la proteína HEB tiene un papel importante en la transición entre timocitos DN3a a DP, ya que los ratones deficientes en HEB tienen una acumulación de timocitos ISP CD8⁺ [154-155]. El hecho adicional de que las proteínas bHLH hayan sido implicadas en la expresión génica de una serie de proteínas clave durante el desarrollo de los linfocitos T, como son las proteínas RAG-1/2, p-T α , CD4, GATA-3 y *Tcrb*, no es extraño que la expresión forzada de los factores Id bloquee el desarrollo de los timocitos [156-158]. El equilibrio natural entre Id3/proteínas E que ocurre durante la señalización por el pre-TCR (Xi, 2006), es fundamental para el establecimiento de las dos fases (proliferativa y en reposo) asociadas a la transición de timocitos DN3a a DP, a través de la regulación del factor de transcripción ROR γ t (Fig. 6).

4.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DEL LOCUS *Tcrad*

4.1. Regulación de la transcripción y recombinación V(D)J en los loci *Tcrd* y *Tcra* durante el desarrollo

El locus del *Tcrad* consiste en un locus combinado que contiene dos loci distintos: *Tcra* y *Tcrd*, cada uno con una regulación específica durante el desarrollo de los linfocitos. El locus *Tcrd* comienza a reordenarse y expresarse en la población DN2, estando sus reordenamientos completos y su expresión al máximo nivel en la población DN3, mientras que el locus del *Tcra* comienza a reordenar y a expresarse en la población DN4, detectándose los máximos niveles de expresión y recombinación en la población de timocitos DP [83, 86].

Como se ha mencionado en el apartado 2 de esta Introducción, el mecanismo molecular para el control diferencial de la accesibilidad de estos loci a las maquinarias de transcripción y recombinación V(D)J depende de la estructura de la cromatina en cada momento del desarrollo, la cual viene determinada por la acción de promotores y enhancers. En el caso del locus *Tcrad*, existen dos enhancers, un enhancer asociado al locus del *Tcra* ($E\alpha$) y un enhancer asociado al locus del *Tcrd* ($E\delta$). $E\alpha$ y $E\delta$ son responsables de los reordenamientos y expresión de los locis *Tcra* y *Tcrd*, respectivamente, como ha sido demostrado tanto en ratones deficientes de cada uno de estos enhancers [159-160], como en ratones transgénicos conteniendo construcciones reporteras de recombinación V(D)J [161-164]. Mediante estos últimos se comprobó que $E\delta$ está activo en los timocitos adultos DN3a y que comienza su activación en el día 14,5 del desarrollo fetal en ratones, mientras que $E\alpha$ está activo en timocitos adultos DN4/DP y comienza su activación el día 16.5 del desarrollo fetal en ratones [162, 164] lo cual coincide exactamente con la regulación de los loci endógenos durante el desarrollo [83, 86]. Más aún, $E\delta$ se inactiva en la transición de timocitos DN3a a DP [164] por tanto estos dos enhancers dirigen los reordenamientos génicos en el locus *Tcrad* como un interruptor funcional, ya que nunca están activados al mismo tiempo, con $E\delta$ activo en timocitos DN3a e inactivo en timocitos DP, y $E\alpha$ inactivo en timocitos DN3a y activo en timocitos DP [164].

En el locus de *Tcrad*, además de los enhancers, también existen numerosos promotores asociados a cada segmento génico $V\alpha$ y $V\delta$, $D\delta$, $J\delta$ y varios promotores intercalados entre los segmentos $J\alpha$. Estos promotores pueden dividirse en dos tipos: aquéllos cuya actividad es independiente de los enhancers (como son una gran mayoría de los promotores asociados a los segmentos génicos $V\alpha$, y los segmentos génicos $V\delta$ y $D\delta$), y aquéllos cuya actividad es dependiente de los enhancers (como son los segmentos génicos $V\alpha$ situados más 3' en el locus y todos los promotores asociados a los segmentos génicos $J\delta$ y $J\alpha$). La acción que ejercen estos promotores en la estructura de la cromatina, y por tanto en la recombinación V(D)J, es local como se ha observado en el análisis de ratones deficientes en algunos de estos promotores [66, 165].

Debido a la necesidad de recombinar tres segmentos génicos, el locus del *Tcrd* solo tiene una oportunidad por alelo de tener un reordenamiento $V\delta D\delta J\delta$ productivo (Fig. 3). Esto, unido a que el pool de células que pueden intentar estos

reordenamientos sea reducido (células DN2 y DN3a), hacen que las oportunidades para generar células $T\gamma\delta$ sean muy limitadas, explicando el bajo porcentaje de las mismas en periferia. Las posibilidades de generar células $T\alpha\beta$ son mucho mayores debido a 1) que sólo precisan ensamblar dos segmentos génicos ($V\alpha$ y $J\alpha$), 2) que el pool de células que pueden intentar estos reordenamientos es muy grande (células DP), y 3) que la regulación de sus reordenamientos permite la posibilidad de que ocurran varios reordenamientos $V\alpha J\alpha$ sucesivos a lo largo del desarrollo de los timocitos. Esto explica el alto porcentaje de células $T\alpha\beta$, comparado con el de células $T\gamma\delta$, que hay en periferia.

El *Tcra* tiene la propiedad intrínseca de poder intentar múltiples reordenamientos $V\alpha J\alpha$ a lo largo del desarrollo. Los reordenamientos $V\alpha J\alpha$ primarios son los primeros que ocurren durante el desarrollo e implican a los segmentos $V\alpha$ situados más 3' en el locus y a los segmentos $J\alpha$ situados más 5' en el locus. Estos reordenamientos dependen de la acción de los denominados promotores $J\alpha$ primarios: el promotor TEA (situado inmediatamente 5' del segmento génico $J\alpha 61$) y el promotor $J\alpha 49p$ (situado inmediatamente 5' del segmento génico $J\alpha 49$), y de $E\alpha$ [66, 159]. Después de intentar un reordenamiento primario por alelo de *Tcra* (este locus no sufre exclusión alélica), las células pueden intentar varios reordenamientos $V\alpha J\alpha$ secundarios, utilizando segmentos $V\alpha$ situados progresivamente más 5' y segmentos $J\alpha$ situados progresivamente más 3' en el locus. De esta forma se maximizan las posibilidades de obtener un reordenamiento productivo. El mecanismo molecular para esta regulación de reordenamientos sucesivos depende del acercamiento de los promotores $V\alpha$, a través de los sucesivos reordenamientos $V\alpha J\alpha$ primarios y secundarios, a un grupo de segmentos génicos $J\alpha$ situados inmediatamente 5' [166]. Así pues, la actividad de los promotores $V\alpha$ es responsable de la activación de los promotores $J\alpha$ secundarios. La acción restrictiva de los promotores $V\alpha$ de los reordenamientos secundarios en un grupo limitado de segmentos $J\alpha$ es importante, ya que si no habría una apertura generalizada de todo el cluster de segmentos $J\alpha$ al deletar los promotores primarios, como se observó en los ratones $TEA^{-/}J\alpha 49p^{-/}$ [66]. Actualmente no está claro si $E\alpha$ se requiere para la activación de los reordenamientos secundarios en el locus *Tcra*.

Estudios recientes han evidenciado que la adopción de conformaciones contraídas en el locus del *Tcrad* que coinciden con el orden de los reordenamientos que ocurren en los loci *Tcrd* y *Tcra* durante el desarrollo de los timocitos, y que, por tanto, parecen ser fundamentales para promover las interacciones entre segmentos génicos distantes durante la recombinación V(D)J [167]. En concreto, se ha observado que la porción 3' del locus *Tcrad* (que contiene el locus *Tcrd*, el cluster de segmentos génicos $J\alpha$ y la región $C\alpha$) está contraído en timocitos DN y DP, pero no en células B, lo que coincide con los procesos de reordenamiento que sufren estas regiones en ambas poblaciones de timocitos. De forma interesante, la porción 5' del locus *Tcrad* (que contiene los segmentos génicos $V\alpha$ y $V\delta$) está contraída en timocitos DN y descontraída en timocitos DP. La interpretación de estos datos es que la conformación totalmente contraída del locus presente en timocitos DN permite los reordenamientos del locus *Tcrd* involucrando todos los segmentos $V\delta$, mientras que la conformación 3'-contraída y 5'-descontraída del locus *Tcra* en timocitos DP favorece que primeramente ocurran los reordenamientos primarios utilizando los segmentos génicos $V\alpha$ situados más 3' en el locus. Esta conformación mantendría disponibles una gran proporción de segmentos $V\alpha$ distales para ser utilizados en subsecuentes rondas de recombinación.

4.2.- Enhancer del locus *Tcrd* ($E\delta$)

$E\delta$ está localizado entre el segmento génico $J\delta 3$ y la región $C\delta$ dentro del locus del *Tcrd* [168] (Fig. 2.1). Este enhancer controla tanto la transcripción, como la recombinación V(D)J de los segmentos génicos del locus *Tcrd* [101, 160, 163]. Mediante el análisis de líneas de ratones transgénicos con una construcción reportera de recombinación V(D)J consistente en un minilocus del *Tcrd* humano de 22 kb conteniendo los segmentos génicos $V\delta 1$, $V\delta 2$, $D\delta 3$, $J\delta 1$ y $J\delta 3$ y la región $C\delta$, se observó que los reordenamientos $V\delta D\delta J\delta$ ocurrían de forma dependiente de la presencia de $E\delta$ (situado en su localización natural entre el segmentos $J\delta 3$ y la región $C\delta$ en un fragmento de 10,5 kb), en cambio los reordenamientos $V\delta D\delta$ ocurrían de manera independiente del enhancer, por la acción de los promotores asociados a los segmentos $V\delta 1$, $V\delta 2$ y $D\delta 3$ [101, 163]. También se comprobó que el mecanismo molecular que tiene $E\delta$ para activar estos reordenamientos depende de su capacidad de modificar la estructura de cromatina, en concreto de acetilar las histonas H3 y H4

en su área de influencia, que abarca los promotores asociados a los segmentos génicos J δ 1 y J δ 3 del minilocus [43, 169].

Dentro del locus *Tcrd* endógeno, E δ puede influir en la accesibilidad de la cromatina a una distancia de 9,5 kb (D δ 2), e incluso 18 kb (D δ 1) en la zona 5', y hasta una distancia de 4 kb (V δ 5) en la zona 3', pero no ejerce su influencia sobre los promotores J α , incluyendo al promotor TEA situado a poca distancia del segmento génico V δ 5 [160] (Fig. 2.1). Se han dado varias posibles explicaciones para esta regulación específica del promotor V δ 5 por E δ , frente a la del promotor TEA. Una de ellas contemplaba que la razón para esta regulación podría estar relacionada con la mayor cercanía del promotor V δ 5 a E δ . Sin embargo, estudios recientes han revelado que ésta no es la razón para la regulación exclusiva del promotor V δ 5, frente a la del promotor TEA, por E δ , ya que la reposición del promotor TEA en lugar del promotor del segmento V δ 5 no provoca su activación por el enhancer [170]. También se identificó un elemento de bloqueo transcripcional entre V δ 5 y TEA en el locus *Tcrad* humano [171] pero su delección en el locus de ratón no afectó a la regulación de estos promotores [172]. La razón para la exclusiva regulación del promotor V δ 5 por E δ , podría estar relacionada con una incompatibilidad a nivel estructural o funcional entre los complejos multiprotéicos ensamblados en E δ y el promotor de TEA, o que su ensamblaje no coincida temporalmente durante el desarrollo de los timocitos.

E δ contiene siete regiones, denominadas elementos δ E1, δ E2, δ E3, δ E4, δ E5, δ E6 y δ E7, para la unión de proteínas según experimentos de footprinting in vitro en un fragmento de 380 pb [168]. El elemento δ E3 (30 pb) se considera el mínimo E δ enhancer por su capacidad de activar la transcripción de genes reporteros desde promotores dependientes de enhancer en experimentos de transfección transitoria de líneas celulares del linaje T [168]. [173]. Los demás elementos son inactivos por sí mismos, pero colaboran funcionalmente con δ E3 en la actividad transcripcional del enhancer [168]. E δ se regula por un drástico sinergismo funcional entre dos factores de transcripción, Runx y c-Myb, unidos de forma independiente a sitios adyacentes en el elemento δ E3 [174-176]. La mutación de los sitios de unión a Runx o c-Myb elimina totalmente la actividad del enhancer en experimentos de transfección transitoria, tanto en el contexto de δ E3, δ E3- δ E4, δ E1- δ E7 o un fragmento mayor (1.4 kb) incluyendo δ E1- δ E7 y una región 5' de 1 kb conteniendo una región de unión a matriz nuclear (MAR) [174-178]. Estos datos indican que ambos factores forman una plataforma para

el reclutamiento de un co-activador transcripcional [174]. c-Myb y Runx tienen aparentemente distintas funciones dentro del E δ : Runx parece tener un papel estructural, generando cambios en la conformación del enhancer que facilitan el acceso de c-Myb a δ E3 y GATA-3 a δ E4, mientras que c-Myb tiene un papel fundamental en la función del enhancer [179].

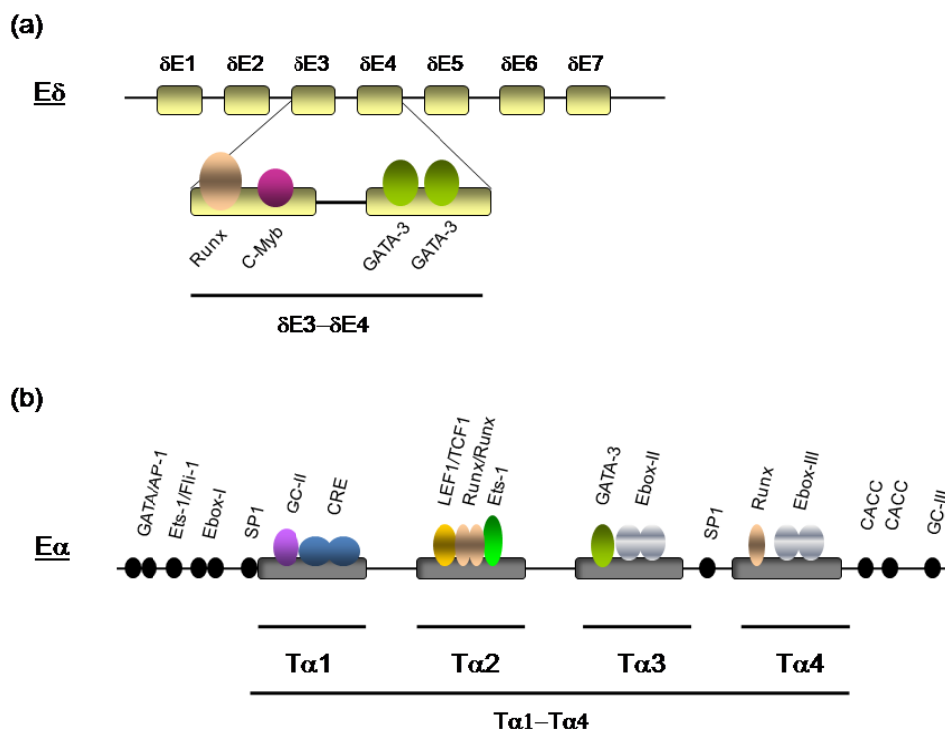


Figura 7. Estructura de E δ y E α . Diagrama indicativo de los sitios de unión y factores de transcripción descritos que en E δ y E α . El mínimo E δ está constituido por el elemento δ E3, y el mínimo E α está constituido por los elementos T α 1-T α 2. También se representan los elementos δ E4 y T α 3-T α 4, que colaboran funcionalmente con δ E3 y T α 1-T α 2, respectivamente.

Estos sitios son también esenciales para la actividad recombinacional de E δ como se comprobó en experimentos de análisis de recombinación V(D)J en la construcción reportera del minilocus del *Tcrd* humano dirigida por versiones mutadas de E δ en líneas de ratones transgénicos [177, 180]. Como se ha mencionado antes, E δ se encuentra en esta construcción en un fragmento de 10,5 kb (J δ 3-E δ -C δ),

conteniendo por tanto las zonas flanqueantes del enhancer. $E\delta$ se encuentra en su localización natural flanqueado por dos MARs, una situada 5' de $E\delta$ y otra situada 3' de $E\delta$ [178]. Las MARs asociadas a $E\delta$ son necesarias para que el enhancer sea capaz de activar la recombinación de la construcción reportera cuando ésta se encuentra en una sola copia [178]. El fragmento $\delta E3$ - $\delta E4$ es insuficiente para la activación de la construcción reportera de recombinación [181]. Estos datos indican que el elemento $\delta E3$ ha de colaborar funcionalmente con el resto de los elementos del enhancer y las MARs para la activación de la recombinación V(D)J en el locus de *Tcrd*.

Como se ha mencionado anteriormente, $E\delta$ está activo en la población DN3, inactivándose en la transición de DN3 a DP por una combinación entre la delección de $E\delta$ del genoma tras la escisión del locus del *Tcrd* que ocurre tras los reordenamientos $V\alpha J\alpha$ y por un desensamblaje del enhanceosoma [101]. El mecanismo molecular que conduce al desensamblaje e inactivación del enhanceosoma de $E\delta$ se desconoce.

4.3.- Enhancer del locus *Tcra* ($E\alpha$)

$E\alpha$ es un potente enhancer transcripcional localizado a 4 kb de la región $C\alpha$ hacia el extremo 3' del locus [182-183]. La eliminación de $E\alpha$ endógeno provoca un bloqueo casi completo de la recombinación $V\alpha J\alpha$, y por tanto una drástica inhibición en la generación de células $T\alpha\beta$, y una importante inhibición de la transcripción del locus *Tcrd* en células $T\gamma\delta$ [159]. Al igual que el $E\delta$, $E\alpha$ es capaz de activar las construcciones reporteras de recombinación V(D)J en ratones transgénicos, así como de activar su transcripción [101, 161-162]. El área de influencia de $E\alpha$ en el locus del *Tcrad* es enorme, llegando hasta 525 kb hacia la zona 5' del locus, incluyendo todo el cluster de segmentos génicos $J\alpha$ (razón de la inhibición de la recombinación $V\alpha J\alpha$ en ratones $E\alpha^{-/-}$), todo el locus *Tcrd* (razón de su influencia en la regulación de la expresión génica del locus *Tcrd* en células $T\gamma\delta$ en ratones $E\alpha^{-/-}$), y el 1/3 de segmentos génicos $V\alpha$ situados más 3' en el locus del *Tcrad* [60]. La accesibilidad de la cromatina regulada por $E\alpha$ se lleva a cabo a través de cambios de conformación de la cromatina mediante modificaciones moleculares, principalmente por acetilación de las histonas H3 y H4, mono, di y tri-metilación H3K4, y trimetilación de H3K36, que generan la descompactación de la cromatina [27, 60, 66, 169, 184].

$E\alpha$ controla la recombinación V(D)J del locus mediante el control de la transcripción germinal originada en los segmentos génicos $J\alpha$, y que preceden a la recombinación V(D)J [27]. Esta transcripción germinal es necesaria para la iniciación de la recombinación V(D)J, como se demostró mediante la introducción de una secuencia de terminación de la transcripción 3' del segmento génico $J\alpha 56$, impidiendo así la elongación transcripcional y la recombinación $V\alpha J\alpha$ de los segmentos $J\alpha$ cuya transcripción había sido inhibida [27]. La influencia sobre la estructura de la cromatina que ejercen los promotores $J\alpha$, y en general todos los promotores, es local, a diferencia de la influencia que ejercen los enhancers que es a nivel distal [66]. Así, cada promotor $J\alpha$ regula el reordenamiento génico de una serie de segmentos $J\alpha$ localizados inmediatamente 3' del promotor.

$E\alpha$ está formado por cuatro regiones, denominadas elementos $T\alpha 1$, $T\alpha 2$, $T\alpha 3$ y $T\alpha 4$, para la unión de proteínas, según experimentos de footprinting en vitro [182] (Fig. 7). El mínimo $E\alpha$, $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$, es un fragmento de 116 pb capaz de activar la transcripción de construcciones reporteras en experimentos de transfección transitoria y de activar la construcción reportera de recombinación V(D)J en ratones transgénicos [181, 185]. Sin embargo, la activación de la recombinación V(D)J dirigida por $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ ocurre de una forma prematura, en timocitos DN3, necesitando la colaboración funcional de $T\alpha 3$ - $T\alpha 4$, en un fragmento de 245 pb, para la correcta activación del enhancer durante el desarrollo [181, 186] Además, $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ es incapaz por sí solo de activar la recombinación $V\alpha J\alpha$ en el locus *Tcrad* endógeno [187], lo cual sugiere que la colaboración funcional entre $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ y $T\alpha 3$ - $T\alpha 4$ pueda extenderse a la capacidad del enhancer de activar la recombinación $V\alpha J\alpha$ a largas distancias.

$T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ contiene sitios críticos de unión de factores ATF/CREB, TCF-1/ factor de unión a enhancer de linfocitos (LEF-1), Runx y proteínas de la familia Ets [186, 188-195]. En experimentos de footprinting genómico se han identificado además otros sitios fuera de $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ para factores de la familia Ets, Ikaros y una caja GC en regiones inmediatamente 5' de $T\alpha 1$, un sitio de unión para GATA-3 y una caja E en $T\alpha 3$, una caja GC situada entre $T\alpha 3$ y $T\alpha 4$, y un sitio de unión para Runx y otra caja E en $T\alpha 4$ [101, 196].

Los sitios de unión de los factores que se unen a $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ son esenciales para la actividad transcripcional y recombinacional del enhancer [181, 188, 197]. Los

factores que se unen a $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ forman una estructura multiprotéica muy compacta, o enhanceosoma, creado por las interacciones estereoespecíficas entre las proteínas de unión al enhancer, tanto activadores como co-activadores transcripcionales, tanto *in vitro* como *in vivo* [188, 198]. Está aceptado que proteínas estructurales con dominios HMG, como es el caso de los factores TCF-1 y LEF-1 en $T\alpha 2$, por su capacidad de inducen flexiones de hasta 130° en el ADN, tengan un papel organizador en la estructura de los enhancers promoviendo la interacción entre las proteínas unidas 5' y 3' de la flexión, que en el caso de $E\alpha$ son los factores ATF/CREB unidos a $T\alpha 1$ y Ets-1 unido a $T\alpha 2$ [188]. Los factores TCF-1 y LEF-1 se unen con baja afinidad al surco menor del ADN y necesitan la cooperación con otros factores transcripcionales para su unión estable al ADN y para la activación de sus genes diana [188, 199-200]. Además, los factores Runx y Ets-1 se unen a $T\alpha 2$ de forma cooperativa, y favorecido por la unión de TCF-1/LEF-1 [188, 192, 201]. La unión de las proteínas de unión al ADN en $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ recluta a su vez otras proteínas co-activadoras, a través de interacciones proteína-proteína, para establecer contactos adicionales entre las proteínas que forman parte del enhanceosoma, como es el caso del co-activador ALY [202]. Experimentos de footprinting genómico en timocitos de ratones transgénicos conteniendo el minilocus del *Tcrd* dirigido por $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ con mutaciones en los sitios de unión a TCF-1/LEF-1 o Ets-1 demostraron los factores TCF-1/LEF-1 no tienen un papel en la jerarquía del ensamblaje del enhanceosoma de $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ *in vivo*, ya que la formación del complejo multiprotéico es altamente cooperativo, sin que ningún factor concreto tenga un papel único en la iniciación del ensamblaje del complejo [198]. De hecho, todas las proteínas de unión a $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ han de estar *in vivo* simultáneamente disponibles para acceder a la cromatina del enhancer y formar un enhanceosoma estable funcionalmente activo, tanto para la transcripción como la recombinación V(D)J. Aunque los factores TCF-1 y LEF-1 suelen estar regulados a través de la señalización Wnt, a través de la acumulación de β -catenina en el citoplasma que se trasloca al núcleo actuando como un co-activador transcripcional, también parecen ser regulados mediante mecanismos independientes como parece ser el caso de $E\alpha$ [203].

Como se ha mencionado anteriormente, la actividad de $E\alpha$ está regulada dinámicamente durante el desarrollo durante la transición de timocitos DN3a a DP. Varios estudios se han realizado para intentar abordar la dilucidación del mecanismo de activación de $E\alpha$ durante el desarrollo. Experimentos de footprinting genómico,

utilizando DNasa I, para ver cambios conformacionales de la estructura de cromatina, y dimetilsulfato, para evidenciar los contactos ADN-proteína, han establecido que hay un cambio conformacional concomitante con la diferenciación de timocitos DN3a a DP, tanto a nivel global como específico de determinados sitios de unión, pero en ausencia de cambios detectables en los contactos ADN/proteína detectados [101, 186, 196]. Así pues, aunque grandes esfuerzos se han realizado en la identificación de varias de las proteínas críticas de unión al enhancer en vivo, el mecanismo molecular implicado en la activación de E α durante el tránsito de timocitos DN3 a DP aún no se conoce.

IV. Objetivos

OBJETIVOS

Con el propósito de entender el mecanismo molecular de activación de $E\alpha$ durante la maduración de los linfocitos $T\alpha\beta$, se especifican los siguientes objetivos concretos:

- 1.- Identificación de los factores de transcripción y co-activadores que forman parte del enhanceosoma $E\alpha$ en vivo en timocitos de ratón, mediante las técnicas de ChIP y *footprinting* genómico.
- 2.- Creación de un enhancer quimérico $E\alpha/E\delta$ con el fin de testar el efecto de la destrucción de la estructura del enhanceosoma $E\alpha$ en su actividad transcripcional y recombinacional en vivo.
- 3.- Estudio de los requerimientos de la señalización intracelular mediada por el pre-TCR en la activación de $E\alpha$, mediante el análisis de la transcripción germinacional dependiente de $E\alpha$ e iniciada en los promotores primarios TEA y $J\alpha49p$ en el locus *Tcra* endógeno.
- 4.- Caracterización del enhanceosoma de $E\alpha$ en vivo durante su activación, mediada por la señalización a través del pre-TCR.
- 5.- Estudio de la actividad de $E\alpha$ durante la maduración de los linfocitos $T\alpha\beta$.

V. Resultados

***A. La composición e interacciones
estereoespecíficas entre complejos
nucleoproteicos ensamblados en
E α son flexibles***

RESUMEN

Durante la maduración de los timocitos, $E\delta$ y $E\alpha$ funcionan juntos, como un interruptor funcional, controlando la transición de la actividad entre el locus *Tcrd* y el locus *Tcra*, dentro del locus combinado *Tcrad*. Experimentos previos revelaron que un fragmento de $E\alpha$, $T\alpha1$ - $T\alpha2$, el cual constituye una estructura de nucleoproteínas muy compacta bien caracterizada, dirige una recombinación V(D)J prematura comparada con la observada con la dirigida por $E\alpha$ completo o por la región $T\alpha1$ - $T\alpha4$. Estos experimentos establecieron que existe una colaboración funcional entre las proteínas unidas a $T\alpha1$ - $T\alpha2$ y a $T\alpha3$ - $T\alpha4$ para la correcta regulación de los reordenamientos del locus *Tcra* durante el desarrollo. Los sitios TCF/LEF y ets intactos se requieren para la formación del enhanceosoma $T\alpha1$ - $T\alpha2$. Nosotros hemos creado una versión mutada de $E\alpha$, $E\alpha$ MC, en la cual los sitios runx y ets de $T\alpha2$ se han sustituido por los sitios runx y myb de $E\delta$, lo cual argumenta en contra de la idea del requerimiento de una estructura estricta del enhanceosoma $E\alpha$ para su función. En contra de lo esperado, $E\alpha$ MC resultó ser un enhancer muy potente, indicando que las interacciones estereoespecíficas entre las proteínas que forman el enhanceosoma $E\alpha$ son muy flexibles. La activación de la recombinación V(D)J dirigida por $E\alpha$ MC durante el desarrollo de los timocitos resultó, sin embargo, prematura e indistinguible de la dirigida por $T\alpha1$ - $T\alpha2$. Estos resultados indican que las proteínas unidas a $T\alpha3$ - $T\alpha4$, por sí mismas, son insuficientes para controlar la prematura activación de un enhancer quimérico temprano, como es $E\alpha$ MC, necesitándose una cooperación funcional entre las proteínas unidas a los sitios runx/ets de $T\alpha2$ y las proteínas unidas a $T\alpha3$ - $T\alpha4$ para la correcta activación de $E\alpha$ durante el desarrollo. La posibilidad del ensamblaje de distintos grupos de proteínas en $E\alpha$ puede representar una forma más flexible de procesamiento de la información para la regulación del locus *Tcra* durante el desarrollo de los timocitos.

Flexible Stereospecific Interactions and Composition within Nucleoprotein Complexes Assembled on the TCR α Gene Enhancer¹

Beatriz del Blanco,^{2*} Joseph L. Roberts,^{2,3†} Noelia Zamarreño,^{4,5*} Nadège Balmelle-Devaux,^{5,6*} and Cristina Hernández-Munain^{7*}

During thymocyte maturation, enhancers of genes encoding for TCR δ (*Tcrd*) and TCR α (*Tcra*), E δ ⁸, and E α , work as a developmental switch controlling transition from *Tcrd* to *Tcra* activity at the *Tcrad* locus. Previous experiments revealed that an E α fragment, T α 1-T α 2, which constitutes a well-characterized compact nucleoprotein structure led to premature activation of V(D)J recombination compared with that observed for the entire E α or T α 1-T α 4. These experiments indicated that T α 3-T α 4 collaborates with factors bound to T α 1-T α 2 for the strict developmental regulation of *Tcra* rearrangement. The compact enhanceosome created on T α 1-T α 2 explained the molecular basis for requirement of intact T α 2 TCF/LEF and ets sites for enhancer function. We have created a mutant version of E α , E α MC, in which E δ myb and runx sites have been substituted for T α 2 runx and ets sites, that argues against the notion of a requirement for strict E α enhanceosome structure for function. E α MC resulted in a very potent enhancer indicating that stereospecific interactions among proteins that form an E α enhanceosome are rather flexible. Activation of V(D)J recombination by E α MC during thymocyte development resulted, however, to be premature and indistinguishable from that of T α 1-T α 2. These results indicate that T α 3-T α 4 itself is not sufficient to impart a developmental delay to a chimeric “early” enhancer, and indicate the need for functional collaboration between T α 2 runx/ets sites binding proteins and proteins bound to T α 3-T α 4 for proper developmental activation. The possibility of assembly of distinct sets of proteins on E α might represent a more flexible form of information processing during thymocyte development. *The Journal of Immunology*, 2009, 183: 1871–1883.

The generation of T lymphocytes requires a precise orchestration of TCR loci (*Tcr*) assembly in the context of a highly ordered program of cellular differentiation (1–3) (Fig. 1A). The most immature thymocytes are known as double-negative (DN)⁸ thymocytes based in their no expression of CD4 and CD8. Four different DN subpopulations can be distinguished:

DN1 (CD25⁻CD44⁺), DN2 (CD25⁺CD44⁺), DN3 (CD25⁺CD44⁻), and DN4 (CD25⁻CD44⁻), based on the expression of the surface markers CD25 and CD44 (4, 5). *Tcrd* becomes transcriptionally active at late DN1 thymocytes (6, 7). Initial completed rearrangements at *Tcrg* and *Tcrd* are detected in DN2 thymocytes, whereas extensive rearrangement at these loci and active rearrangements at *Tcrb* are detected in DN3 thymocytes (8–12). DN3 thymocytes that successfully rearrange their *Tcrg* and *Tcrd* express a $\gamma\delta$ TCR and normally differentiate along the $\gamma\delta$ T cell pathway via the DN4 stage (7, 13). This is a consequence of intracellular signaling directed by expression of a $\gamma\delta$ TCR at DN3 cells, in a process known as $\gamma\delta$ -selection (7). DN3 thymocytes that have not rearranged their *Tcrg* or *Tcrd* in frame, but have successfully rearranged *Tcrb*, normally differentiate along the $\alpha\beta$ T cell pathway via the DN4 and double positive (DP) CD4⁺CD8⁺ stages, in a process known as β -selection (13). This is a consequence of intracellular signaling directed by expression of a pre-TCR and by Notch at DN3 thymocytes (14). Locus accessibility and induction of *Tcra* transcription and recombination depends on pre-TCR signaling at DN3 thymocytes, but not on Notch signaling (14). Pre-TCR signals are induced in two phases, one phase of rapid proliferation and a nonproliferative phase that it is compatible with activation of gene rearrangement at *Tcra* (15). At DN4 thymocytes rearrangements at *Tcra* are first detected, and occur extensively at the DP stage,

*Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Armilla (Granada), Spain; and †Department of Immunology, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710

Received for publication October 7, 2008. Accepted for publication May 27, 2009.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation Grant BFU2008-01651 and a grant from the Fundación Mútua Madrileña de Investigación Médica.

² B.d.B. and J.L.R. contributed equally to this work.

³ Current address: Department of Pediatrics, Division of Allergy/Immunology, Duke University Medical Center, Durham, NC 27710.

⁴ Current address: Department of Molecular and Cellular Biology, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

⁵ N.Z. and N.B.-D. contributed equally to this work.

⁶ Current address: Department of Biology, University of Konstanz, Konstanz, Germany.

⁷ Address correspondence and reprint requests to Dr. Cristina Hernández-Munain, Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Armilla, (Granada), Spain. E-mail address: chmunain@ipb.csic.es

⁸ Abbreviations used in this paper: DN, double negative; DP, double positive; E α , *Tcra* locus enhancer; E δ , *Tcrd* locus enhancer; ATF, activation transcription factor; TCF-1, T cell factor-1; LEF-1, lymphocyte enhancer-binding factor-1; ChIP, chromatin immunoprecipitation; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; CREB, cAMP

response element binding protein; CBP, CREB-binding protein; DMS, dimethylsulfoxide; HAT, histone acetyltransferase; HDAC, histone deacetylase; R, RAG-1^{-/-}; Rx β , RAG-2^{-/-} \times TCR β ; RT, room temperature; HEB, HeLa E-box binding protein.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

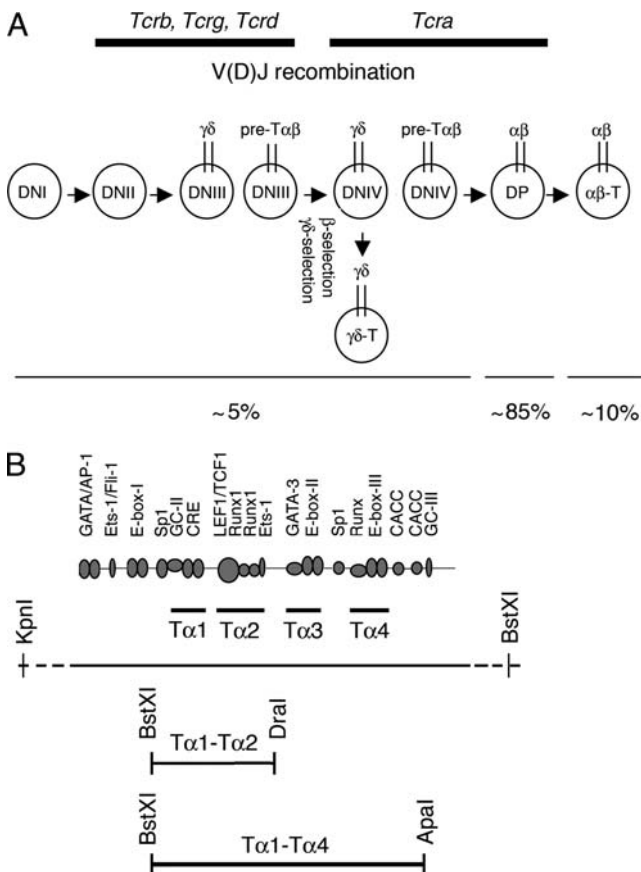


FIGURE 1. Thymocyte maturation and E α structure. *A*, A schematic diagram of thymocyte development depicts the various developmental stages, pre-TCR and TCR expression, and periods of *Tcr* recombination. The percentage of thymocytes in each population is indicated. *B*, The diagram depicts the binding sites and described transcription factors that could occupy them at human E α , the locations of the defined T α 1 to T α 4 protein binding regions, and the T α 1-T α 2 and T α 1-T α 4 enhancer fragments.

coincidentally with the second phase of pre-TCR signaling (4, 11, 15–18).

The *Tcrad* locus has an unique genomic structure, which includes both *Tcra* and *Tcrd*, that determines *Tcrd* to be deleted from the chromosome upon $V\alpha$ to $J\alpha$ recombination at the DP stage (19). This process irreversibly commits DP thymocytes to the $\alpha\beta$ -T cell lineage. Hence, developmental ordering of *Tcrd* and *Tcra* rearrangements is a critical component of $\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$ T cell lineage commitment. The orchestration of the distinct developmental programs for V(D)J recombination and transcription of *Tcra* and *Tcrd* is controlled by the activity of two enhancers present at the *Tcrad* locus, the *Tcra* enhancer (E α), and the *Tcrd* enhancer (E δ) (18, 20–24). E α is positioned downstream of C α , while E δ is situated upstream of C δ , between the $V\alpha$ and $J\alpha$ clusters (25). E α and E δ work as a “developmental switch” with E α “off” and E δ “on” at the DN stages, and E α “on” and E δ “off” at the DP stage during thymocyte development (18, 25). These transcriptional enhancers are critical regulators of rearrangement and gene expression of *Tcrad* locus through promoters located at considerable distances by promoting developmental stage specific changes in chromatin structure (2, 22, 23, 26–28). Germline deletion of E α results in severe reduction of germline $J\alpha$ and $V\alpha$ transcription and $V\alpha J\alpha$ rearrangement at *Tcra*, but it does not alter *Tcrd* recombination and attenuates transcription of rearranged *Tcrd* (22, 27). In contrast, elimination of E δ severely impairs re-

combination at *Tcrd*, without affecting transcription and recombination at *Tcra* (23). Locus control by E α and E δ cannot be explained simply by enhancer genomic location because replacement of E α with E δ in knock-in experiments failed to restore recombination (29). At present, the molecular mechanisms by which E α and E δ function are regulated during T cell development are unknown.

E δ is regulated by critical functional collaboration between c-Myb and Runx factors bound mostly independently to a 30-bp element, denoted as δ E3 (30–34). However, E α activity is controlled by drastic functional synergy and cooperative binding among several transcription factors to a 116-bp enhancer fragment, denoted as T α 1-T α 2, creating a compact and functional nucleoprotein structure known as enhanceosome (35–39). Proteins that are thought form a functional T α 1-T α 2 enhanceosome include activation transcription factor (ATF)/cAMP response element binding protein (CREB), T cell factor-1 (TCF-1)/lymphocyte enhancer-binding factor-1 (LEF-1), Runx1, and Ets-1 (38–45). The high level of structural organization among T α 1-T α 2 binding proteins is thought to ensure the high level functional cooperativity of the various enhanceosome components (36–39). In vivo studies of T α 1-T α 2 occupancy revealed that TCF-1/LEF-1 factors must bind to DNA in conjunction with ets site binding factors for enhancer function, being both intact T α 2 TCF/LEF and ets sites required for enhanceosome assembly and function (36, 37). These results confirmed that T α 1-T α 2 constitutes a true enhanceosome because factor binding at T α 2 occurs in a strict cooperative fashion and no single T α 1-T α 2 binding factor can access chromatin to play a unique initiating role in its assembly (36). Hence, simultaneous availability of multiple enhancer binding proteins is required for chromatin disruption and stable binding site occupancy at E α , as well as the activation of transcription and V(D)J recombination.

We have now created a mutant version of 1.4-kb E α , E α MC, enhanceosome, in which E δ myb and runx binding sites have been substituted for T α 2 runx and ets binding sites, which argues against the notion of a requirement for a very strict E α enhanceosome structure for function. Transcriptional activity of E α MC was very potent and stronger to that of intact E α in transient transfection experiments. These results indicate that the stereospecific interactions among proteins that form an E α enhanceosome are rather flexible because we have created a new functional enhanceosome by substituting a critical site for other transcription factor binding site (ets site for myb site) and modifying the position of the runx binding site within the enhancer. Analysis of E α MC mouse thymocyte populations revealed a premature onset of minilocus V(D)J recombination during thymocyte development that was indistinguishable from that of T α 1-T α 2 (37, 46). Previous experiments demonstrated that a 275-bp enhancer fragment, including the T α 1-T α 4 elements, contains all the binding sites required for the correct developmental activation of E α (46), indicating that protein binding to T α 3-T α 4 is critical to holding in check the potential for premature activation of V(D)J recombination by T α 1-T α 2. Our results show that T α 3-T α 4 cannot enforce a developmental delay to a chimeric “early” enhancer, T α 1-T α 2MC, indicating the need for a specific collaboration between T α 2 runx/ets sites binding proteins and proteins bound to T α 3-T α 4 for proper developmental activation of the enhancer in vivo.

Materials and Methods

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP was conducted with modifications of the protocol outlined in Upstate Biotechnology ChIP Assay Kit. Mouse total thymocytes were centrifuged, washed, and resuspended in cold PBS at 10^7 cells/ml. Cells were cross-linked by adding formaldehyde to 1% (w/v) and incubated for 10 min at

room temperature (RT). The reaction was stopped by adding glycine to 0.125 M and incubated for 5 min at RT. Cells were washed twice in PBS. Cells (5×10^7) were resuspended in 500 μ l of 1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.1), and a mixture of protease inhibitors (Roche), and incubated for 10 min on ice. Cell suspension was sonicated using a Branson sonicator at 55% of duty cycle alternating 30 s on and 1–2 min off for 10 cycles while the sample was immersed in an ice/water bath. Chromosomal DNA was reduced to an average size of around 200–500 bp as determined by agarose gel analysis. Lysate was then centrifuged for 1 h at $13000 \times g$ at 4°C, and supernatant diluted 10-fold by adding 4.5 ml of 0.01% SDS, 1.1% (v/v) Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl (pH 8.1), 167 mM NaCl and a mixture of protease inhibitors. One percent of starting material (50 μ l) was saved as input for PCR detection. Chromatin was precleared by incubation for 2–3 h at 4°C with 20 μ l of BSA 50 mg/ml, 75 μ g of salmon sperm DNA, 25 μ g of isotype-match control Ab, and 150 μ l of 50% salmon sperm DNA/protein A-agarose slurry (Upstate Biotechnology). Lysate was centrifuged to eliminate beads with control Ab and unspecific DNA. Precleared chromatin corresponding to $4\text{--}5 \times 10^6$ thymocytes ($\sim 400\text{--}500 \mu$ l) was used for immunoprecipitation by incubating for 16 h at 4°C with 10 μ g of specific or isotype-matched control Abs, followed by 70 μ l of protein A-agarose slurry for an additional 1 h incubation at 4°C. Immunoprecipitates were washed by rocking for 5 min at RT once each with the following ice-cold buffers (containing protease inhibitors): 1) 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 170 mM NaCl; 2) 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl; 3) 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholic acid, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM LiCl; and twice with 4) 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA. DNA/Protein/Ab complexes were eluted from protein A-agarose by rocking twice for 15 min at RT in 250 μ l of 50 mM NaHCO₃, 1% SDS. After reversal of cross-links and deproteination, purified DNA from input and bound fractions were resuspended in 50 μ l of water. Presence of *E α* and *Oct2* sequences in the bound and input fractions was assessed by PCR using primers previously described (26). Radioactive PCRs were conducted by incorporation of [³²P]-dCTP to the PCR products, using as templates 2 μ l of 1/10 diluted input DNA (equivalent to 0.004% of the taken input that corresponds to 0.0004% of the starting material used at each immunoprecipitation) or 2 μ l of Ab-bound DNA (equivalent to 4% of total Ab-bound material). PCR conditions were: 5 min at 95°C, followed by 35 cycles of 25 s at 95°C, 25 s at 60°C, 30 s at 72°C, and a final extension step of 2 min at 72°C. PCR products were resolved by 8% PAGE.

Genomic footprinting

Genomic footprinting was performed as previously described (18). RAG-2^{-/-}, RAG-2^{-/-} \times TCR β , HEB^{-/-}Id3^{-/-}, and HEB^{-/-}Id3^{-/-} mice were previously described (47–52). RAG-2^{-/-} and RAG-2^{-/-} \times TCR β were obtained from Taconic Farms. Oligonucleotides for human 1.4-kb *E α* and *E α MC* top strand analysis in transgenic thymocytes were CTTAATCAGGTGAGATCAAGGTCTGAT, TCTGATCTTGGCTGGTTTG GAGG, and GATCTTGGCTGGTTTGGAGGGGCGAG. Those for human 1.4-kb *E α* and *E α MC* bottom strand analysis were GCAATTAATAAAA CAGGTCAGACATTGAG, AAGTCTCCCACTCCCTCCAGGTGT, and CTCCCACTCCCTCCAGGTGTTTGGG.

Transgenic mice

E α MC minilocus: A cassette containing the myb and runx binding sites of δ E3 were substituted for the runx and ets binding sites of *T α 2*. For this purpose, PCR overlap extension (35) was performed using as template a 1.4-kb *E α* (*KpnI*-*Bam*HI fragment) inserted in a version of pBluescript KS⁺ that had previously been modified to eliminate plasmid backbone *Bst*XI sites. Mutagenic oligonucleotides CM-2A (TGTTGGTTTCCAAC CGTTACTGCGGGAGAGCTTCAAAGG) and CM-2B (TAACGGTTG GAAACCACAAGAAGAGTTTAAATACTGA) were used along with the –40 and reverse primers in PCR. The final PCR product was digested with *Bst*XI and the resulting *E α MC* *Bst*XI fragment was inserted into *Bst*XI digested 1.4-kb *E α* plasmid from which the wild-type *E α* *Bst*XI fragment had been removed. The 1.4-kb *E α MC* was sequenced to confirm its structure, and was then excised from the plasmid with *Bam*HI, blunted with Klenow, and ligated into *Xba*I-digested, blunted, and phosphatase-treated pBluescript carrying the enhancerless *Tcrd* minilocus (53). Minilocus structure was confirmed by dideoxynucleotide sequence analysis.

Tcrd minilocus DNA was purified as described previously (53), and was microinjected into fertilized C57BL/6 \times SJL F2 eggs by the Duke University Comprehensive Cancer Center Transgenic Mouse Shared Resource. Progeny tail DNA samples were analyzed on Southern blots as previously described (53). Transgenes were maintained on a mixed C57BL/6 \times SJL background. Copy number was determined by analysis of tail DNA on a

slot blot (Schleicher and Schuell) using radiolabeled C δ cDNA probe. Hybridization signals were quantified relative to previously identified single copy integrants using a PhosphorImager (Molecular Dynamics).

Transient transfections, and chloramphenicol acetyltransferase (CAT), and luciferase assays

Plasmid V δ 1-CAT was described previously and versions of this plasmid carrying either the monomeric 35-bp δ E3, 60-bp δ E3- δ E4, 34-bp *T α 1*, or 33-bp *T α 2* enhancer fragments, or the intact 1.4-kb *E α* , were described previously (30, 54, 55). To generate plasmids *T α 1*-*T α 2*-V δ 1-CAT and *T α 1*-*T α 2*MC-V δ 1-CAT, enhancer fragments were excised by *Bst*XI and *Dra*I digestion from the *E α* and *E α MC* plasmids, and were blunted with T4-polymerase and cloned into *Xba*I-digested, Klenow-blunted, and phosphatase-treated V δ 1-CAT plasmid. To generate V δ 1-luciferase plasmid, 1.6-kb V δ 1 fragment was excised from V δ 1-CAT plasmid by *Sac*I and *Hind*III digestion, and cloned into *Sac*I and *Hind*III digested pXPG-firefly luciferase plasmid (56). To generate *E α* and *E α MC*-V δ 1-luciferase plasmids, 1.4-kb *E α* and 1.4-kb *E α MC* were excised from pBS *Bst*XI plasmid by *Bam*HI digestion, and cloned into *Bam*HI digested and phosphatase-treated V δ 1-luciferase plasmid. The 5' to 3' enhancer orientation was confirmed by a PCR strategy.

The human leukemia T cell line Jurkat was cultured and transfected as described previously (31). For CAT assays, the acetylation of [¹⁴C]-chloramphenicol (Dupont-New England Nuclear) was assayed as described previously (30) and quantified with a PhosphorImager. For luciferase assays, Jurkat cells (4×10^6) were washed with PBS, resuspended in 300 μ l of RPMI 1640, and transferred to 0.4-cm gap BTX cuvettes. Five micrograms of purified (with Qiagen Plasmid Maxi Kit) pXPG derivatives plus 10 ng of pRL-TK (renilla luciferase plasmid; Promega) were added, and cells were electroporated at 800 mF and 260 V in a BTX electroporator. Five hundred microliters of ice-cold inactivated FBS were added immediately to the cuvette and cells were kept for 15 min on ice. Cells were then diluted with 5 ml of RPMI 1640 containing 10% FCS (Life Technologies), and penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich), and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 24 h. Luciferase activity (firefly/renilla) was measured with a Dual Luciferase Reporter Kit (Promega).

Analysis of V(D)J recombination in unfractionated thymocytes

Genomic DNA was prepared from thymi of 4- to 6-wk old mice by standard techniques. For single copy transgenic lines, 12 ng of genomic DNA was used as a template for PCR. For multicopy integrants, the quantity of DNA used was reduced to account for copy number to insure that the PCR amplifications were in the linear range (53). All PCR, gel electrophoresis, blotting, and hybridization with ³²P-labeled probes were performed as previously described (53). Hybridization signals were quantified using a PhosphorImager, and reported values for VDJ recombination were normalized to the C δ signal for each PCR template.

Analysis of V(D)J recombination in sorted thymocyte populations

For cell sorting, thymocyte populations were obtained from total mouse litters obtained from heterozygous crossings as described (18, 46). Preparation of cell templates for PCR analysis, conditions for PCR, and primers and probes used to analyze V(D)J recombination of both murine endogenous *Tcr α* and the human *Tcrd* minilocus were previously described (18, 53). For quantitative real-time PCR analysis, same cell templates and primers were assessed with iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) at Bio-Rad iCycler thermocycler.

Results

In vivo characterization of *E α* enhanceosome in mouse thymocytes

E α consists on four regions for protein binding, called *T α 1* to *T α 4* (35) (Fig. 1B). Previous genomic footprinting analysis using dimethylsulfate at the endogenous murine *E α* revealed that *T α 1*-*T α 4* elements and flanking areas are extensively occupied both at DN3 and DP thymocytes from RAG2^{-/-} and RAG2^{-/-} \times TCR β mice, respectively, as well as at DP thymocytes from wild-type mice (18, 57) (Fig. 2). The minimal *E α* , *T α 1*-*T α 2*, consists on a compact nucleoprotein structure or enhanceosome created by stereospecific interactions between transactivators bound to their cognate sites within the enhancer (36, 38, 39), that contains critical binding sites for ATF/CREB, TCF-1/LEF-1, Runx1, and Ets-1

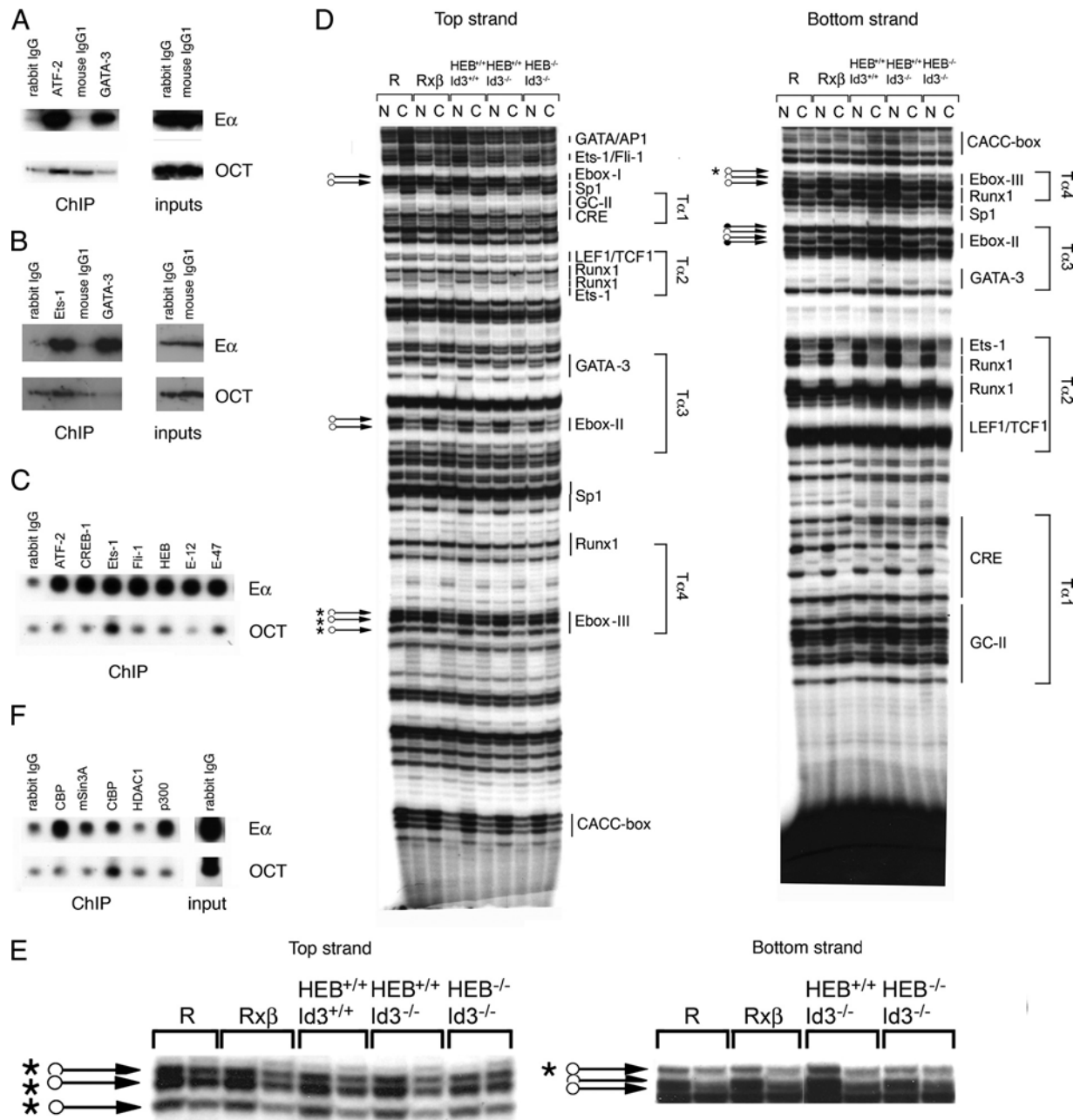


FIGURE 2. Identification of $E\alpha$ enhanceosome components in vivo in mouse thymocytes. *A*, *B*, *C*, and *F*, Chromatin preparations from total mouse thymocytes were immunoprecipitated with the indicated Abs. DNA purified from the Ab-bound fractions were used as a template for radioactive PCR to evaluate the presence of the $E\alpha$ and negative control *Oct2* (OCT) sequences. The primers MEA1 and MEA2, and Oct5 and Oct6 for amplification of mouse $E\alpha$ and *Oct2* sequences were previously described (26). Amplified fragments $E\alpha$ and *Oct2* of 137 bp and 133 bp, respectively, were detected by PAGE. The results are representative of several experiments. Input data for ChIP in *C* and *F* are presented in *F*. *D*, In vivo analysis of $E\alpha$ E-boxes occupancy by HEB. Thymocyte DNA from RAG-2^{-/-} (R), RAG2^{-/-} × TCR β (R \times β), HEB^{+/+}Id3^{+/+}, HEB^{+/+}Id3^{-/-}, and HEB^{-/-}Id3^{-/-} mice was methylated with dimethylsulfate either as naked (N) DNA in vitro or as chromosomal (C) DNA in intact cells and processed for genomic footprinting. Characterized binding sites for transcription factors in previous footprinting experiments are indicated (18, 57). Protected and hypersensitive guanines are indicated by arrows with open and closed dots, respectively. Asterisks identify T α 4 E-box-III guanines differentially protected in HEB^{-/-} compared with HEB^{+/+} thymocytes. *E*, Detail of results obtained at the T α 4 E-box from experiment shown in *D*.

proteins (38–45). $E\alpha$ enhanceosome structure extends the limits of T α 1-T α 2, because T α 1-T α 2 and T α 1-T α 4-bound factors interact physically to form a stable multiprotein complex in vitro, and to precisely regulate enhancer function in vivo (46). Outside of T α 1-T α 2, genomic footprinting experiments revealed occupancy of an API/GATA site, an ets site, an E-box (E-box-I) and a GC-box (GC-I), which can bind Sp1 in vitro, upstream of T α 1, a site for GATA-3 and an E-box (E-box-II) in T α 3, an Sp1 site between T α 3

and T α 4, a runx site and another E-box (E-box-III) in T α 4, and two CACC-boxes and a GC-box (GC-III) downstream of T α 4 (18, 36, 57). Previous in vitro experiments with specific Abs revealed presence of the T α 1-, T α 2-, and T α 3-binding factors TCF-1/LEF-1, Ets-1, Fli-1, GATA-3, Sp1, and CREB-1 on T α 1-T α 4 enhanceosome formed in DP cells (46).

In an attempt to characterize the identity of the proteins that are present at the endogenous $E\alpha$ enhanceosome in vivo, we have now

combined ChIP and genomic footprinting analyses in mouse thymocytes (Fig. 2). Consistent with previous ChIP experiments, our analysis confirmed *in vivo* binding of ATF-2, CREB-1, GATA-3, and Ets-1 to E α (45, 58, 59) (Fig. 2, A and B). In addition, we have observed *in vivo* binding of Fli-1, Sp1, HEB, and E2A to E α sequences (Fig. 2C). These experiments indicate that E α enhanceosome is formed by the coordinated assembly of multiple transcription factors including CREB-1 presumably bound to T α 1 CRE-site (39, 46, 57); ATF-2 that could bind as an AP-1 complex with c-Jun to the 5'T α 1 GATA/API site (60); Fli-1 or Ets-1 that could bind indistinguishably to an isolated ets site at 5'T α 1 (45); Runx-1 and Ets-1 bound cooperatively to T α 2 runx and ets-binding sites (45); and HEB and E2A likely bound to the three E-boxes present within the enhancer (61).

Detection of E2A and HEB proteins as part of E α enhanceosome (Fig. 2C) is in agreement with the reported ability of E2A proteins to bind *in vitro* to T α 3 E-box-II and T α 4 E-box-III (61). HEB/E2A heterodimers have been shown to be the major form of these proteins present in T cells, whereas E2A/E2A homodimers is the form present in B-cells (62, 63). To map the specific E-boxes occupied *in vivo* by HEB at E α , we have analyzed *in vivo* occupancy of E α E-boxes in thymocytes from HEB^{-/-} mice (47). We analyzed the effect of deletion of HEB in absence of Id3 (in the context of Id3^{-/-} mice), because it has been reported that disruption of Id3 increase the viability of HEB^{-/-} mice without affecting their thymocyte maturation phenotype (50). In agreement with a no obvious developmental defect of Id3^{-/-} thymocytes (49), we did not see any difference between analysis of *in vivo* E α occupancy in Id3^{+/+} and Id3^{-/-} mice (Fig. 2D). Comparing the analysis obtained in HEB^{+/+}Id3^{-/-} and HEB^{-/-}Id3^{-/-} mice, we found that T α 4 E-box-III footprints were diminished in HEB^{-/-}Id3^{-/-} thymocytes (Fig. 2, D and E). This result suggests specific binding of HEB to T α 4 E-box-III, but not to the 5'T α 1 E-box-I and the T α 3 E-box-II, which are likely occupied by the E2A homodimers *in vivo*. Our results do not distinguish whether HEB binds to T α 4 E-box-III as a heterodimer with E2A proteins or as a HEB homodimer. Our data supports the possibility that different E-boxes might be occupied by different combinations of E-proteins and presents a possible scenario to explain the unique roles provided by E2A and HEB proteins in early thymopoiesis (47, 50, 63–66). It is also interesting to note that the pattern of footprints found at the T α 4 E-box-III observed in HEB^{-/-} thymocytes resembles to that found in thymocytes from RAG2^{-/-} mice, which are arrested in a DN3 stage, but not in thymocytes from RAG2^{-/-} × TCR β mice, which develop to a DP stage (18, 51, 52). These data suggest that binding of HEB to T α 4 E-box-III might be involved in E α activation during DN3 to DP transition.

E α function in activation of both transcription and V(D)J recombination during thymocyte development relies on its ability to recruit histone modifying activities through specific interactions with enhancer-bound transcription factors (26). In this context, E α functions by promoting developmental stage-specific changes in histone acetylation at long distances through entire *Tcra*, including both J α and V α gene segment clusters (26, 27). CREB-binding protein (CBP) and p300 are histone acetyltransferases (HATs) that contain different domains for interaction with transcription factors, and act as integrators for the assembly of other well studied enhanceosomes, as it is the case for IFN- β and TNF- α enhanceosomes (67–69). To analyze the presence of CBP and p300, as well as the histone deacetylase (HDAC) 1 and its corepressor mSin3 at the E α enhanceosome *in vivo*, we performed ChIP experiments in total mouse thymocytes (Fig. 2F). In agreement with an important role for E α -dependent recruitment of HATs for enhancer function at the

endogenous locus in DP cells (26), we found that CBP and p300 were present at E α enhanceosome in total mouse thymocytes, whereas the corepressor mSin3 and its associated HDAC1 were absent. These experiments are consistent with long-range histone acetylation directed by E α function in DP thymocytes (26), and suggest that CBP and p300 recruitment through an active E α enhanceosome is involved in enhancer function.

Stereospecific interactions within nucleoprotein complexes formed on E α enhanceosome are rather flexible

T α 1-T α 2 has been considered a paradigm for enhanceosome structure (38, 39). Previous *in vivo* studies of T α 1-T α 2 occupancy revealed that none of enhancer binding factors can bind to enhancer DNA at physiological concentrations, and that factor binding at T α 2, including TCF-1/LEF-1 factors, Runx1 and Ets-1, occurs in a highly cooperative all-or-none fashion (36, 45). These results explained why intact T α 2 TCF/LEF and ets binding sites are both essential for enhancer activity (36, 37). These results indicated that E α has an inherent great stability due to strong cooperative binding among their binding-proteins. This high level of structural organization would ensure a high level functional cooperativity of the various enhanceosome components. We have created a mutant version of E α enhanceosome that argues against the notion of a requirement for a very strict E α enhanceosome structure for function (Fig. 3A). This mutant E α does not contain the essential T α 2 ets binding site (36, 37, 40), and consists on a chimeric E δ /E α , E α MC, in which minimal E δ , δ E3, myb, and runx binding sites were substituted for the T α 2 runx and ets binding sites in the context of the entire 1.4-E α (Fig. 3A). Myb and runx binding sites are essential for the activation of both transcription and V(D)J recombination by E δ (30, 33, 34, 55). Preliminary characterization of the T α 1-T α 2 fragment of the chimeric enhancer, T α 1-T α 2MC, confirmed efficient *in vitro* binding of c-Myb and Runx1 to it (data not shown). We next analyzed the ability of T α 1-T α 2MC to activate transcription from the V δ 1 promoter in transiently transfected Jurkat cells, as compared with a series of wild-type fragments of E δ and E α (Fig. 3B). In these experiments, enhancer fragments were subcloned upstream of the V δ 1 promoter in the enhancer-dependent test construct V δ 1-CAT, and enhancer activity was measured as previously reported (30, 54, 55). As shown previously (30, 54, 55), both δ E3 and δ E3- δ E4 efficiently activated transcription from the V δ 1 promoter (12.9 and 25.7-fold induction, respectively). As expected (70), a single copy of T α 1-T α 2 was a potent transcriptional enhancer (92.4-fold induction), whereas T α 1 alone and T α 2 alone were ineffective (1.4- and 0.5-fold induction, respectively). Strikingly, T α 1-T α 2MC displayed an activity that was greater than T α 1-T α 2 and comparable to that of the entire 1.4-kb E α (169.3 and 132.5-fold induction for T α 1-T α 2MC and E α , respectively). Hence, the chimeric T α 1-T α 2MC enhancer is an extremely potent transcriptional activator as judged by transient transfection. The strong transcriptional activity of T α 1-T α 2MC cannot be explained by the weak activity of δ E3 itself, but by a dramatic functional synergism among the proteins bound to the chimeric enhancer. T α 1-T α 2MC activity has to be a consequence from strong functional cooperativity between T α 1 and T α 2MC binding proteins. In agreement with the stronger transcriptional enhancer activity of T α 1-T α 2MC compared with that of T α 1-T α 2, 1.4-kb E α MC activity was 2.6-fold more potent than that of wild-type 1.4-kb E α , suggesting the existence of an additional level of synergism among proteins bound inside and outside T α 1-T α 2MC at E α MC (Fig. 3C). Hence, in contrast with

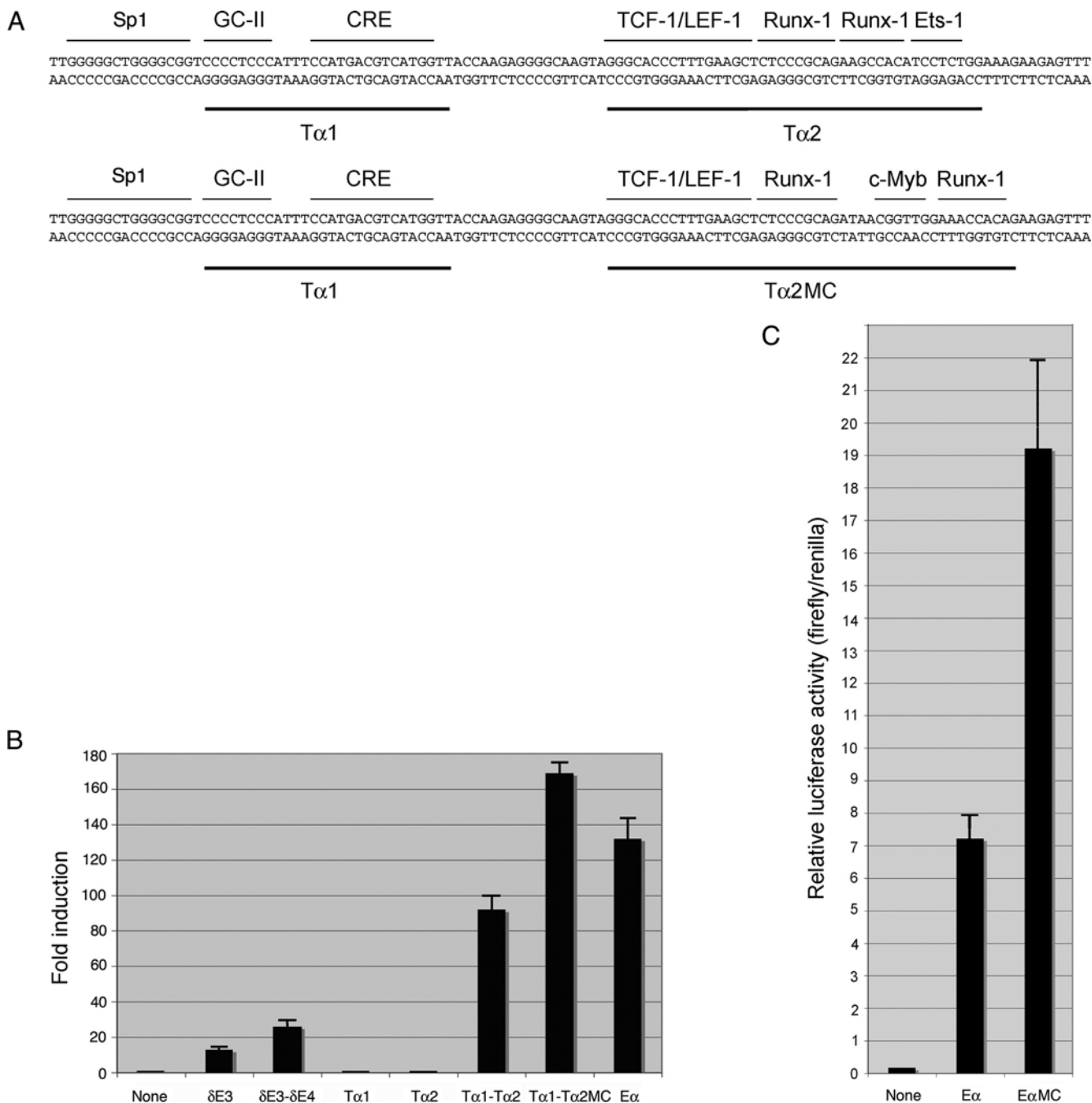


FIGURE 3. E α MC structure and function. *A*, The diagram depicts the E α and E α MC structure, indicating described binding sites for transcription factors and locations of the defined T α 1, T α 2, and T α 2MC protein binding regions. *B*, The indicated enhancers and enhancer fragments were tested as monomers cloned upstream of the V δ 1 promoter in the enhancer-dependent test construct V δ 1-CAT. Constructs were transfected in triplicate into Jurkat cells, and values for percent chloramphenicol acetylation were averaged and normalized to the activity of V δ 1-CAT with no enhancer. Data represent mean \pm SEM of three determinations. *C*, Activity of 1.4-kb E α and E α MC in the enhancer-dependent test construct V δ 1-firefly luciferase. Constructs were electroporated in triplicate into Jurkat cells together with a reference plasmid containing the renilla luciferase reporter gene. Values for firefly luciferase activity were normalized to that of the renilla luciferase control plasmid. Data represent mean \pm SEM of nine determinations.

previous data that supported a model for very specific stereospecific interactions between the different proteins bound to E α to ensure a high level of cooperativity among them, our data demonstrate that the stereospecific interactions among the different E α enhanceosome components could be rather flexible.

E α MC is efficient in activating V(D)J recombination in vivo

Previous experiments studies using a reporter construct consisting on an unrearranged human *Tcrd* minilocus in transgenic mice have

demonstrated enhancer dependency of developmental regulation of V(D)J recombination at the *Tcrd* locus (18, 21, 37, 46). The *Tcrd* minilocus used in these experiments contains V δ 1, V δ 2, D δ 3, J δ 1, and J δ 3 gene segments, C δ , and an enhancer within the J δ 3-C δ intron (53) (Fig. 4A). V gene segments within the construct carry a mutation to avoid expression of a transgene-derived TCR δ -chain that could interfere with normal T cell development (53). Analysis of rearrangements at the transgenic minilocus driven by 1.4-kb E δ , 1.4-kb E α , or no enhancer revealed that the V δ to D δ

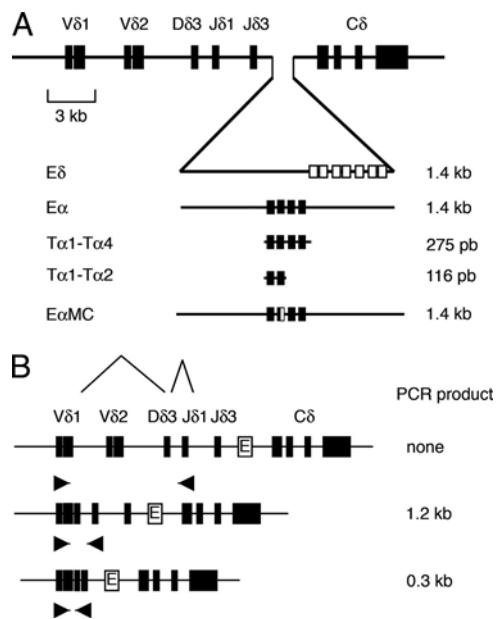


FIGURE 4. Human *Tcrd* minilocus and PCR strategy used to analyze minilocus rearrangements. *A*, Diagram of E δ , E α , T α 1-T α 2, T α 1-T α 4, and E α MC-containing minilocus constructs. Solid boxes represent exons, and open boxes represent protein-binding regions. *B*, PCR products generated from V δ 1 rearrangements are depicted along with the V δ 1 and J δ 1 primers used (arrows). Similar products are generated with V δ 2 and J δ 1 primers.

rearrangement step is enhancer-independent, whereas the V δ D δ to J δ rearrangement step is enhancer-dependent (53). To analyze the activation of V(D)J recombination by 1.4-kb E α MC, we generated new lines of transgenic mice, JS and JU, carrying a minilocus containing the chimeric enhancer (Figs. 3*A* and 4*A*). JS and JU carry 8–10 and 25–30 copies of the E α MC minilocus, respectively. Analysis of minilocus V(D)J recombination was performed by PCR from thymus genomic DNA templates using V δ 1 or V δ 2 primers in conjunction with J δ 1 primers as described previously (53) (Fig. 4*B*). This PCR strategy amplifies 0.3-kb fragments corresponding to complete V δ D δ J δ rearrangements and 1.2-kb fragments corresponding to V δ D δ rearrangements. PCR were also performed in parallel with a pair of C δ primers as an internal control. All PCR experiments were performed under conditions previously established to yield linear amplification (18, 21, 33, 34, 37, 46, 53). PCR products were electrophoresed through agarose gels, blotted, and detected by hybridization with appropriate 32 P-labeled V δ 1, V δ 2, or C δ probes. We detected high levels of V δ 1D δ 3J δ 1 and V δ 2-D δ 3-J δ 1 rearrangements (similar to 1.4-kb E α line J) in each line (Fig. 5). Hence, the chimeric enhancer is an extremely efficient activator of enhancer-dependent V(D)J recombination at judged by analysis of our recombination reporter construct in transgenic mouse thymocytes.

Early initiation of V(D)J recombination directed by E α MC during thymocyte development

Previous experiments using a transgenic reporter substrate revealed that 116-bp T α 1-T α 2 led to premature activation of V(D)J recombination compared with that observed for the entire 1.4-kb E α , whereas 275-bp T α 1-T α 4, led to a correct developmental activation (37, 46). These experiments indicated that binding sites within T α 3-T α 4 collaborate with factors bound to T α 1-T α 2 for the strict developmental regulation of *Tcra* rearrangement. To better understand the mechanisms responsible for appropriate developmental regulation and dramatic functional synergy between

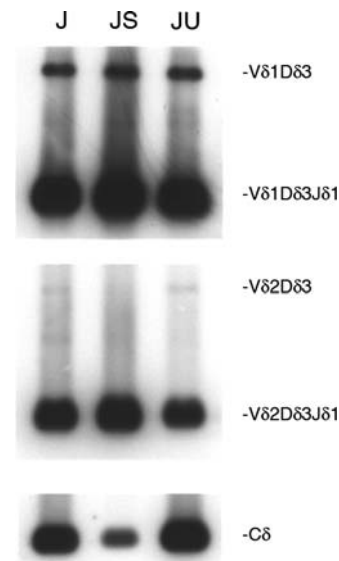


FIGURE 5. PCR analysis of E α MC *Tcrd* minilocus rearrangement in total thymocytes and sorted thymocyte populations from adult mice. Genomic DNA templates from unfractionated thymocytes of E α MC lines JS and JU (4–6 wk old) were amplified and detected as described (54).

transcription factors that bind to E α , and specifically address whether E α regions outside of T α 1-T α 2 collaborate functionally with T α 2 runx/ets-bound proteins, we evaluated developmental control by E α MC, and compared it with that regulated by E δ , E α , T α 1-T α 2, and T α 1-T α 4 through analysis of activation of V δ 1D δ 3 to J δ 1 minilocus rearrangement in sorted thymocyte populations from 4 to 6 wk old transgenic mice (Fig. 6 and supplemental Table I)⁹ (18, 46).

To evaluate these rearrangements, we used a PCR strategy that allows a semiquantitative analysis of these rearrangements: 2 μ l of each cell lysate, corresponding to 2,000 cells, were analyzed with 25 cycles of amplification and Southern blots (Fig. 6). To validate this PCR strategy for quantification of V δ 1D δ 3J δ 1 rearrangements, we have analyzed C δ and V δ 1D δ 3J δ 1 amplicons using serial dilutions of DP cell templates from the transgenic line T2, which is one of the transgenic lines with the maximum number of copies analyzed, 30 copies, and adjusted the amplified signals for transgene copy number (Fig. 7). Perfect linearity was observed at these PCR analyses indicating that experimental conditions used in experiments shown in Fig. 6 allows for correct quantification of transgenic rearrangements and comparison among different cell templates. Estimated amount of transgenic DNA analyzed in our experiments is within the range of linearity previously established for these type of PCR experiments (53, 71). Accordingly, analysis of 2 μ l of undiluted samples of DP templates from other transgenic lines correlated perfectly with their copy number (Fig. 7), indicating that results obtained from this type of analysis at all the transgenic cell templates can be compared and correctly interpreted.

In agreement with previous analysis of the E δ transgenic line A (18, 21, 46), we detected high levels of V δ 1D δ 3J δ 1 rearrangement in both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells, and relative to rearrangement in $\alpha\beta$ T cells (arbitrarily set to 100%), rearrangement was essentially complete in DN3 thymocytes. In agreement also with the previously described critical role for E α in the developmental activation of *Tcra* rearrangement (18, 22), the pattern

⁹ The online version of this article contains supplementary material.

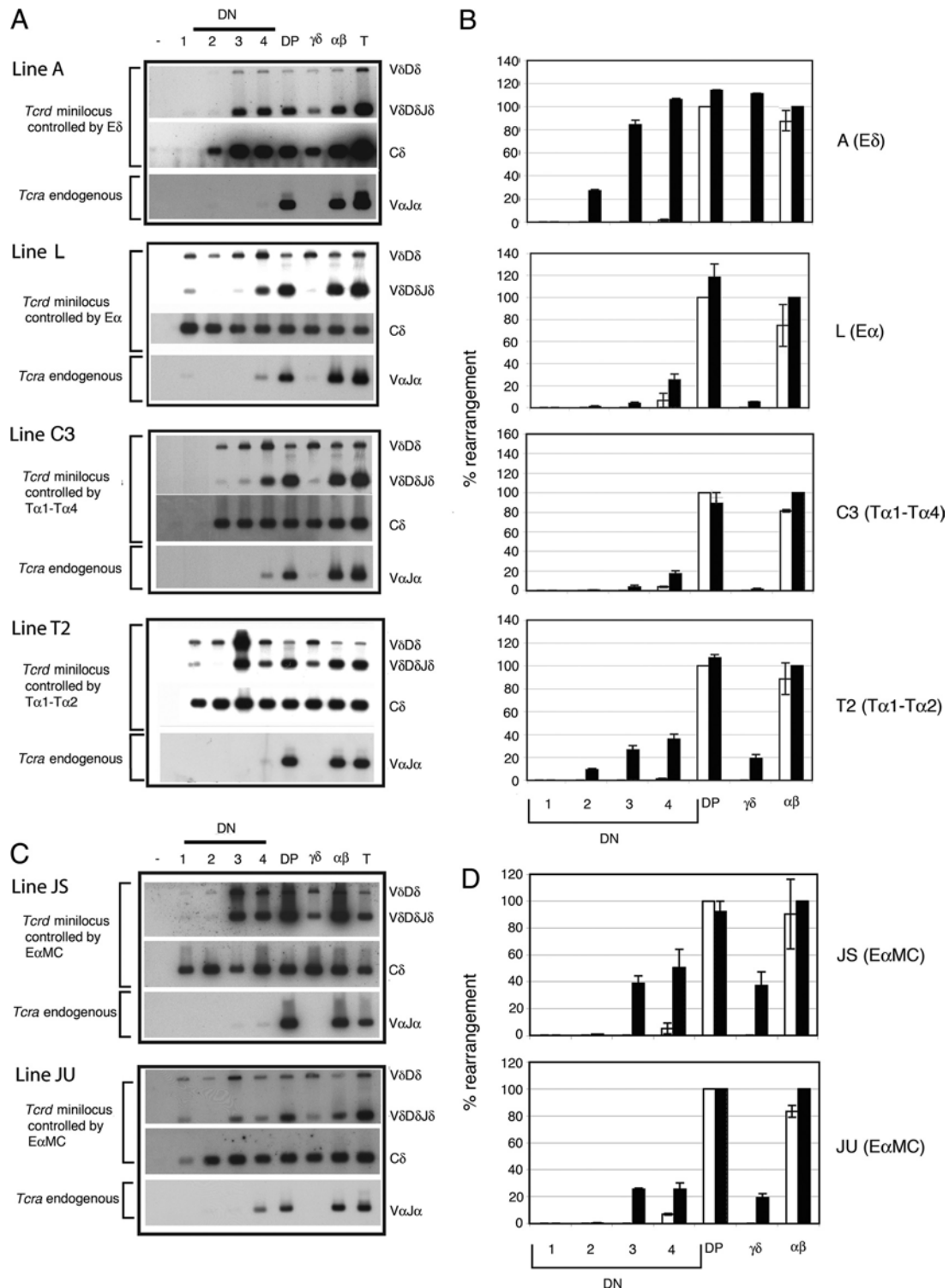


FIGURE 6. PCR analysis of E α MC *Tcrd* minilocus and endogenous *Tera* locus rearrangement in sorted thymocyte populations of adult mice. *A* and *C*, Thymocytes from transgenic mice were sorted to obtain the indicated populations. Endogenous *V α* to *J α* rearrangement was amplified by PCR of genomic DNA using *V α F3* and *J α 57* primers and detected on a Southern blot using a radiolabeled *J α 57* oligonucleotide probe as described previously (18, 46, 87). Minilocus *V δ 1D δ 3* and *V δ 1D δ 3J δ 1* rearrangements were amplified by PCR from the same DNA preparations using *V δ 1* and *J δ 1* primers and were detected on a Southern blot using a radiolabeled *V δ 1* cDNA probe (18, 46, 53). As a control, minilocus *C δ* was amplified using human *C δ* primers and detected using a radiolabeled *C δ* cDNA probe (18, 46, 53). The positions of 1.2-kb *V δ 1D δ 3* (*V δ D δ*), and 0.3-kb *V δ 1D δ 3J δ 1* (*V δ D δ J δ*), *C δ* and *V α J α* PCR products are indicated. *B* and *D*, Reported values for minilocus *V δ 1D δ 3J δ 1* rearrangements (■) are normalized to the *C δ* signal for each population and expressed as a percentage of the rearrangement level in $\alpha\beta$ T cells. Reported values for endogenous *V α J α* rearrangement (□) are normalized to the *C δ* signal for each population and expressed as a percentage of the rearrangement level in DP thymocytes. The data reflect mean \pm SEM for three to four determinations.

of minilocus rearrangement in E α transgenic lines (as it is the case for the E α transgenic line L) paralleled that of endogenous *Tera* with no rearrangements observed in $\gamma\delta$ T cells and not

being completed until the DP stage and subsequent $\alpha\beta$ T cells (18, 21, 46). These results are consistent with previous analyses of endogenous murine *Tcrd* and *Tera* rearrangements (8, 9).

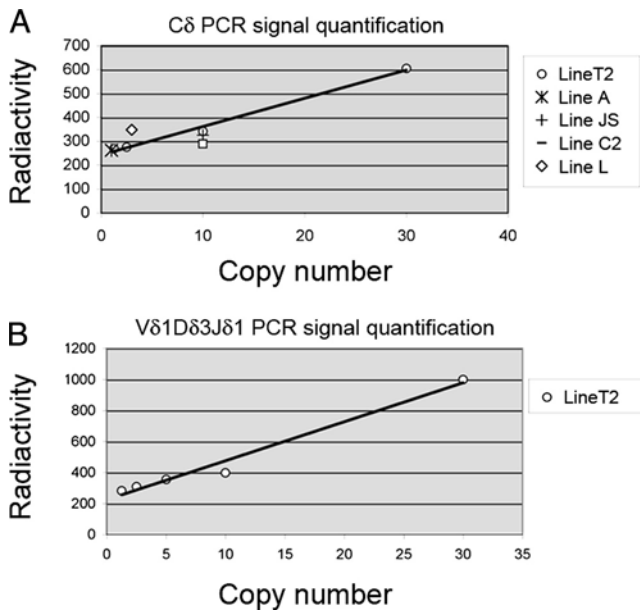


FIGURE 7. Quantification of *Tcrd* minilocus of C δ template and V δ 1D δ 3J δ 1 rearrangements. *A*, Cell templates from transgenic lines were subjected to PCR using C δ primers and analyzed on Southern blots using a C δ probe, as performed for experiments shown in Fig. 6. Signals from 2 μ l of undiluted sample, equivalent to 2000 cells from transgenic line T2 (30 copies), and diluted samples corresponding to the indicated copy number were analyzed (○). PCR C δ signals obtained from analysis of 2 μ l of undiluted cell templates from transgenic single copy line A (*), line L with three copies of the transgene (◇), line JS with ten copies of the transgene (+), and line C2 with ten copies of the transgene (□) are shown. *B*, Serially diluted cell templates from transgenic line T2 were subjected to PCR using V δ 1 and J δ 1 primers, and analyzed on Southern blots using a V δ 1 probe, as performed for experiments shown in Fig. 6. Signals from 2 μ l of undiluted sample, equivalent to 2000 cells from transgenic line T2 and diluted samples corresponding to the indicated copy number were analyzed (○). Amplicons were quantified by PhosphorImager analysis.

Hence, this minilocus reporter construct provides a useful approach to evaluate how changes in enhancer structure impact its ability to developmentally regulate V(D)J recombination *in vivo*. Consistent also with previous experiments (37, 46), T α 1-T α 2 directed a premature activation of enhancer-dependent V δ D δ to J δ rearrangement, on the basis of elevated rearrangement in DN3 thymocytes, $\gamma\delta$ T cells, and DN4 thymocytes, as it is seen in the analysis of the T α 1-T α 2 transgenic line T2 (26, 19, and 36%, respectively) (Fig. 6 and supplemental Table I), whereas T α 1-T α 4 enhancer fragment is sufficient for proper developmental regulation of E α minilocus since its developmental activation of V(D)J recombination driven was essentially indistinguishable from that driven by the entire 1.4-kb E α , as it is illustrated in the analysis of the T α 1-T α 4 transgenic line C3: V δ 1D δ 3J δ 1 rearrangement was detected at relatively low levels in DN4 cells and at high levels in DP and $\alpha\beta$ T cells, but was only barely detected in DN3 and $\gamma\delta$ T cells. All these data together indicated that E α sequences in the T α 3-T α 4 region function to prevent the premature activation of V(D)J recombination that would otherwise be directed by T α 1-T α 2. As an internal control for cell purity, we always examined endogenous murine V α to J α rearrangements in the same-sorted cells (Fig. 6 and supplemental Table I). As expected, endogenous V α J α rearrangement was undetectable in DN1, DN2, and DN3 thymocytes and $\gamma\delta$ T cells; was detected at low levels in DN4 thymocytes; and was completed in both DP thymocytes and $\alpha\beta$ T cells.

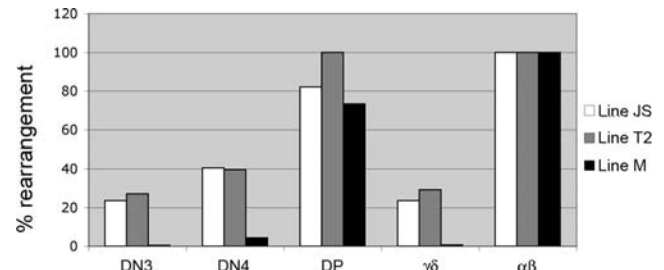


FIGURE 8. Quantification of *Tcrd* minilocus V δ 1D δ 3J δ 1 rearrangements by real-time PCR. Analysis of 2 μ l of cell samples equivalent to 2000 sorted cells from transgenic lines JS (□), T2 (▤), and M (■) were subjected to quantitative real-time PCR with the same primers used in Fig. 6 and 7. Reported values for minilocus V δ 1D δ 3J δ 1 rearrangements are normalized to the C δ signal for each population and expressed as a percentage of the rearrangement level in $\alpha\beta$ T cells. The experiment shown is representative of several experiments.

In the analysis of E α MC lines (Fig. 6 and supplemental Table I), we observed extensive V δ 1D δ 3J δ 1 rearrangements as early as DN3 (39% for JS and 25% for JU). High level of rearrangements were also detected in $\gamma\delta$ T cells (37% for JS and 19% for JU) and DN4 (50% for JS and 25% for JU). In fact, developmental activation of V(D)J recombination by E α MC is indistinguishable from that driven by T α 1-T α 2 (46). In agreement with a correct evaluation and quantification of data, quantitative real-time PCR analyses of V δ 1D δ 3J δ 1 rearrangements in transgenic sorted cells correlate perfectly with data shown in Fig. 6 (Fig. 8). V δ 1D δ 3J δ 1 rearrangements in JS, T2, and M lines were 23, 27, and 0.41%, respectively, in DN3 thymocytes; 40, 39, and 4%, respectively, in DN4 thymocytes; and 23, 29, and 0.6% in $\gamma\delta$ -T cells.

These results indicate that proteins bound to the T α 3-T α 4 region cannot delay the activation of a chimeric “early” enhancer, but rather, specifically collaborate with T α 2 runx/ets sites binding proteins to effect appropriate developmental control. These experiments demonstrate that although stereospecific interactions among proteins that form a T α 1-T α 2 enhanceosome could be rather flexible, structural constraints must exist for functional collaboration between T α 1-T α 2 and T α 3-T α 4 binding proteins. Hence, specific interactions between T α 1-T α 2 and T α 3-T α 4-bound factors are essential to developmentally control of enhancer activation.

Discussion

The structural constraints on E α enhanceosome assembly and function are rather relaxed

T α 1-T α 2 consists on a compact nucleoprotein structure created by stereospecific interactions between transactivators bound to their cognate sites within the enhancer, and it is considered as a paradigm for enhanceosomes. From the general definition of enhanceosomes, both δ E3 and T α 1-T α 2 can be considered as true enhanceosomes because they contain very tightly clustered sites for transcription factors in a compact genomic sequence (30 bp for δ E3 and 116 bp for T α 1-T α 2) that operate as a scaffold to assemble a unified multiprotein complex to form a higher-order three-dimensional transcription factor/enhancer DNA complex (30, 31, 33, 34, 36–39, 45, 72, 73), as it is the case for other well characterized enhanceosomes, such as the IFN- β enhancer and the TNF- α promoter (74–76). All these enhanceosomes show a high degree of cooperativity in their assembly and a very robust functional synergy among their components, because alterations in individual binding sites have drastic effects on

enhancer function, as it is also the case for E α and E δ (30–34, 36–38, 77). The clustered sites that define δ E3 and T α 1-T α 2 reflect the synergy required for weak, but critical, interactions among the proteins bound to these enhanceosomes. In this way, the function of these enhanceosomes is much more than the sum of individual factor contributions, but it becomes from a network of stereospecific interactions among enhancer-bound proteins to ensure that a specific gene would be activated only if all the enhanceosome components are all simultaneously present in the same nucleus (36). This high level of structural organization ensures a higher level of functional cooperativity among the various enhanceosome components.

In general, architectural proteins are believed to orchestrate the formation of enhanceosomes by facilitating interactions between distantly bound factors, as it is the case for TCF-1/LEF-1 factors at T α 1-T α 2 (38, 39) or for high mobility group-I(Y) at the IFN- β enhancer (78). TCF-1/LEF-1-induced DNA bending was thought to play an organizing role that promotes specific interactions between ATF/CREB factors and Ets-1 bound to distal ends of the enhancer (38), and that helped to recruit non-DNA binding proteins that provide additional bridges among the various DNA-bound factors (77, 79). However, TCF-1/LEF-1 factors have very low binding specificity to their specific sequences (80), and *in vivo* studies of T α 1-T α 2 occupancy revealed that, under physiological conditions, none of the E α activators, including TCF-1/LEF-1 factors, can bind E α DNA in their own and access chromatin to play a unique initiating role in enhanceosome assembly (36). These experiments indicated that TCF-1/LEF-1 factors must bind to this enhancer *in vivo* in conjunction with Ets-1 (and presumably Runx1, which binds in a highly cooperative fashion with Ets-1 *in vitro*) in an all or none fashion (36, 38, 45, 81) that explained why intact T α 2 TCF/LEF and ets sites are both essential for *in vivo* enhancer activity (36, 37). Hence, simultaneous availability of multiple enhancer binding proteins is required for chromatin disruption and stable binding site occupancy at E α , as well as the activation of transcription and V(D)J recombination.

Our present ChIP and genomic footprinting experiments have identified many of the proteins that are part of the endogenous E α enhanceosome *in vivo* in mouse thymocytes (Fig. 2). Our experiments confirmed the presence of ATF-2, CREB-1, GATA-3, and Ets-1 (45, 58, 59), and demonstrated the presence of Fli-1, Sp1, HEB, and E2A at E α sequences *in vivo*. Furthermore, our data identify the T α 4 E-box-III as a possibly specific *in vivo* binding site for HEB at this enhancer. In addition to these DNA-binding factors, our ChIP experiments have revealed the presence of the HATs CBP and p300, and the absence of the corepressor mSin3 and its associated HDAC1 at E α in mouse thymocytes. These experiments suggest that CBP and p300 are recruited to create an active E α enhanceosome through the coordinated assembly of multiple transcription factors. These factors include CREB-1, presumably bound to T α 1 CRE site (39, 46, 58); ATF-2 that could bind as an AP-1 complex with c-Jun to the 5'T α 1 GATA/AP1 site (58, 60); Fli-1 or Ets-1 that could bind indistinguishably to an isolated ets site at 5'T α 1 (45); Runx-1 and Ets-1 bound cooperatively to T α 2 runx and ets-binding sites (38, 45, 81); HEB that could bind specifically to the T α 4 E-box-III; and E2A (likely bound to the three E-boxes present within the enhancer) (61) are involved in enhancer function. These data are consistent with long-range histone acetylation directed by E α function in DP thymocytes (26).

Our mutant version of E α enhanceosome has argued against the notion of a requirement for a strict E α enhanceosome structure for function (E α MC). This mutant E α does not contain the essential T α 2-ets binding site (37, 40), and consists on the substitution δ E3

myb and runx binding sites for T α 2 runx and ets binding sites in the context of the entire 1.4-E α . Our initial goal in designing the E α MC chimera was to substitute a myb site in place of the ets site in T α 2. However, a direct replacement would have oriented the myb and runx sites in a manner distinct from that found in E δ . Because previous studies revealed that a precise alignment of these binding sites is required for functional synergism between c-Myb and Runx factors in E δ (30), we deliberately conserved the E δ arrangement of myb and runx sites to insure minimal E δ function within the chimera. The chimeric enhancer retains two runx sites in the T α 2 region that are now separated by the myb site rather than being adjacent to one another. It is important to note that although δ E3 myb and runx binding sites are essential (30, 33, 34, 55), they are not sufficient for the activation of transcription and V(D)J recombination in the context of the *Tcrd* minilocus (34), hence these sites cannot function as a dominant element on its own. Although Runx factors are context-dependent transcription factors that can functionally collaborate with Ets-1 and with c-Myb (30, 38, 45, 81), the requirement for formation of the compact nucleoprotein structure that it is created at T α 1-T α 2 by stereospecific interactions between transactivators bound to their cognate sites within the enhancer makes rather surprising that we could replace the T α 2 runx and ets sites with minimal E δ myb and runx sites to generate a chimeric, reorganized version of T α 1-T α 2 that is more potent in transient transfection experiments than either of the parent enhancers (T α 1-T α 2 and δ E3). Furthermore, an intact ets site was demonstrated to be essential for the assembly and function of the T α 1-T α 2 enhanceosome *in vivo* (36, 37). Despite a wealth of data describing the stereospecific assembly of the T α 1-T α 2 enhanceosome (38, 39), our data indicate that the structural constraints on enhanceosome assembly and function are rather relaxed. Hence, there appears to be substantial flexibility regarding the specific components that can be effectively assembled into a functional enhanceosome.

Functional collaboration between T α 2 runx/ets binding proteins and T α 3-T α 4 binding proteins

Transcriptional enhancers are critical regulators of rearrangement and gene expression of Ag receptor genes through promoters located at considerable distances (2). Precise developmental activation of these enhancers must therefore be orchestrated by the specific array of transcription factors and coactivators recruited to the region. In this way, the E α is supposed to expose a unique activating surface, which can initiate very precisely and efficiently a developmental program of events that counteracts the repressive chromatin environment, leading to the downloading of the basal transcriptional machinery to its specific promoters and activation of V(D)J recombination. We previously found that T α 1-T α 2 is subjected to premature activation *in vivo*, and T α 3-T α 4 functions to enforce a developmentally appropriate activation to T α 1-T α 2 (37, 46). Our present data indicate that the functional interaction between these two regions appears to be highly specific and dependent on T α 2 runx/ets binding sites, because T α 3-T α 4 could not enforce a similar developmental delay on an active chimeric “early” enhancer containing E δ myb/runx binding sites. Deregulation in the onset of V(D)J recombination directed by the chimeric enhancer might depend on the loss of T α 2 ets site occupancy, the different reorganization of the runx sites, or both. At present, the identity of the T α 3-T α 4 factors that could collaborate with factors bound to T α 2 runx/ets binding sites in the developmental activation of E α is unknown. Because δ E3 myb/runx sites cannot functionally interact with the T α 3-T α 4 elements to inhibit rearrangement in DN3 thymocytes, our data suggest that T α 2-runx/ets site binding factors are involved in specific functional interactions with

Tα3-Tα4 binding proteins to maintain a repressed state until the DN4 stage of thymocyte development. The fact that δE3-δE4 elements are unable to activate recombination at this system also support our hypothesis, because δE3 cannot act as a dominant “early” element by itself (34). In conclusion, our data strongly suggest a requirement for functional interactions between Tα2-runx and/or ets sites binding factors with Tα3-Tα4 binding proteins to ensure onset of rearrangement at the DN4/DP stages. In an attempt to better understand how functional interactions between Tα1-Tα2 and Tα3-Tα4 might affect enhancer function, we have conducted genomic footprinting analyses comparing Eα and EαMC thymocyte samples from M, JS, and JU transgenic lines (data not shown). These experiments indicate that factor binding to Tα2MC does not affect occupancy of Tα1 and Tα3-Tα4 binding sites and surrounding areas, suggesting that functional collaboration between Tα2 runx/ets binding sites and Tα3-Tα4 bound factors occurs at a level of regulation beyond accessibility of other transcription factors to their binding sites within chromatin or cooperative factor loading to enhancer DNA.

Gene targeting experiments in mice have established that Ets-1 is important for development of the αβ T cell lineage by regulating functional integrity of the pre-TCR signaling and allelic exclusion at *Tcrb* (82–84), and for development of NK cells (85, 86). However, no effect on expression at *Tcra* has been detected in T cells from Ets-1-deficient mice. Although in vivo Ets-1 binding at Tα2 has been detected in Jurkat cells (45), it is possible that other factors different from Ets-1 could occupy the Tα2 ets site in DN3 thymocytes or during β-selection, and be responsible for the correct activation of Eα in the transition of DN3 to DP. This latter scenario implies that Eα can assemble different enhanceosomes during T cell differentiation. This flexibility in the assembly of different types of nucleoprotein complexes among Eα-binding proteins could explain in part our results of creating a very potent EαMC enhanceosome with different components assembled in the complex. Previous in vivo footprinting experiments indicated that occupancy of Eα is indistinguishable in DN3 and DP thymocytes suggesting that the identity of the majority of proteins must be identical or very closely related in the enhanceosomes assembled in both cases (18, 57). However the high flexibility that we observe in the assembly of functional multiprotein complexes at this sequence might be indicative of a possible assembly of distinct complexes at different moments of development. The flexibility that permits the arrival and departure of some transcription factors at a given time has been observed in the assembly of TNF-α enhanceosome (75, 76). This enhancer responds to a large variety of signals such as Ag receptor engagement, virus, LPS, and ionophorus and is equipped with a collection of binding sites that are differentially used depending on the signal. For example, this enhanceosome contains NFAT and ATF-2/c-Jun after Ag receptor engagement or ionophorus stimulation; NFAT, ATF-2/c-Jun, and Sp1 after virus infection; and Sp1, Egr-1, Ets/Elk, and ATF-2/c-Jun after LPS stimulation. Similarly to this, the possibility of assembly of distinct sets of proteins on Eα might represent a more flexible form of information processing during thymocyte development. Characterization of the nature of the different enhanceosome complexes assembled on Eα during DN3 to DP transition is a goal for our future investigations.

Acknowledgments

We thank Michael S. Krangel for support and helpful contributions during the course of this work, Cheryl Bock for generation of transgenic mice at

the Duke University Shared Transgenic Mouse Facility, Dr. Yuan Zhuang at Duke University Medical Center for providing HEB^{+/-}Id3^{-/-} and HEB^{-/-}Id3^{-/-} mice, Hubert Kohler and Tracy Hayden for their help with sorting experiments, Allison Dwileski for help with statistics and graphical representation of data, and Michael S. Krangel and Carles Suñé for critical reading of the manuscript.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

1. Rothenberg, E. V., and T. Tanghon. 2005. Molecular genetics of T cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 601–649.
2. Cobb, R. M., K. J. Oestreich, O. A. Osipovich, and E. M. Oltz. 2006. Accessibility control of V(D)J recombination. *Adv. Immunol.* 91: 45–109.
3. Mombaerts, P., A. R. Clarke, M. A. Rudnicki, J. Iacomini, S. Itoharu, J. J. Lafaille, L. Wang, Y. Ichikawa, R. Jaenisch, M. L. Hooper, et al. 1992. Mutations in T-cell antigen receptor genes α and β block thymocyte development at different stages. *Nature* 360: 225–231.
4. Pearce, M., L. Wu, M. Egerton, A. Wilson, K. Shortman, and R. Scollay. 1989. A murine early thymocyte developmental sequence is marked by transient expression of the interleukin 2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1614–1618.
5. Godfrey, D. I., J. Kennedy, T. Suda, and A. Zlotnik. 1993. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3⁺CD4⁺CD8⁻ triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J. Immunol.* 150: 4244–4252.
6. Dik, W. A., K. Pike-Overzet, F. Weerkamp, D. de Ridder, E. F. E. de Hass, M. R. M. Baert, P. van der Spek, E. E. L. Koster, M. J. T. Reinders, J. J. M. van Dongen, et al. 2005. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studying and gene expression profiling. *J. Exp. Med.* 201: 1715–1723.
7. Prinz, I., A. Sansoni, A. Kissenpfeinig, L. Ardouin, M. Malissen, and B. Malissen. 2006. Visualization of the earliest steps of γδ T cell development in the adult thymus. *Nat. Immunol.* 7: 995–1003.
8. Capone, M., R. D. Hockett, Jr., and A. Zlotnik. 1998. Kinetics of T cell receptor β, γ, and δ rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44⁺CD25⁺ pro-T thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12522–12527.
9. Livak, F., M. Tourigny, D. G. Schatz, and H. T. Petrie. 1999. Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. *J. Immunol.* 162: 2575–2580.
10. Godfrey, D. I., J. Kennedy, P. Mombaerts, S. Tonegawa, and A. Zlotnik. 1994. Onset of TCR-β gene rearrangement and role of TCR-β expression during CD3⁺CD4⁺CD8⁻ thymocyte differentiation. *J. Immunol.* 152: 4783–4792.
11. Wilson, A., W. Held, and H. R. MacDonald. 1994. Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes. *J. Exp. Med.* 179: 1355–1360.
12. Tourigny, M. R., S. Mazel, D. B. Burtrum, and H. T. Petrie. 1997. T cell receptor (TCR)-β gene recombination: dissociation from cell cycle regulation and developmental progression during T cell ontogeny. *J. Exp. Med.* 185: 1549–1556.
13. Dudley, E. C., H. T. Petrie, L. M. Shah, M. J. Owen, and A. C. Hayday. 1994. T cell receptor β chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* 1: 83–93.
14. Ciofani, M., T. M. Schmitt, A. Ciofani, A. M. Michie, N. Cuburu, A. Aublin, J. L. Maryanski, and J. C. Zuniga-Pflucker. 2004. Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J. Immunol.* 172: 5230–5239.
15. Xi, H., R. Schwartz, I. Engel, C. Murre, and G. J. Kersh. 2006. Interplay between RORγt, Egr3, and E proteins controls proliferation in response to pre-TCR signals. *Immunity* 24: 813–826.
16. Wilson, A., J. P. de Villartay, and H. R. MacDonald. 1996. T cell receptor δ gene rearrangement and T early α (TEA) expression in immature αβ lineage thymocytes: implications for αβ/γδ lineage commitment. *Immunity* 4: 37–45.
17. Petrie, H. T., F. Livak, D. Burtrum, and S. Mazel. 1995. T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production. *J. Exp. Med.* 182: 121–127.
18. Hernández-Munain, C., B. P. Sleckman, and M. S. Krangel. 1999. A developmental switch from TCR δ enhancer to TCR α enhancer function during thymocyte maturation. *Immunity* 10: 723–733.
19. Krangel, M. S., C. Hernández-Munain, P. Lauzurica, M. McMurry, J. L. Roberts, and X. P. Zhong. 1998. Developmental regulation of V(D)J recombination at the TCR α/δ locus. *Immunol. Rev.* 165: 131–147.
20. Capone, M., F. Watrin, C. Fernex, B. Horvat, B. Krippel, L. Wu, R. Scollay, and P. Ferrier. 1993. TCR β and TCR α gene enhancers confer tissue- and stage-specificity on V(D)J recombination events. *EMBO J.* 12: 4335–4346.
21. Lauzurica, P., and M. S. Krangel. 1994. Temporal and lineage-specific control of T cell receptor α/δ gene rearrangement by T cell receptor α and δ enhancers. *J. Exp. Med.* 179: 1913–1921.
22. Sleckman, B. P., C. G. Bardon, R. Ferrini, L. Davidson, and F. W. Alt. 1997. Function of the TCR α enhancer in αβ and γδ T cells. *Immunity* 7: 505–515.
23. Monroe, R. J., B. P. Sleckman, B. C. Monroe, B. Khor, S. Claypool, R. Ferrini, L. Davidson, and F. W. Alt. 1999. Developmental regulation of TCR δ locus accessibility and expression by the TCR δ enhancer. *Immunity* 10: 503–513.

24. Aifantis, I., C. H. Bassing, A. I. Garbe, K. Sawai, F. W. Alt, and H. von Boehmer. 2006. The E δ enhancer controls the generation of CD4⁺CD8⁺ $\alpha\beta$ TCR-expressing T cells that can give rise to different lineages of $\alpha\beta$ T cells. *J. Exp. Med.* 203: 1543–1550.
25. Krangel, M. S., J. Carabaña, I. Abarrategui, R. Schlimgen, and A. Hawwari. 2004. Enforcing order within a complex locus: current perspectives on the control of V(D)J recombination at the murine T-cell receptor α/δ locus. *Immun. Rev.* 200: 224–232.
26. McMurry, M. T., and M. S. Krangel. 2000. A role for histone acetylation in the developmental regulation of VDJ recombination. *Science* 287: 495–498.
27. Hawwari, A., and M. S. Krangel. 2005. Regulation of TCR δ and α repertoires by local and long-distance control of variable gene segment chromatin structure. *J. Exp. Med.* 202: 467–472.
28. Hawwari, A., C. Bock, and M. S. Krangel. 2005. Regulation of T cell receptor α gene assembly by a complex hierarchy of germline $J\alpha$ promoters. *Nat. Immunol.* 6: 481–489.
29. Bassing, C. H., R. E. Tillman, B. B. Woodman, D. Canty, B. C. Monroe, B. P. Sleckman, and F. W. Alt. 2003. T cell receptor (TCR) α/δ locus enhancer identity and position are critical for the assembly of TCR δ and α variable region genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 2598–2603.
30. Hernández-Munain, C., and M. S. Krangel. 1994. Regulation of the T-cell receptor δ enhancer by functional cooperation between c-Myb and core-binding factors. *Mol. Cell Biol.* 14: 473–483.
31. Hernández-Munain, C., and M. S. Krangel. 1995. c-Myb and core-binding factor/PEBP2 display functional synergy but bind independently to adjacent sites in the T-cell receptor δ enhancer. *Mol. Cell Biol.* 15: 3090–3099.
32. Hernández-Munain, C., and M. S. Krangel. 2002. Distinct roles for c-Myb and core binding factor/polyoma enhancer-binding protein 2 in the assembly and function of a multiprotein complex on the TCR δ enhancer in vivo. *J. Immunol.* 169: 4362–4369.
33. Hernández-Munain, C., P. Lauzurica, and M. S. Krangel. 1996. Regulation of T cell receptor δ gene rearrangement by c-Myb. *J. Exp. Med.* 183: 289–293.
34. Lauzurica, P., X. P. Zhong, M. S. Krangel, and J. L. Roberts. 1997. Regulation of T cell receptor δ gene rearrangement by CBF/PEBP2. *J. Exp. Med.* 185: 1193–1201.
35. Ho, I. C., L. H. Yang, G. Morle, and J. M. Leiden. 1989. A T-cell-specific transcriptional enhancer element 3' of C α in the human T-cell receptor α locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6714–6718.
36. Hernández-Munain, C., J. L. Roberts, and M. S. Krangel. 1998. Cooperation among multiple transcription factors is required for access to minimal T-cell receptor α -enhancer chromatin in vivo. *Mol. Cell Biol.* 18: 3223–3233.
37. Roberts, J. L., P. Lauzurica, and M. S. Krangel. 1997. Developmental regulation of VDJ recombination by the core fragment of the T cell receptor α enhancer. *J. Exp. Med.* 185: 131–140.
38. Giese, K., C. Kingsley, J. R. Kirshner, and R. Grosschedl. 1995. Assembly and function of a TCR α enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev.* 9: 995–1008.
39. Mayall, T. P., P. L. Sheridan, M. R. Montminy, and K. A. Jones. 1997. Distinct roles for P-CREB and LEF-1 in TCR α enhancer assembly and activation on chromatin templates in vitro. *Genes Dev.* 11: 887–899.
40. Ho, I. C., N. K. Bhat, L. R. Gottschalk, T. Lindsten, C. B. Thompson, T. S. Pappas, and J. M. Leiden. 1990. Sequence-specific binding of human Ets-1 to the T cell receptor α gene enhancer. *Science* 250: 814–818.
41. Travis, A., A. Amsterdam, C. Belanger, and R. Grosschedl. 1991. LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor α enhancer function (corrected). *Genes Dev.* 5: 880–894.
42. van de Wetering, M., M. Oosterwegel, D. Dooijes, and H. Clevers. 1991. Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J.* 10: 123–132.
43. Waterman, M. L., W. H. Fischer, and K. A. Jones. 1991. A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor C α enhancer. *Genes Dev.* 5: 656–669.
44. Giese, K., J. Cox, and R. Grosschedl. 1992. The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* 69: 185–195.
45. Hollenhorst, P. C., A. A. Shah, C. Hopkins, and B. J. Graves. 2007. Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family. *Genes Dev.* 21: 1882–1894.
46. Balmelle, N., N. Zamarreño, M. S. Krangel, and C. Hernández-Munain. 2004. Developmental activation of the TCR α enhancer requires functional collaboration among proteins bound inside and outside the core enhancer. *J. Immunol.* 173: 5054–5063.
47. Barndt, R., M. F. Dai, and Y. Zhuang. 1999. A novel role for HEB downstream or parallel to the pre-TCR signaling pathway during $\alpha\beta$ thymopoiesis. *J. Immunol.* 163: 3331–3343.
48. Zhuang, Y., P. Cheng, and H. Weintraub. 1996. B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB. *Mol. Cell Biol.* 16: 2898–2905.
49. Pan, L., S. Sato, J. P. Frederick, X.-H. Sun, and Y. Zhuang. 1999. Impaired immune responses and B-cell proliferation in mice lacking the *Id3* gene. *Mol. Cell Biol.* 19: 5969–5980.
50. Barndt, R., and Y. Zhuang. 1999. Controlling lymphopoiesis with combinatorial E-protein code. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* LXIV: 45–50.
51. Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall, and et al. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68: 855–867.
52. Shinkai, Y., S. Koyasu, K. Nakayama, K. M. Murphy, D. Y. Loh, E. L. Reinherz, and F. W. Alt. 1993. Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science* 259: 822–825.
53. Lauzurica, P., and M. S. Krangel. 1994. Enhancer-dependent and -independent steps in the rearrangement of a human T cell receptor δ transgene. *J. Exp. Med.* 179: 43–55.
54. Redondo, J. M., S. Hata, C. Brocklehurst, and M. S. Krangel. 1990. A T cell-specific transcriptional enhancer within the human T cell receptor δ locus. *Science* 247: 1225–1229.
55. Redondo, J. M., J. L. Pfohl, and M. S. Krangel. 1991. Identification of an essential site for transcriptional activation within the human T-cell receptor δ enhancer. *Mol. Cell Biol.* 11: 5671–5680.
56. Bert, A. G., J. Burrows, C. S. Osborne, and P. N. Cockerill. 2000. Generation of an imprinted luciferase reporter gene plasmid that employs a novel mechanism for high-copy replication. *Plasmid* 44: 173–182.
57. Spicuglia, S., D. Payet, R. K. Tripathi, P. Rameil, C. Verthuy, J. Imbert, P. Ferrier, and W. M. Hempel. 2000. TCR α enhancer activation occurs via a conformational change of a pre-assembled nucleo-protein complex. *EMBO J.* 19: 2034–2045.
58. Spicuglia, S., S. Kumar, J.-H. Yeh, E. Vachez, L. Chasson, S. Gorbach, J. Cautres, and P. Ferrier. 2002. Promoter activation by enhancer-dependent and -independent loading of activator and coactivator complexes. *Mol. Cell* 10: 1479–1487.
59. Chen, M.-L., and C.-L. Kuo. 2001. A conserved sequence block in the murine and human T cell receptor $J\alpha$ loci interacts with developmentally regulated nucleo-protein complexes in vitro and associates with GATA-3 and Octamer-binding factors in vivo. *Eur. J. Immunol.* 31: 1696–1705.
60. Hayakawa, J., S. Mittal, Y. Wang, K. S. Korkmaz, E. Adamson, C. English, M. Omichi, M. McClelland, and D. Mercola. 2004. Identification of promoters bound by c-Jun/ATF2 during rapid large-scale gene activation following genotoxic stress. *Mol. Cell* 16: 521–535.
61. Bernard, M., E. Delabesse, L. Smit, C. Millien, I. R. Kirsch, J. L. Strominger, and E. A. Macintyre. 1998. Helix-loop-helix (E2-5, HEB, TAL1 and Id1) protein interaction with the TCR $\alpha\delta$ enhancers. *Int. Immunol.* 10: 1539–1549.
62. Sawada, S., and D. R. Littman. 1993. A heterodimer of HEB and an E12-related protein interacts with the CD4 enhancer and regulate its activity in T-cell lines. *Mol. Cell Biol.* 13: 5620–5628.
63. Barndt, R. J., M. Dai, and Y. Zhuang. 2000. Functions of E2A-HEB heterodimers in T-cell development revealed by a dominant negative mutation of HEB. *Mol. Cell Biol.* 20: 6677–6685.
64. Pan, L., J. Hanrahan, J. Li, L. P. Hale, and Y. Zhuang. 2002. An analysis of T intrinsic roles of E2A by conditional gene disruption in the thymus. *J. Immunol.* 168: 3923–3932.
65. Engel, I., C. Johns, G. Bain, R. R. Rivera, and C. Murre. 2001. Early thymocyte development is regulated by modulation of E2A protein activity. *J. Exp. Med.* 194: 733–745.
66. Bain, G., I. Engel, E. C. Robanus Maandag, H. P. te Riele, J. R. Volland, L. L. Sharp, J. Chun, B. Huey, D. Pinkel, and C. Murre. 1997. E2A deficiency leads to abnormalities in $\alpha\beta$ T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol. Cell Biol.* 17: 4782–4791.
67. Merika, M., A. J. Williams, G. Chen, T. Collins, and D. Thanos. 1998. Recruitment of CBP/p300 by the IFN β enhanceosome is required for synergistic activation of transcription. *Mol. Cell* 1: 277–287.
68. Tsytyskova, A. V., and A. E. Goldfeld. 2002. Inducer-specific enhanceosome formation controls tumor necrosis factor α gene expression in T lymphocytes. *Mol. Cell Biol.* 22: 2620–2631.
69. Barthel, R., A. V. Tsytyskova, A. K. Barczak, E. Y. Tsai, C. C. Dascher, M. B. Brenner, and A. E. Goldfeld. 2003. Regulation of tumor necrosis factor α gene expression by mycobacteria involves the assembly of a unique enhanceosome dependent on the coactivator proteins CBP/p300. *Mol. Cell Biol.* 23: 526–533.
70. Ho, I. C., and J. M. Leiden. 1990. Regulation of the human T-cell receptor α gene enhancer: multiple ubiquitous and T-cell-specific nuclear proteins interact with four hypomethylated enhancer elements. *Mol. Cell Biol.* 10: 4720–4727.
71. Mueller, P. R., P. A. Garrity, and B. Wold. 1992. Ligation-mediated PCR for genomic sequencing and footprinting. In *Current Protocols in Molecular Biology*. F. M. Ausibel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, S. J.G., J. A. Smith, and K. Struhl, eds. John Wiley & Sons, New York, pp. 1–26.
72. Merika, M., and D. Thanos. 2001. Enhanceosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 205–208.
73. Amosti, D. N., and M. M. Kulkarni. 2005. Transcriptional enhancers: intelligent enhanceosomes or flexible billboards? *J. Cell. Biochem.* 94: 890–898.
74. Thanos, D., and T. Maniatis. 1995. Virus induction of human IFN β gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* 83: 1091–1100.
75. Falvo, J. V., A. M. Ugliarolo, B. N. Brinkman, M. Merika, B. Parekh, E. Y. Tsai, H. C. King, A. C. Morielli, E. G. Peralta, T. Maniatis, et al. 2000. Stimulus-specific assembly of enhancer complexes on the tumor necrosis factor α gene promoter. *Mol. Cell Biol.* 20: 2239–2247.
76. Tsai, E. Y., J. V. Falvo, A. V. Tsytyskova, A. K. Barczak, A. M. Reimold, L. H. Glimcher, M. J. Fenton, D. C. Gordon, E. F. Dunn, and A. E. Goldfeld. 2000. A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein p300 is recruited to the tumor necrosis factor α promoter in vivo. *Mol. Cell Biol.* 20: 6084–6094.
77. Bruhn, L., A. Munneryn, and R. Grosschedl. 1997. ALY, a context-dependent co-activator of LEF-1 and AML-1, is required for TCR α enhancer function. *Genes Dev.* 11: 640–653.

78. Yie, J., M. Merika, N. Munshi, G. Chen, and D. Thanos. 1999. The role of HMG-I(Y) in the assembly and function of the IFN- β enhanceosome. *EMBO J.* 18: 3074–3089.
79. Levanon, D., R. E. Goldstein, Y. Bernstein, H. Tang, D. Goldenberg, S. Stifani, Z. Paroush, and Y. Groner. 1998. Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 11590–11595.
80. Giese, K., A. Amsterdam, and R. Grosschedl. 1991. DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes Dev.* 5: 2567–2578.
81. Wotton, D., J. Ghysdael, S. Wang, N. A. Speck, and M. J. Owen. 1994. Cooperative binding of Ets-1 and core binding factor to DNA. *Mol. Cell Biol.* 14: 840–850.
82. Eyquem, S., K. Chemin, M. Fasseu, and B. J.-C. 2004. The Ets-1 transcription factor is required for complete pre-T cell receptor function and allelic exclusion at the T cell receptor β locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 15712–15717.
83. Bories, J. C., D. M. Willerford, D. Grevin, L. Davidson, A. Camus, P. Martin, D. Stehelin, and F. W. Alt. 1995. Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature* 377: 635–638.
84. Muthusamy, N., K. Barton, and J. M. Leiden. 1995. Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor. *Nature* 377: 639–642.
85. Barton, K., N. Muthusamy, C.-N. Fischer, C. N. Ting, T. L. Walunas, L. L. Lanier, and J. M. Leiden. 1998. The Ets1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity* 9: 555–563.
86. Walunas, T. L., B. Wang, C.-R. Wang, and J. M. Leiden. 2000. The Ets1 transcription factor is required for the development of NK cells in mice. *J. Immunol.* 164: 2857–2860.
87. Koop, B. F., L. Rowen, K. Wang, C. L. Kuo, D. Seto, J. A. Lenstra, S. Howard, W. Shan, P. Deshpande, and L. Hood. 1994. The human T-cell receptor TCRAC/TCRDC (C α /C δ) region: organization, sequence, and evolution of 97.6 kb of DNA. *Genomics* 19: 478–493.

Supplementary Table I.-Quantification of PCR analysis of E δ , E α , T α 1-T α 2, T α 1-T α 4 and E α MC *Tcrd* minilocus and endogenous *Tcra* locus rearrangements in sorted thymocyte populations of adult mice.

Enhancer	Line	Population	% V α J α rearrangement	% minilocus rearrangement	
E δ	A	DN1	0.00+/- 0.00	0.00+/-0.00	
		DN2	0.00+/-0.00	2.7+/-0.15	
		DN3	0.00+/-0.00	84.30+/-3.90	
		DN4	1.40+/-0.90	106.00+/-1.00	
		DP	100.00+/-0.00	114.00+/-0.50	
		$\gamma\delta$	0.00+/-0.00	111.00+/-0.50	
		$\alpha\beta$	87.2+/-10.60	100.00+/-0.00	
		E α	J	DN1	0.00+/- 0.00
DN2	0.00+/-0.00			1.20+/-0.67	
DN3	0.00+/-0.00			8.50+/-1.59	
DN4	6.70+/-0.67			25.90+/-1.13	
DP	100.00+/-0.00			95.50+/-17.31	
$\gamma\delta$	0.00+/-0.00			19.50+/-7.62	
$\alpha\beta$	108.40+/-11.50			100.00+/-0.00	
L	DN1			0.00+/- 0.00	0.00+/-0.00
	DN2		0.00+/-0.00	0.80+/-0.85	
	DN3		0.00+/-0.00	3.80+/-1.10	
	DN4		6.40+/-6.45	25.00+/-5.50	
	DP		100.00+/-0.00	118.30+/-11.95	
	$\gamma\delta$		0.00+/-0.00	5.00+/-0.25	
	$\alpha\beta$		74.60+/-24.60	100.00+/-0.00	
	M		DN1	0.00+/- 0.00	0.00+/-0.00
DN2			0.00+/-0.00	0.00+/-0.00	
DN3			0.00+/-0.00	1.80+/-0.70	
DN4			10.40+/-9.85	15.00+/-3.50	
DP			100.00+/-0.00	96.00+/-14.00	
$\gamma\delta$			0.00+/-0.00	3.50+/-2.45	
$\alpha\beta$			102.20+/-11.75	100.00+/-0.00	
T α 1-T α 2			T2	DN1	0.00+/- 0.00
	DN2			0.00+/-0.00	9.00+/-0.98
	DN3			0.00+/-0.00	26.50+/-6.30
	DN4	1.00+/-0.40		35.80+/-4.44	
	DP	100.00+/-0.00		107.00+/-2.85	
	$\gamma\delta$	0.00+/-0.00		18.90+/-3.63	
	$\alpha\beta$	88.80.2+/-13.64		100.00+/-0.00	
	T5	DN1		0.00+/- 0.00	1.10+/-0.55
		DN2	0.00+/-0.00	4.10+/-2.45	
		DN3	0.00+/-0.00	22.40+/-1.35	
		DN4	8.60+/-4.35	67.20+/-19.40	
		DP	100.00+/-0.00	68.40+/-0.45	
		$\gamma\delta$	0.00+/-0.00	42.50+/-11.05	
		$\alpha\beta$	71.30.2+/-28.65	100.00+/-0.00	

T α 1-T α 4	C2	DN1	0.00+/- 0.00	0.00+/-0.00
		DN2	0.00+/-0.00	0.50+/-0.50
		DN3	0.00+/-0.00	3.30+/-1.80
		DN4	16.60+/-12.98	4.90+/-2.02
		DP	100.00+/-0.00	84.80+/-11.65
		$\gamma\delta$	0.00+/-0.00	3.60+/-1.57
		$\alpha\beta$	73.80+/-11.49	100.00+/-0.00
		C3	DN1	0.00+/- 0.00
	DN2		0.00+/-0.00	0.30+/-0.30
	DN3		0.00+/-0.00	3.40+/-1.82
	DN4		3.70+/-0.61	16.90+/-3.07
	DP		100.00+/-0.00	89.10+/-5.93
	$\gamma\delta$		0.00+/-0.00	1.10+/-1.15
	$\alpha\beta$		81.30+/-1.30	100.00+/-0.00
	C4		DN1	0.00+/- 0.00
		DN2	0.00+/-0.00	2.10+/-0.75
		DN3	0.00+/-0.00	12.00+/-0.55
		DN4	8.10+/-1.43	45.80+/-6.12
		DP	100.00+/-0.00	92.70+/-7.23
		$\gamma\delta$	0.00+/-0.00	25.90+/-0.20
		$\alpha\beta$	120.50+/-14.50	100.00+/-0.00
		C9	DN1	0.00+/- 0.00
	DN2		0.00+/-0.00	0.00+/-0.00
	DN3		0.00+/-0.00	2.80+/-0.30
	DN4		1.00+/-0.50	10.00+/-2.40
	DP		100.00+/-0.00	120.20+/-23.75
	$\gamma\delta$		0.00+/-0.00	2.80+/-0.25
	$\alpha\beta$		67.20+/-30.60	100.00+/-0.00
E α MC	JS		DN1	0.00+/- 0.00
		DN2	0.00+/-0.00	0.80+/-0.00
		DN3	0.00+/-0.00	38.70+/-5.60
		DN4	5.00+/-4.05	50.40+/-13.75
		DP	100.00+/-0.00	92.10+/-7.85
		$\gamma\delta$	0.00+/-0.00	37.10+/-10.30
		$\alpha\beta$	90.30+/-25.95	100.00+/-0.00
		JU	DN1	0.00+/- 0.00
	DN2		0.00+/- 0.00	0.20+/-0.25
	DN3		0.00+/- 0.00	25.30+/-0.80
	DN4		6.80+/- 0.60	25.40+/-4.60
	DP		100.00+/- 0.00	100.00+/-0.00
	$\alpha\beta$		83.30+/-10.60	100.00+/-0.00

Blot hybridization signals from several experiments were quantified using a PhosphorImager. Mean % rearrangement values +/- SEM for each cell population is presented. Endogenous V α J α rearrangement was normalized to the C δ signal for each sample to take into account DNA loading and expressed in relation to the signal in DP

(defined as 100%). Transgene V δ D δ J δ rearrangement was normalized to the C δ signal for each sample and then expressed in relation to the signal in $\alpha\beta$ T-cells (defined as 100%). The number of replicates (n) were: n=3 for line A, n=4 for line J, n=3 for line L, n=3 for line M, n=3 for line T2, n=3 for line T5, n=3 for line C2, n=3 for line C3, n=3 for line C4, n= 3 for line C9, n=3 for line JS and n=3 for line JU.

CONCLUSIONES

A1. Mediante ensayos combinados de ChIP y *footprinting* genómico, hemos caracterizado el enhanceosoma de $E\alpha$ en vivo en timocitos de ratón, confirmando la unión de las proteínas ATF-2, CREB-1, GATA-3 y Ets-1, e identificando, por primera vez, la unión de las proteínas Fli-1, Sp1, HEB y E2A.

A2. Hemos determinado la unión de distintas proteínas E a las distintas cajas E presentes en $E\alpha$. HEB se une específicamente a la caja E III, mientras que las cajas E I y II están probablemente ocupadas por dímeros de proteínas E2A. Estos datos apoyan que las distintas cajas E sean ocupadas por distintas combinaciones de proteínas E, estableciendo las bases moleculares para los papeles diferenciales que tienen estas proteínas durante el desarrollo de los timocitos.

A3. Hemos generado, de forma inesperada, un enhancer transcripcional y recombinacional muy potente, $E\alpha$ MC, mediante la sustitución de los sitios esenciales runx/ets de $T\alpha 2$ por los sitios myb/runx de $\delta E3$.

A4. El enhancer quimérico $E\alpha$ MC no es capaz de regular adecuadamente la temporalidad de los reordenamientos que dirige en el contexto de una construcción reportera de recombinación V(D)J en ratones transgénicos, siendo éstos detectados de forma prematura en una población de timocitos DN3, de forma indistinguible a los detectados cuando estos reordenamientos están dirigidos por el fragmento $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$.

A5. Estos resultados indican que $T\alpha 3$ - $T\alpha 4$ no es capaz de retrasar la activación de un enhancer temprano, como es el caso de $E\alpha$ MC, y que se necesita la colaboración funcional entre las proteínas que se unen a los sitios runx y ets de $T\alpha 2$ con los factores que se unen a $T\alpha 3$ - $T\alpha 4$ para impartir la correcta activación de $E\alpha$ durante el desarrollo de los timocitos.

A.6. En función de los puntos anteriores, podemos concluir que: $E\alpha$ está ocupado por un amplio conjunto de proteínas que cooperan entre sí para formar un enhanceosoma funcional en vivo, y la composición de las proteínas que lo forman puede ser más flexible y versátil de lo que se había pensado hasta ahora. La posibilidad del ensamblaje de distintos grupos de proteínas en $E\alpha$ durante el desarrollo puede representar una forma más flexible de procesamiento de la información para la regulación del locus *Tcra*.

***B. Activación de $E\alpha$ por factores
inducibles por la señalización a
través del pre-TCR***

RESUMEN

$E\alpha$ es esencial para la activación de la transcripción germinal y la recombinación V(D)J del locus *Tcra* mediada por el pre-TCR. $E\alpha$ está considerado como un paradigma de enhanceosomas, ya que se activa a través de la unión cooperativa y el sinergismo funcional de múltiples factores de transcripción. Existe una paradoja desde hace años, basada en el hecho que la activación de $E\alpha$ ocurre en vivo en ausencia de diferencias detectables en la ocupación del enhancer en experimentos de *footprinting* genómico utilizando dimetilsulfato. Nuestros datos proporcionan el mecanismo molecular para la activación de $E\alpha$, así como una explicación para esta paradoja. Hemos encontrado que la activación de la transcripción germinal dependiente del locus *Tcra* depende de una señalización constante mediada a través de PLC γ -, así como por las quinasas MAPK/ERKs y la calcineurina, indicando que factores de transcripción inducibles participan de forma crucial en este proceso. Los factores de transcripción NFAT, AP-1 y Egr-1, junto con los coactivadores CBP/p300, se unen a $E\alpha$ como parte de un enhanceosoma activo ensamblado durante la señalización a través del pre-TCR. Nuestros datos apoyan un escenario, en el cual la unión de factores de transcripción específicos del sistema linfóide y factores constitutivos se unen a $E\alpha$ antes de su activación, creando una plataforma molecular para el reclutamiento de otros factores inducibles a través de la señalización por el pre-TCR. Por lo tanto, el ensamblaje combinatorio de factores de transcripción específicos de señalización y de tejido determina la función de $E\alpha$. Este mecanismo para la activación de un enhancer podría representar un paradigma general en la regulación de genes específicos de tejido y de respuesta a estímulos.

***Tcra* enhancer activation by inducible transcription factors downstream of pre-TCR signaling¹**

Running title: Inducible E α enhanceosome at β -selection

Beatriz del Blanco^{*}, David L. Wiest[¶] and Cristina Hernández-Munain^{2*}

^{*}Department of Cellular Biology and Immunology. Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (IPBLN). Consejo Superior de Investigaciones Científicas. CSIC. Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud. Avda. del Conocimiento s/n. 18100-Armilla. Granada. Spain.

[¶]Fox Chase Cancer Center. 333 Cottman Avenue. Philadelphia, PA 19111-2497. USA.

Correspondence to:

²Cristina Hernández-Munain: Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. CSIC. Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud. Avda. del Conocimiento s/n. 18100-Armilla. Granada. Spain. Tel: 34-958-181646; Fax: 34-958-181632.

Email: chmunain@ipb.csic.es

Keywords: T cell receptor alpha; enhancer; transcription factors; gene regulation; V(D)J recombination; gene rearrangement; pre-TCR signal transduction.

ABSTRACT

The *Tcra* enhancer ($E\alpha$) is essential for pre-TCR-mediated activation of germline transcription and V(D)J recombination. $E\alpha$ is considered as a paradigm for enhanceosomes acting through functional synergy and cooperative binding of multiple transcription factors. A long-standing paradox exists regarding $E\alpha$ activation in absence of differences in enhancer occupancy based on dimethylsulfate genomic footprinting experiments. Our data provide the molecular mechanism for $E\alpha$ activation, as well as an explanation for this paradox. We found that *Tcra* germline transcriptional activation is dependent on constant phospholipase $C\alpha$ -, as well as calcineurin- and MAPK/ERK-mediated signaling, indicating that inducible transcription factors are crucially involved. NFAT, AP-1 and early growth response factors, together with CREB-binding protein/p300 coactivators, bind to $E\alpha$ as part of an active enhanceosome assembled during pre-TCR signaling. We favor a scenario in which binding of lymphoid-restricted and constitutive transcription factors to $E\alpha$ prior to its activation forms a regulatory landscape for recruiting factors induced by pre-TCR signaling. Thus, combinatorial assembly of tissue- and signal-specific transcription factors determines $E\alpha$ function. This mechanism for enhancer activation may represent a general paradigm in tissue-restricted and stimulus-responsive gene regulation.

INTRODUCTION

The generation of $\alpha\beta$ T-lymphocytes requires the construction of a TCR complex through a highly ordered series of somatic gene rearrangement events at the TCR α and TCR β loci (*Tcra* and *Tcrb*) during T cell development. Thymocytes mature through a series of stages that are identified by expression of surface receptors. Most immature thymocytes, known as double-negative (DN) thymocytes, are CD4⁻CD8⁻. DN thymocytes can be distinguished in four populations (DN1-4) based on the expression of CD25 and CD44. *Tcrb* rearrangements are completed at the DN3 stage. DN3 thymocytes can be subdivided in two populations, those that have not yet undergone TCR β -selection (DN3a) and those that have (post-TCR β selected DN3b), based on the expression of CD27 [1]. DN3a thymocytes that successfully have rearranged a *Tcrb* allele differentiate to DN3b, DN4 and CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) thymocytes, in a process known as β -selection. This process is driven by signaling through the pre-TCR, which comprises a TCR β and the invariant pre-T α , and through cooperating NotchRs. Pre-TCR signaling is sufficient for *Tcrb* allelic exclusion and activation of *Tcra* transcription and rearrangement, but not for DN to DP differentiation [2]. Among the transcription factors induced by pre-TCR signaling, it has been well established that NFAT, AP-1 and early growth response factors (Egr) are essential for β -selection [3-6]. NFAT2 and Egr-1/3 factors are especially interesting since they are sufficient for traversal of the β -selection checkpoint [5, 7-9], collaborating functionally for such function [10]. At present, little is known on the molecular targets for these inducible transcription factors during thymocyte differentiation.

Tcra germline transcription is required for V α -to-J α recombination [11]. All V α J α rearrangements, with the exception of a few V α 2 rearrangements that occur in DN cells by action of the *Tcrd* enhancer (E δ)[12], depend on the *Tcra* enhancer (E α) [13]. E α influences chromatin structure across a 500-kb region that includes the 65-kb J α array and the proximal third part of the 1.5-megabase V α array [14]. Initial *Tcra* germline transcription depends on the T early- α promoter (TEA) and J α 49 promoter (J α 49p), which are activated by action of E α , and is required for activation of primary V α -to-J α recombination [15]. A notable aspect of E α , as a critical regulator of *Tcra* locus rearrangements, is its strict regulation during thymocyte development. Since the *Tcrd* locus is positioned between V α and J α gene segments at the combined *Tcrad* locus, V α -to-J α rearrangements determine the *Tcrd* locus to be deleted from the chromosome. Hence, E α -dependent developmental control of *Tcra* rearrangement is a critical component of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T-cell lineage commitment. E α is inactive in DN1 to

DN3a thymocytes when these cells are trying to rearrange successfully their *Tcrd* locus; being its activity first detected after pre-TCR signaling in DN4 thymocytes coincidentally with detection of *Tcra* germinal transcripts [1, 16, 17].

$E\alpha$, defined as a 275-bp fragment containing four elements for protein binding ($T\alpha 1$ - $T\alpha 4$), is the minimal fragment required for proper developmental regulation [18]. $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ is considered the core enhancer since it is the smallest fragment with transcriptional activity *in vitro* [19], and it is thought to be controlled by a compact nucleoprotein structure, enhanceosome, formed by functional synergy and cooperative binding to enhancer DNA among specific transcription factors [20, 21]. Known factors bound to $T\alpha 1$ - $T\alpha 4$ comprise lymphoid-specific factors constitutively present during thymocyte development (Fig. 1).

Previous genomic footprinting experiments using dimethylsulfate (DMS) showed that occupancy of $E\alpha$ is indistinguishable between DN3a and DP thymocytes indicating that proteins bound in both cell stages must be identical or very closely related [17, 22, 23]. However an extensive opening of $E\alpha$ chromatin was detected in

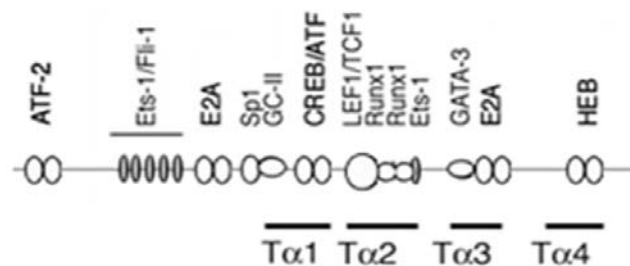


Figure 1. $E\alpha$ structure. Diagram depicts location of $T\alpha 1$ - $T\alpha 4$ regions as well as described constitutive bound factors.

the DN3a to DP transition suggesting that the protein complex formed on $E\alpha$ is more compact in DP than in DN3a cells [18, 22]. Here, we have employed both a SCID mouse-derived DN3a cell line that can be induced to differentiate to the DN4 stage through $CD3\epsilon$ -transduced signaling (SCID.adh) and thymocytes from *Rag2*^{-/-} and *Rag2*^{-/-} x *Tcrb* ($Rx\beta$) mice [16, 24, 25] as models that mimic pre-TCR signaling, but maintain the *Tcra* in germline configuration, in order to study the requirements for induction of *Tcra* transcription during β -selection. We have found that activation of phospholipase $C\gamma$ ($PLC\gamma$) elicits a set of inducible transcription factors that assemble into a functional enhanceosome by binding to multiple sites within $E\alpha$, thereby activating germline transcription at *Tcra*. Our data is consistent with a model that proposes that in DN3a thymocytes, $E\alpha$ is occupied by lymphoid-restricted and constitutively expressed transcription factors. $E\alpha$ in this pre-activated and occupied state serves as a regulatory platform to which additional pre-TCR-inducible transcription factors are transitory recruited, thereby activating it, and inducing *Tcra*

germline transcription from the TEA and J α 49p and initiating V α J α recombination. This mechanism for E α activation involving the combinatorial assembly of tissue- and signal-specific transcription factors not only provides an explanation for the long-standing paradox regarding why activation of this enhancer was not accompanied by obvious detectable differences in the DMS footprinting of bound proteins, but also may represent a general paradigm in tissue-restricted and stimulus-responsive gene regulation. Furthermore, our data about the functional regulation of E α by inducible transcription factors during thymocyte development might have important implications for T-cell maturation.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines and mice

SCID.adh (TAC:CD3 ϵ) (SCID.adh) cells were previously described [16] and were maintained in IMDM supplemented with 10% FBS and standard amounts of glutamine, penicillin, streptomycin, non-essential amino acids, sodium pyruvate and 50 μ M of 2-ME. Jurkat cells were maintained in RPMI supplemented with 10% FBS and standard amounts of glutamine, penicillin and streptomycin.

Rag2^{-/-} and *Rx β* mice [24, 25] were purchased from Taconic and maintained at pathogen-free conditions within the Animal House at the IPBLN. Animal use adhered to IPBLN and CSIC Bioethical Guidelines.

***In vitro* cell stimulation**

SCID.adh cells (1×10^5 cells/ml) were stimulated in culture with α TAC from the hd245/332 hybridoma [26], PMA (50 ng/ml), ionomycin (1 μ g/ml), PMA (20 ng/ml) and ionomycin (0.5 μ g/ml), or thapsigargin (50 nM) at 37°C with 5% CO₂. For inhibition assays with cyclosporine A (CsA)(0.5-1 μ g/ml), TMB-8 (1 mM), EGTA (10 mM), UO124 (10 μ M), UO126 (10 μ M) or PD98059 (30 μ M) (Calbiochem), inhibitors were added 1 h before stimulation. Thymocytes from 4-8 week old mice (4×10^6 cells/ml) were stimulated in complete RPMI medium containing PMA and ionomycin at 37°C with 5% CO₂. For inhibition assays with U73122, 10 μ M inhibitor was used in cultures at 0.2-0.5 $\times 10^6$ thymocytes/ml. Cells were harvested at the indicated times.

RT-PCR

RNA was isolated using TRIzol (Invitrogen). 200 U of M-MLV RT (Invitrogen) and 300 ng of hexaprimers were used to synthesize cDNA from 100-400 ng of total RNA. PCR conditions were performed as described [8, 11]. Amplified fragments were detected using radiolabeled probes and quantified at a PhosphorImager (Molecular Dynamics). For real-time RT-PCR, templates were assessed with reported primers [1] using IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) at a Bio-Rad iCycler thermocycler. Expression levels of transcripts were normalized to that of *Actb* in each sample.

EMSAs

rNFAT1-DBD was purified as preciously described [27] and rEgr-1 was obtained from Enzo Life Sciences. Human T α 1-T α 2 and T α 3-T α 4 fragments were obtained as reported [18]. Mouse T α 1-T α 2 and T α 3-T α 4 fragments were obtained by PCR using a murine 2.5-kb *SalI-EcoRI* E α fragment inserted in pBluescript KS⁺ as a template, and oligonucleotides MT α 1(5'): 5'-CAGGTGTTTGGGTCTGA and MT α 2(3'): 5'-TAACTCCTCTTTCCAGAG, or MT α 3(5'): 5'-AAAATACAGAGTTAGAGATAAG and MT α 4(3'): 5'-GGTGTACCACCAAGAC. Consensus binding site (CS) and mutant consensus binding site (mCS) oligonucleotide sequences were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Nuclear extracts were prepared according to [28], with modifications. SCID.adh cells (10⁷) were washed in 10 ml of PBS and incubated for 15 min in 300 μ l of ice-cold buffer A (10 mM Tris-ClH, pH:7.9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF and a cocktail of protease inhibitors (Roche)) in a 1.5 ml tube. Nonidet P-40 was added from a 10% stock solution to a final concentration of 0.4% and samples were vortexed for 10 sec. After a 3 min-incubation on ice, nuclei were centrifuged for 3 min at 15,000 x g at 4°C, washed in cold-ice buffer A, resuspended in 100 μ l of ice-cold buffer C (20 mM Tris-HCl, pH:8, 0.4 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF and protease inhibitors) and incubated at 4°C by rotation for 30 min. Nuclear extracts were separated from debris by centrifugation at 15,000 g for 15 min at 4°C. Glycerol was added to a final concentration of 25%. Protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad). For EMSAs, SCID.adh nuclear extracts (2 μ g), rNFAT-DBD or rEgr-1 proteins were incubated with 1 μ g of poly(dI-dC) carrier and 1 μ g of BSA in a 30 μ l mix containing 10 mM Tris-HCl, pH:7.9, 50 mM NaCl, 1mM DTT, and 5% glycerol for 30 min at 4°C in presence or absence of 12.5-25-fold excess of unlabeled Cs or mCS competitors. Reactions may also include 1 μ g of indicated Ab and incubated for 30 min at room temperature. All Abs were purchased to Santa Cruz Biotechnology, except for the c-Jun Ab (Becton-Dickinson). ³²P-radiolabeled probes (80 fmols, \approx 5-10 x 10⁴ cpm) were added for an additional 20 min of incubation at 4°C. Samples were electrophoresed through a 4% PAGE gel containing 22.5 Tris-borate and 0.5 mM EDTA at 4°C.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIPs were conducted with modifications as previously described [23]. SCID.adh (2 x10⁶/ml) cells or thymocytes (5 x 10⁶ /ml) were crosslinked in culture

medium by adding formaldehyde to 1% (v/w) and incubated for 10 min at room temperature, except for cells to be used in ChIPs with the NFAT4 Ab that were crosslinked for 20 min at room temperature. The reaction was stopped by adding glycine to 0.125 M and incubated for 5 min at room temperature. After two washes in PBS, SCID.adh cells (10^7) or thymocytes (1.5×10^7) were resuspended in 500 μ l of 1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH:8.1), 1 mM PMSF and protease inhibitors, and incubated for 10 min on ice. Cell suspension was sonicated using a Branson sonicator at 50% of duty alternating 20 sec on and 2-5 min off for 13 cycles (for a 10 min fixed sample) or 18 cycles (for a 20 min fixed sample) while sample was immersed in an ice/water bath. Chromosomal DNA was reduced to an average size of 200-500 bp as determined by gel analysis. Lysate was centrifuged for 30 min at 20,000 x g at 4°C, and supernatant diluted 10-fold by adding 4.5 ml of 0.01% SDS, 1.1% (v/v) Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-ClH (pH:8.1), 167 mM NaCl, 1 mM PMSF and protease inhibitors. 5% of starting material (250 μ l) was saved as input for PCR detection. Chromatin was precleared by incubation for 2-3 h at 4°C with 150 μ l of 50% salmon sperm DNA/protein A-agarose slurry, prepared as recommended by the manufacturer (Upstate Biotechnology). Precleared chromatin corresponding to 5×10^7 SCID.adh cells or 7×10^7 thymocytes (~ 2.3 ml) was used for ChIP by incubation for 16 h at 4°C with 10 μ g of specific or isotype-matched controls Abs in polystyrene tubes, followed by 70 μ l of protein A-agarose slurry, 600 μ g of BSA and 40 μ g of sonicated salmon sperm DNA for an additional 1-1.5 h incubation at 4°C. Immunoprecipitates were transferred to 1.5 ml tubes and washed by rocking for 5 min at room temperature with the following ice-cold buffers (containing protease inhibitors): 1) Buffer A; 2) 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH:8.0), 150 mM NaCl; 3) 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH:8.0), 500 mM NaCl; 4) 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholic acid, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH:8.0), 250 mM LiCl; and twice with 5) 10 mM Tris-HCl (pH:8.0), 1 mM EDTA. DNA/Protein/Ab complexes were eluted from protein A-agarose slurry by heating at 65°C for 2 min and rocking for 15 min at room temperature twice in 250 μ l of 50 mM NaHCO₃, 1% SDS. Complexes were treated with 20 μ g of RNase A at 37°C for 1h and 20 μ g of proteinase K at 45°C for 1 h, extracted once with phenol/chloroform and twice with chloroform, and precipitated with ethanol to purify DNA. DNA was resuspended in 30 μ l of water for subsequent PCR analysis as a template for semiquantitative PCR to evaluate the presence of *E α* and *Oct2* sequences using primers previously described [29], using 4 μ l of Ab-bound DNA (equivalent to 13,3% of total Ab-bound material) or 4 μ l of 1/100, 1/200 and 1/400 diluted input DNA (equivalent to 0.0033-0,0008% of the starting

material used at each CHIP). PCR conditions were: 5 min at 95°C, followed by 25 cycles of 25 s at 94°C, 25 s at 55°C, 50 s at 72°C, and a final extension step of 2 min at 72°C. PCR products were resolved by 1.5% agarose gels, blotted, hybridized with ³²P-labeled probes and quantified at a PhosphorImager.

Construction of reporter plasmids and luciferase assays

J α 49-firefly *luciferase* (LUC), LUC-E α and J α 49-LUC-E α (called here as J α 49p, E α 386 and J α 49p-E α 386, respectively) pXPG plasmids were previously described [15]. E α 440 fragment was obtained by PCR with primers 5'-GTCTCCGAATTCAGACATTGAGTCAGTAGCC and the same 3' primer previously used to clone E α 386 in pXPG [15], that include introduced *EcoRI* sites. After digestion with *EcoRI*, E α 440 was cloned into the unique *EcoRI* site downstream of LUC in pXPG and in J α 49p, to generate LUC-E α 440 and J α 49p-LUC-E α 440 (here called as J α 49p-E α 440). TEA fragment was obtained by PCR with primers 5'-CTGATGTCCCGGGCCCTACCTCTG (with an introduced *SmaI* site) and 5'-GACAGTCAAGCTTCTAGTGTCTGTATTTCATC (with an introduced *HindIII* site). To generate TEA-LUC (here called here as TEA), TEA-LUC-E α 386 (called here as TEA-E α 386) and TEA-LUC-E α 440, the 673-bp *SmaI-HindIII* fragment was cloned into the unique *SmaI* and *HindIII* sites upstream of LUC in either pXPG. To generate V δ 1 promoter (V δ 1p)-LUC, V δ 1p-LUC-E α 386 and V δ 1p-LUC-E α 440 (called here as V δ 1p, V δ 1p-E α 386 and V δ 1p-E α 440, respectively), the 1.6-kb V δ 1p fragment was excised from the V δ 1-CAT construct [30] by digestion with *ScaI* and *HindIII* and cloned into the *ScaI* and *HindIII* sites of pXPG or derivative plasmids. The structures of all PCR products were confirmed by sequencing. 3xNFAT [31] and 9xNFAT [32] were previously described. Jurkat cells (4×10^6) were transfected with 5 μ g of a LUC reporter plasmid plus 10 ng of pRL-TK (renilla *luciferase* plasmid; Promega) by electroporation in 300 μ l of ice-cold RPMI medium at 260 V, 80 Ohms and 1,500 μ F in 0.4-cm gap BTX cuvettes. 500 μ l of ice-cold inactivated FBS were added immediately to the cuvette and cells were kept for 15 min on ice, diluted in 3-5 ml of complete medium in 25 cm² flasks or 6-well plates, and cultured at 37°C with 5% CO₂ for 24 h, after which cells were lysed and luciferase activity (firefly/renilla) was measured with a Dual-Luciferase-Kit(Promega)

RESULTS

Both calcineurin/Ca²⁺ and MAPK/ERK signaling pathways are required for induction of germline *Tcra* transcription

In order to study the molecular mechanisms for induction of germline transcription at *Tcra* by pre-TCR signaling, we sought to establish an *in vitro* system that allow us to analyze the proximal signaling events involved in this process. SCID.adh (TAC:CD3 ϵ) cells (here denoted SCID.adh cells) were previously established as an excellent cellular system for studying the molecular mechanisms for pre-TCR signaling by stimulation through a chimeric CD25:CD3 ϵ surface protein [16]. These cells resemble the phenotype of DN3a thymocytes and express pre-T α transcripts. CD3 ϵ -induced changes in these cells include downregulation of *Cd25*, *Rag1*, *Rag2* and *pre-Ta* transcripts, and upregulation of *Cd5*, *Cd27*, *Cd28*, *Egr1*, *Egr2*, *Egr3* and germline *Tcra*-C α transcripts [8, 16]. Consistent with previous data, stimulation of these cells with CD25 (TAC) Ab induced the reported changes, including induction of *Egr1* and *Egr3*, and C α transcripts (Fig. 2A). These changes are identical to those induced in normal DN3a thymocytes during β -selection [1, 33].

In an attempt to dissect the signaling requirements for such induction during β -selection, we evaluated total C α transcripts after cell stimulation with phorbol esters, such as PMA, and/or Ca²⁺ ionophores, such as ionomycin or thapsigargin (Fig. 2B and 2C). C α transcription was activated by all three stimuli. Quantitative analysis of C α transcripts induced by the different treatments revealed that Ca²⁺-mediated signaling was the major contributor for activation of germline *Tcra* transcription, as C α transcripts were induced much more robustly by ionomycin or thapsigargin treatment than by PMA treatment (Fig. 2D). As a control for treatment specificity, induction of *Egr1* and *Egr3* transcripts was also analyzed (Fig. S2). *Egr1* transcription was specifically induced by sustained PKC activation by PMA treatment, whereas *Egr3* transcription was more dependent upon activation of Ca²⁺-mediated signaling as expected [34, 35]. These data indicate that Ca²⁺-mediated signaling is by far the most relevant pathway involved in inducing *Tcra* germline transcription in SCID.adh cells.

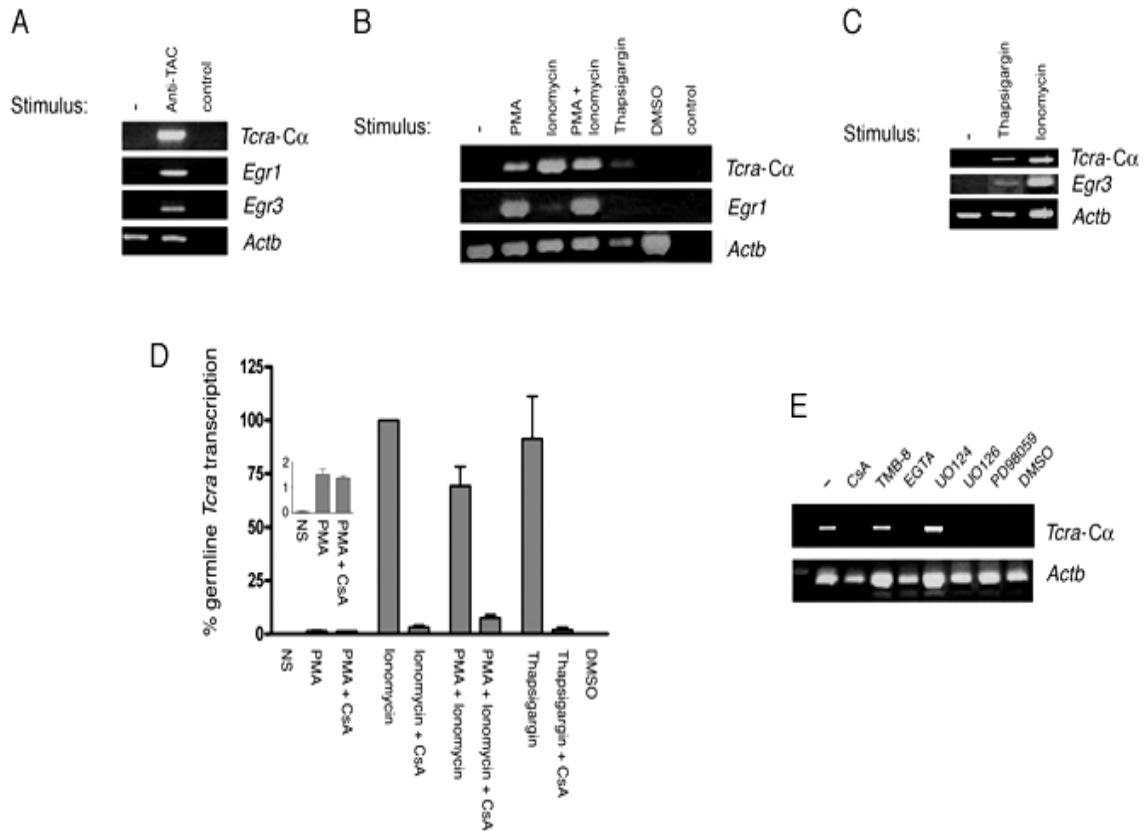


Figure 2.- Both calcineurin/ Ca^{2+} - and MAPK/ERK-mediated signaling pathways are required for induction of germline *Tcra* transcription. (A-C) Analysis by RT-PCR in unstimulated or stimulated SCID.adh cells with α TAC or the indicated stimuli. (D) Analysis by real time RT-PCR in unstimulated (NS) or stimulated cells with the indicated stimuli, and in absence or presence of CsA. Expression levels of transcripts were normalized to that of *Actb* in each sample and expressed as a percentage of the level of *C α* transcripts in ionomycin treated cells. Data represent the mean \pm s.e.m. of 2-3 determinations from two independent experiments. (E) Analysis by RT-PCR in stimulated cells in absence or presence of the indicated inhibitors. Results in A-C and E are representative of three experiments.

To investigate whether Ca^{2+} -mediated signaling is activating *C α* transcripts through a calcineurin-dependent pathway, we pretreated cells with CsA before stimulation (Fig. 2D and 2E). In agreement with previous studies that found that CsA completely inhibits α TAC-induced *Egr3* and *C α* induction in SCID.adh cells [10], we found that CsA totally blocked induction of *Egr3* and *C α* transcripts in cells stimulated with ionomycin or thapsigargin (Fig. 2D and S2). These results demonstrate that the

calcineurin/NFAT signaling pathway is essential for activation of *Tcra* germline transcription.

In order to evaluate whether the MAPK/ERK signaling pathway is required, in addition to that of calcineurin/NFAT, for induction of germline *Tcra* transcripts, we treated cells with specific inhibitors for MAPK/ERK- or Ca^{2+} -mediated pathways before cell stimulation (Fig. 2E). Consistent with the requirement of a sustained Ca^{2+} plateau for NFAT activation [4], the intracellular Ca^{2+} chelator TMB-8, that inhibits only the initial release of Ca^{2+} from intracellular stores but not the Ca^{2+} that enters through the plasma membrane, did not suppress $\text{C}\alpha$ transcripts in stimulated cells. However, chelation of extracellular Ca^{2+} with EGTA, which inhibits the entrance of Ca^{2+} to the cell and NFAT nuclear translocation totally abrogated induction of $\text{C}\alpha$ transcripts. In addition to specific inhibitors of Ca^{2+} -mediated signaling, pre-treatment of cells with PD98059 (MAPK inhibitor) and UO126 (ERK inhibitor), but not with its control UO124, also inhibited the induction of $\text{C}\alpha$ transcripts, suggesting that transcription factors induced through the MAPK/ERK pathways are also involved in the activation of *Tcra* germline transcription. Induction of *Tcra* germline transcripts by independent MAPK/ERK or Ca^{2+} signaling pathways in SCID.adh cells is most probably due to the bioavailability of low levels of endogenous NFAT or Egr factors in some cells before their activation [10]. All together, our data indicate that both calcineurin/NFAT- and MAPK/ERK-mediated pathways are essential for induction of germline *Tcra* transcription during β -selection.

NFAT, AP-1 and Egr factors bind specifically to multiple sites within $\text{E}\alpha$

Our functional data suggest an essential role for Ca^{2+} /calcineurin-dependent transcription factors, such as NFAT, together with MAPK/ERK-dependent transcription factors, such as AP-1 and Egr-1, in germline *Tcra* transcriptional induction. Comparing the nucleotide sequences of the human and murine $\text{E}\alpha$ with with rVista, MatInspector and Transfact programs [36-38], we identified ten conserved putative sites for NFAT (GGA motifs with 3'-adenine tracts) and four for AP-1 within 5'T α 1 and T α 1-T α 2, and several for Egr factors within 5'T α 1, T α 1-T α 2 and 3'T α 4 (Fig. 3A and S1). Of the ten possible $\text{E}\alpha$ NFAT sites, five are located within a 30-bp region upstream of T α 1 (5'T α 1)(sites 1-5), two in an 11-bp segment within T α 1 (sites 6-7) and three in a 26-bp region within T α 2 (sites 8-10). The four possible AP-1 sites are located at 5'T α 1 (site 1), T α 1 (site 2), T α 2 (site 3) and 3'T α 2 (site 4). Although the $\text{E}\alpha$ AP-1 and NFAT sites are not oriented in a way that allows for cooperative complex formation, these factors

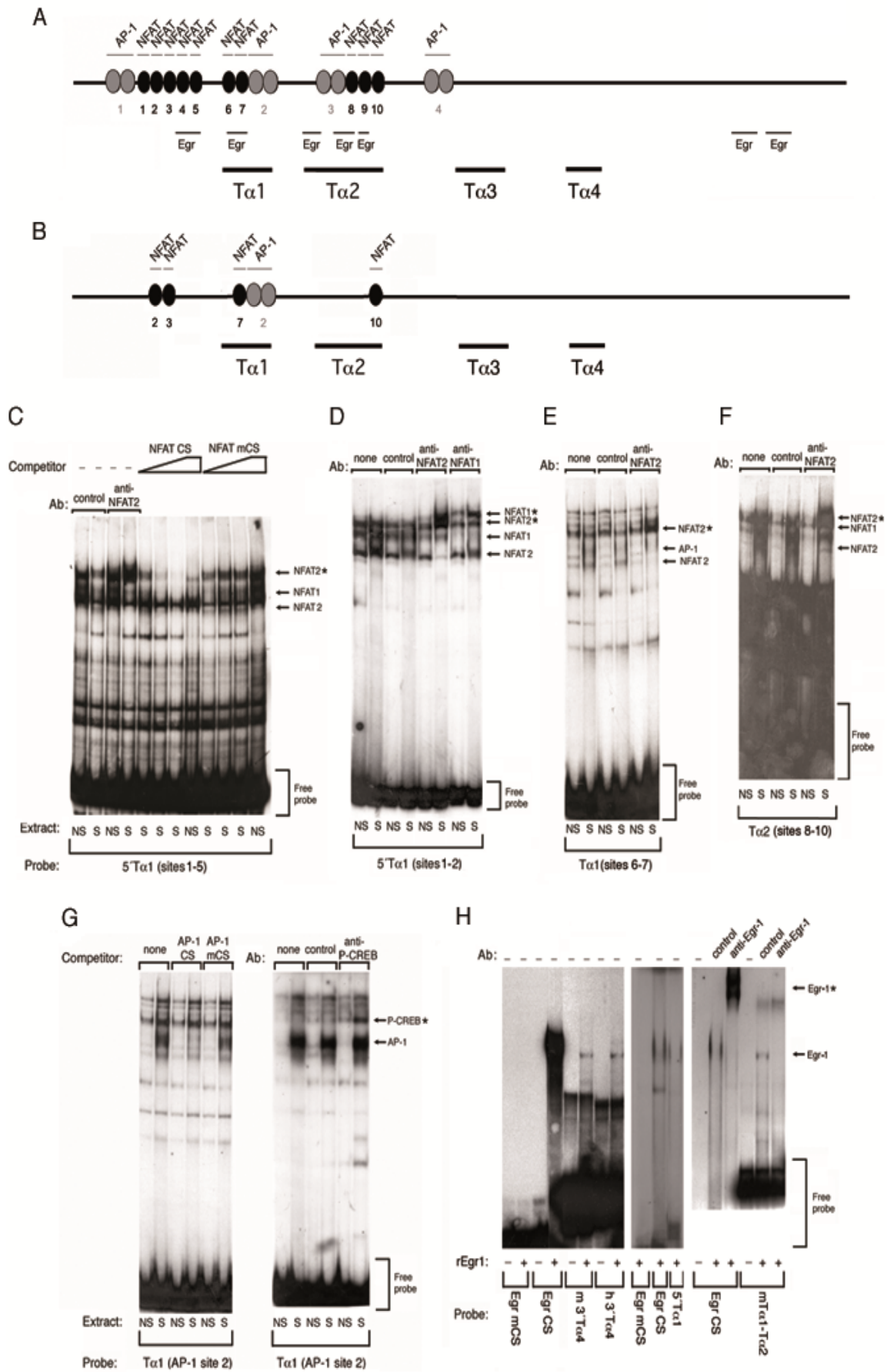


Figure 3.- NFAT, AP-1 and Egr-1 factors bind specifically to several sites within T α 1-T α 2 and flanking regions. (A) The diagram depicts the putative NFAT, AP-1 and Egr sites present in E α and flanking regions. (B) The diagram depicts confirmed sites for inducible factors present in 5'T α 1 and T α 1-T α 2. (C-F) Analysis of NFAT binding to 5'T α 1, T α 1 and T α 2. (G) Analysis of AP-1 and P-CREB binding to T α 1. (H) Analysis of Egr -1 binding to 5'T α 1, T α 1-T α 2 and 3'T α 4. Radiolabeled probes were incubated with nuclear extracts from unstimulated (NS) or PMA+ionomycin stimulated (S) cells, or rEgr-1, in presence or absence of increasing amounts of unlabeled competitors, CS or mCS, and in absence or presence of control or specific Abs. NFAT1-, NFAT-2, AP-1 and Egr-1-containing complexes are marked. NFAT1*, NFAT-2*, P-CREB* and Egr-1* denote complexes formed in the presence of specific Abs.

can also cooperate without physical interaction [39]. The concentration of previously undetected NFAT, AP-1 and Egr sites present at T α 1-T α 2 and its flanking regions is very striking since T α 1-T α 2 constitutes the previously reported core E α , which is extensively occupied by multiple transcription factors during thymocyte development [17, 22, 23](Fig. 1 and S1).

In order to verify the sites that can readily support NFAT binding, we performed EMSAs with E α -derived probes and recombinant DNA-binding domain of NFAT1 (rNFAT-DBD)(Fig. S3A and S3B; Table SI). Binding experiments to 5'T α 1, T α 1 and T α 2 demonstrated efficient binding of rNFAT-DBD to the three regions. 5'T α 1 can accommodate simultaneous binding of two molecules of NFAT to the same DNA molecule, however further experiments using sites that can support formation of NFAT dimers [40] demonstrated non-cooperative NFAT binding to 5'T α 1 (unpublished observations). To clearly identify from among the potential sites, those that were actually bound by NFAT, we performed EMSAs with E α probes containing single binding sites (Fig. S3B). Our dissection of NFAT sites indicates that the relevant E α NFAT sites *in vivo* might include 5'T α 1 sites 2 and 3, T α 1 site 7 and T α 2 site 10 (Fig. 3B). Furthermore, incubation of the single site-containing probes with increasing amounts of rNFAT-DBD allowed us to compare the relative affinity among the several binding sites (Fig. S3B). Our data indicate that site 2 and site 7 afford strong NFAT binding, whereas site 3 and site 10 afford moderate NFAT binding.

In order to evaluate binding of endogenous factors to E α during β -selection, we first generated nuclear extracts from unstimulated and PMA+ionomycin-stimulated cells, as a source of such inducible factors. Presence of these factors was evaluated by binding to their correspondent CSs (Fig. S3C-F). These experiments demonstrated

efficient induction of NFAT, NF κ B, AP-1 and Egr factors after cell stimulation. Among the complexes formed with the NFAT CS probe, two complexes (labeled as NFAT1 and NFAT2) and another one of lower mobility (*) were judged to be specific based on competition experiments (Fig. S3C). To identify these complexes, we used Abs against the three NFAT family members that are expressed in these cells: NFAT1, NFAT2 and NFAT4 (Koltsova, 2007). Inclusion of NFAT1 or NFAT2 Abs resulted in a shift of the correspondent complex (labeled as NFAT1* or NFAT2*). Inclusion of NFAT4 or control Abs did not result in any appreciable effect. These results are consistent with the relative expression of NFAT factors in SCID.adh cells, given that NFAT1 and NFAT2 are far more abundant than NFAT4 in these cells [10].

We next asked whether endogenous NFAT factors present in PMA+ionomycin stimulated cell extracts could bind to E α -derived probes (Fig. 3C-F). Two specific complexes (marked as NFAT1 and NFAT2) based on competition experiments were formed with 5'T α 1 probes containing sites 2 and 3 (Fig. 3C and 3D). Inclusion of NFAT1 or NFAT2 Abs resulted in a shift of the correspondent complexes. Furthermore, comparing the abundance of the super-shifted complexes obtained in presence of the Abs, these experiments indicate a preference for NFAT2 binding to 5'T α 1 sequences compared to that for NFAT1 (Fig. 3D). Our data also demonstrated that NFAT site 2 is responsible for most of NFAT binding to 5'T α 1 since a probe with a point mutation at this site is not bound by NFAT, indicating that the affinity of NFAT for site 3 is not sufficient to allow detection of NFAT binding in these experimental conditions (unpublished observations). In addition, binding of endogenous NFAT factors could be confirmed to T α 1 site 7 and T α 2 site 10 (Fig. 3E and 3F).

We next analyzed binding of AP-1 to its putative E α sites. We first confirmed that specific binding of AP-1 was induced in PMA+ionomycin stimulated cells as evidenced by binding to the CS but not to the mCS, and specific binding inhibition by addition of c-Jun Ab (Fig. S3E). We then asked whether AP-1 complexes present in nuclear extracts from stimulated cells could bind to the possible E α AP-1 sites (Fig. 3A). Our experiments showed that only the T α 1 site 2 was bound efficiently by AP-1 (Fig. 3B and 3G). This complex (marked as AP-1) was judged to be specific based on competition experiments. Inclusion of c-Jun Ab inhibited its formation confirming its identity (unpublished observations). Formation of this complex was dramatically increased when the nuclear extract was prepared in presence of the phosphatase inhibitor orthovanadate (compare AP-1 binding to T α 1 in extracts prepared in absence, Fig. 3E, or presence of orthovanadate, Fig. 3G). This site coincides with a previously described essential site for CREB [20]. In agreement with this, we have detected a P-

CREB-containing complex bound to this sequence (P-CREB*)(Fig. 3G) as previously reported [18, 22]. Interestingly, the abundance of the induced AP-1 complex exceeds that of the P-CREB* complex suggesting the possibility that AP-1 out-competes P-CREB for binding to T α 1.

In order to verify whether the putative Egr sites present at E α can support Egr-1 binding, we performed EMSAs with E α -derived probes. Since use of nuclear extracts did not allow us to clearly discriminate specific binding of Egr factors to these probes, we performed these experiments with rEgr-1 (Fig. 3H). We compared binding of rEgr-1 to E α probes to that to a characterized CS that can support efficient Egr-1/3 binding (Fig. S3F). One abundant complex, labeled as Egr-1, was detected with the CS probe, but not with its mutated version, mCS. Analysis of Egr binding to 5'T α 1, T α 1-T α 2 and 3'T α 4 revealed formation of complexes of identical mobility to that formed with the CS. To verify that Egr-1 is present in these complexes, we used Egr-1 Abs (Fig. 3H and S3F). Inclusion of Egr-1 Abs resulted in shift of the Egr-1-containing complex (Egr-1*) when the CS probe was used, or in its disappearance when E α -derived probes were used. As expected, we did not observe any binding of rEgr-1 to T α 3-T α 4 demonstrating the specificity of the assays (unpublished observations). We conclude that Egr factors can bind specifically to 5'T α 1, T α 1-T α 2 and 3'T α 4. Taken together, our data suggest that NFAT, AP-1 and Egr are inducible factors that may function in activation of E α during β -selection. A summary of the confirmed sites for these factors present at E α is represented in the Fig. 3B.

NFAT, AP-1, Egr and CREB-binding protein (CBP)/p300 factors are part of an active E α enhanceosome

To confirm the presence of NFAT, AP-1 and Egr factors at E α enhanceosome *in vivo*, we performed ChIP experiments. Our analyses demonstrated binding of NFAT1, NFAT2, NFAT4, c-Jun and Egr-1 to E α in PMA+ionomycin stimulated but not in unstimulated cells (Fig. 4 and S4). No clear binding of Egr-3 to E α was detected (Fig. S4D) probably due to its low expression compared to that of Egr-1 in these cells (Fig. S2). Furthermore, consistent with the dependence of E α function in activation of both transcription and V(D)J recombination on recruitment of histone acetylases (HATs)[23, 29], we found that CBP and p300 were present in the E α enhanceosome in stimulated but not in unstimulated cells (Fig. 4A). These results are consistent with the fact that binding of p300 constitutes a common mark for activated enhancers [41]. These experiments support our hypothesis that an active E α enhanceosome is

assembled *de novo* at the transition from DN3a to DN4 by binding of inducible factors including NFAT, AP-1 and Egr proteins to multiple sites within the enhancer. Furthermore, these results suggest that CBP/p300 recruitment to the E α enhanceosome may be important for its activation and for long-range E α -dependent histone acetylation [29].

In order to evaluate whether the results that we have obtained in SCID.adh cells can be extended also to primary thymocytes, we first compared germline J α -initiated transcripts present in PMA+ionomycin-stimulated SCID.adh cells to that in thymocytes from Rx β mice (Fig. 5A and 5B). We found that abundance of germline *Tcra* transcripts is comparable in both cases, suggesting that a similar percent of cells are signaling through their pre-TCR in each case. In order to evaluate whether continuous signaling through the pre-TCR is a requirement for induction of the *Tcra* germline transcription at primary DP thymocytes, we analyzed the effect of the PLC γ inhibitor U73122 in C α

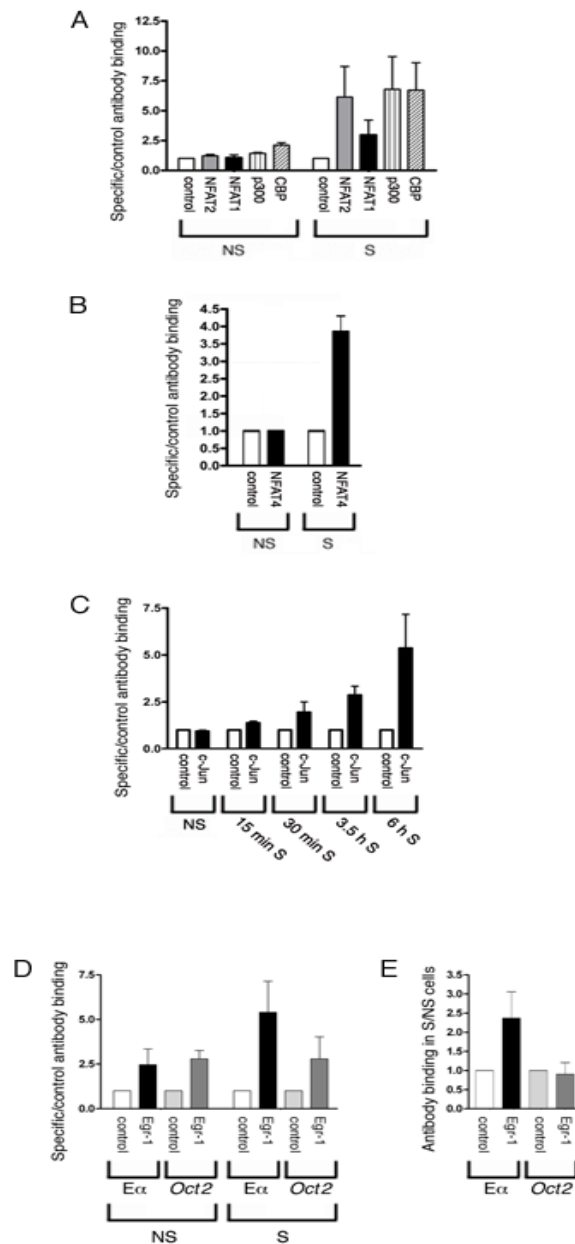


Figure 4.- NFAT, AP-1, Egr-1 and CBP/p300 factors are part of an active E α enhanceosome in SCID.adh cells. Chromatin preparations from unstimulated (NS) or PMA+ionomycin stimulated (S) cells during 6 h or the indicated times were immunoprecipitated with the indicated Abs: NFAT (A, B), AP-1 (C), Egr-1 (D) and CBP/p300 (A). DNA purified from the Ab-bound fractions was used as a template for PCR to evaluate the presence of E α and Oct2 sequences. Values obtained from each E α and Oct2 signals were normalized to that of input, and expressed as relative enrichment of indicated factor binding to signals obtained with control Abs. In E, relative values of fold induction obtained in samples from PMA+ionomycin stimulated (S)/unstimulated (NS) cells for control and Egr-1 Abs are indicated. Data represent the mean \pm s.e.m. of three determinations.

transcription at $Rx\beta$ thymocytes by real time RT-PCR (Fig. 5C). We found that *Tcra* germline transcription was diminished (by 50%) in $Rx\beta$ thymocytes after 24 h of *in vitro* treatment indicating that constant $PLC\gamma$ -mediated signaling by the pre-TCR is required to maintain the level of germline *Tcra* transcription in thymocytes. Treatment with other inhibitors did not have any effect since they need to be added before its specific signaling pathway was initiated [42, 43].

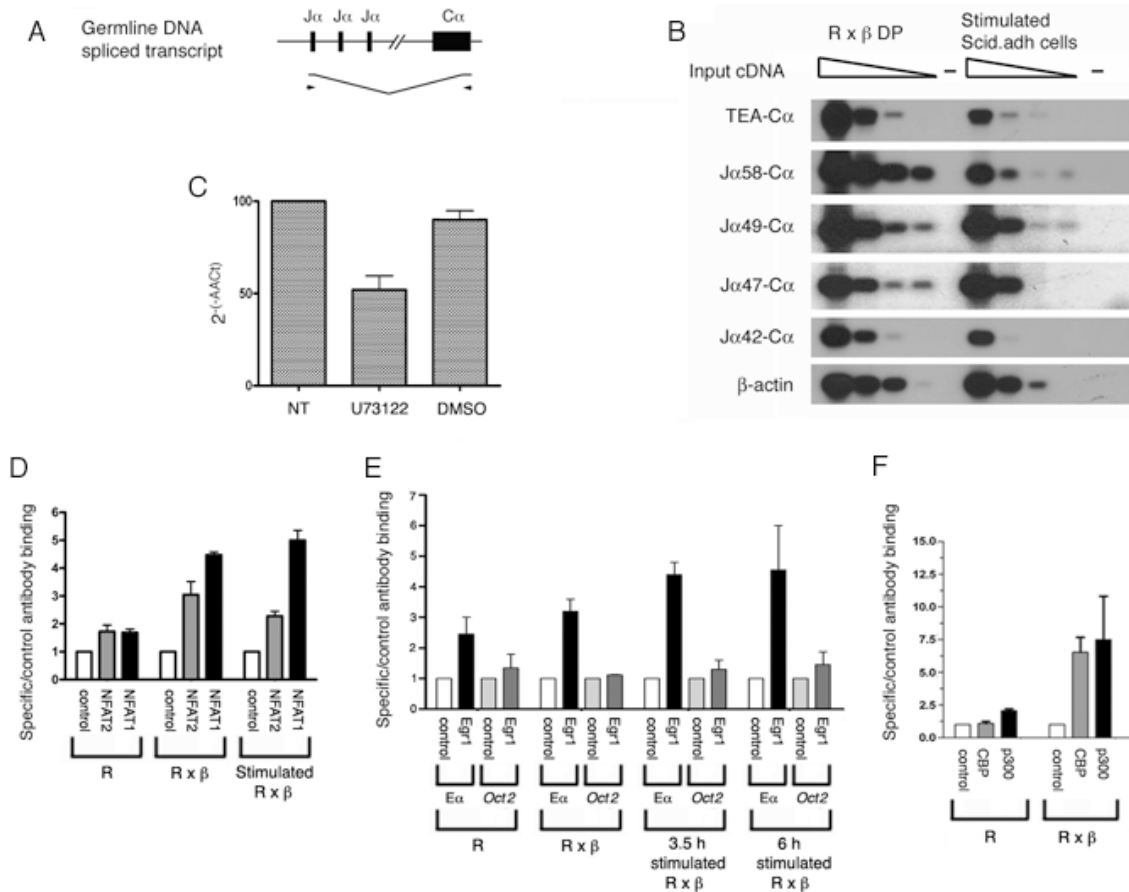


Figure 5.- NFAT, Egr-1 and CBP/p300 factors are part of an active $E\alpha$ enhanceosome in $Rx\beta$ thymocytes. (A) PCR strategy to analyze $J\alpha$ -to- $C\alpha$ spliced transcripts; arrowheads indicate primers. (B) $J\alpha$ germline DNA spliced transcripts were analyzed in $Rx\beta$ thymocytes and PMA+ionomycin stimulated SCID.adh cells. Threefold serial diluted cDNA was amplified to detect specific spliced germline $J\alpha$ transcripts using the indicated 5' $J\alpha$ and a 3' $C\alpha$ primers, and a radiolabeled $C\alpha$ probe [11]. Analysis of *Actb* controls for DNA loading. -, control PCRs lacking DNA. Results are representative of three independent experiments. (C) Analysis of $C\alpha$ transcripts by real time RT-PCR in $Rx\beta$ thymocytes in absence (NT), presence of U73122 or DMSO as a control. Expression levels of $C\alpha$ transcripts were normalized to that of *Actb*. Data represent the mean \pm s.e.m. of three determinations. (D-F) Chromatin preparations from total *Rag2*^{-/-} thymocytes, or unstimulated or PMA+ionomycin stimulated $Rx\beta$ thymocytes during the indicated times were immunoprecipitated with the indicated Abs. Data represent the mean \pm s.e.m. of three determinations.

In order to evaluate the presence of inducible factors at the E α enhanceosome in mouse DP thymocytes, we performed ChIPs (Fig. 5D, 5E and S5). Our analysis demonstrated strong induction of NFAT1 and NFAT2 binding to E α in Rx β thymocytes compared to that in *Rag2*^{-/-} thymocytes. We also confirmed a strong induction of Egr-1 binding to E α in stimulated Rx β thymocytes compared to that in *Rag2*^{-/-} thymocytes. The reason why Egr-1 binding increased with Rx β thymocyte stimulation is probably related with its transient induction in synchronously stimulated cells [34]. In addition, consistent with the requirement for E α to recruit HATs in order to induce *Tcra* transcription and V(D)J recombination, we found that pre-TCR signaling stimulates the recruitment of co-activators p300 and CBP to the E α enhanceosome, as evidenced by their greater binding in Rx β thymocytes than in *Rag2*^{-/-} thymocytes (Fig. 5F and S5). These experiments confirm our results using the SCID.adh cellular model and support our hypothesis that an active E α enhanceosome is assembled at the transition from DN3a to DN4/DP by recruitment of inducible transcription factors to the enhancer.

E α -transcriptional induction is dependent on calcineurin-mediated signaling

All our data indicate that *Tcra* germline transcription is dependent on signaling pathways mediated by calcineurin and MAPK/ERK, which culminate in the binding of NFAT, AP-1 and Egr factors to the E α enhanceosome after β -selection. To formally investigate whether E α is the element through which these signaling pathways activate germline *Tcra* transcription, we evaluated E α inducibility after Jurkat cell stimulation in transient transfection experiments (Fig. 6). In addition, we also evaluated the functional contribution of NFAT sites 2 and 3 within 5'T α 1 on E α activation by employing reporter constructs in which E α -dependent TEA or J α 49p are controlled by E α versions containing (E α 440) or lacking (E α 386) these sites (Fig. 6A). We note that this type of experiments, with E α positioned within the context of artificial reporter constructs, allows for the analysis of E α function in absence of cell stimulation and, hence, does not recapitulate the *in vivo* situation in which transcriptional activation of *Tcra*, with E α positioned at large distances from its responding promoters, is cell stimulation dependent. However, this *in vitro* system allowed us to evaluate essential aspects of E α inducibility. Transient transfection of these constructs revealed that, consistent with previous results [15, 44], in absence of E α , neither TEA nor J α 49p were able to activate transcription of the reporter gene, whereas E α efficiently activated transcription from each of these promoters (Fig. 6B). Cell stimulation with PMA+ionomycin activated

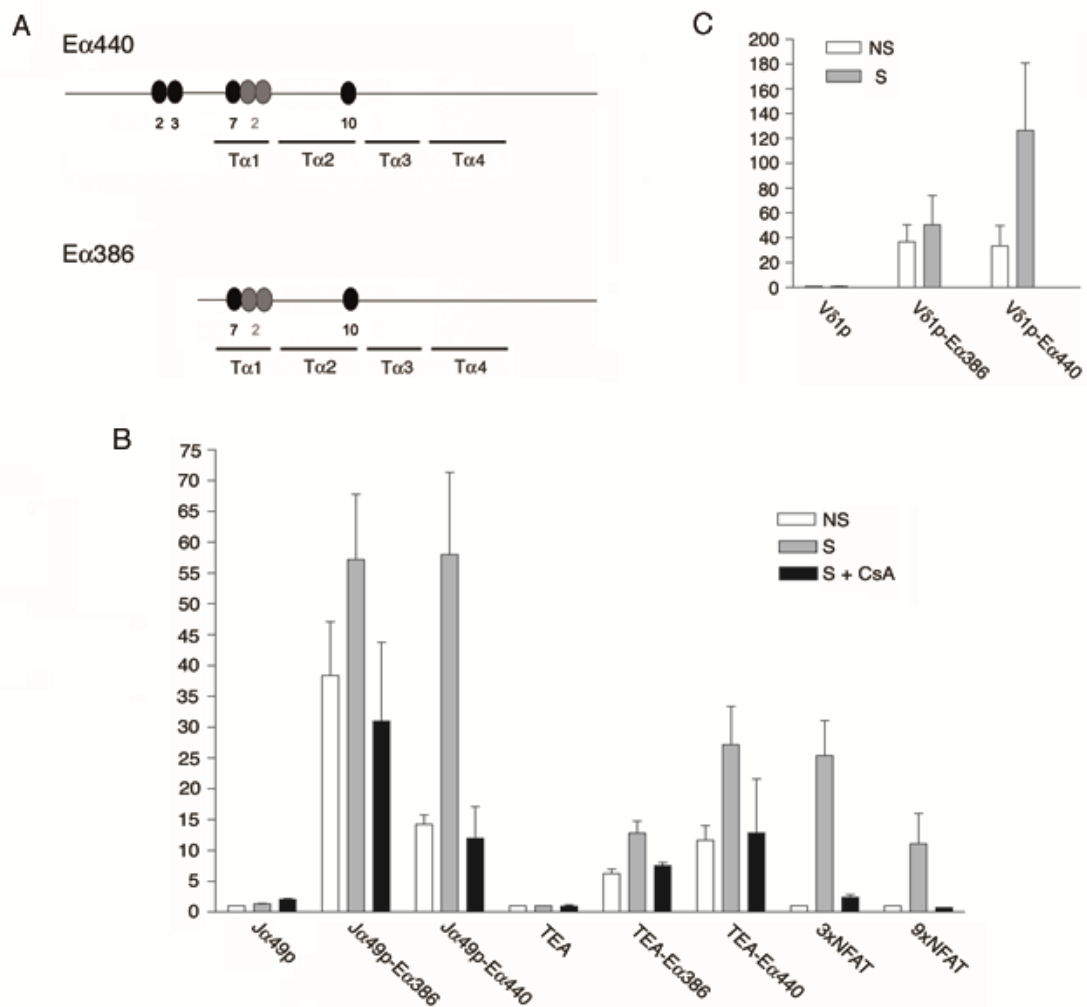


Figure 6.- Eα-transcriptional induction is dependent on calcineurin-mediated signaling.

(A) The diagram depicts Eα440 and Eα386 structure, indicating the location of the NFAT and AP-1 binding sites present and location of the Tα1, Tα2, Tα3 and Tα4 regions. (B,C) The indicated enhancers, Eα440 or Eα386, were cloned in enhancer-dependent test constructs where LUC is transcribed from the indicated promoters. Constructs were electroporated into Jurkat cells together with a reference plasmid containing the renilla *luciferase* reporter. Cells were unstimulated (NS) or PMA+ionomycin stimulated (S) during 24 h. Values for LUC activity were normalized to that of renilla luciferase control plasmid. Data represent the mean ± s.e.m. of 4-11 determinations.

further Eα-dependent transcription from both promoters demonstrating Eα inducibility in this system (Fig. 6B). Interestingly, Eα440 was a more efficient transcriptional activator for transcripts derived from Jα49p than Eα386, suggesting that a specific collaboration between 5'Tα1 and Jα49p exists for transcriptional activation. Furthermore, the high basal transcriptional activity observed in the Jα49p-Eα386

construct supports the presence of a negative regulatory site within 5'T α 1 involved in this collaboration. Pre-treatment of cells with CsA before their stimulation totally abrogated the ability of both E α 440 and E α 386 to activate cell stimulation-dependent transcription (Fig. 6B). Since it is possible that cell stimulation might also be involved in TEA and J α 49p function, to assess whether E α is specifically induced by cell activation, E α 386 and E α 440-dependent transcriptional induction was assayed from the V δ 1p, which is active in DN3a cells prior to β -selection (Fig. 6C). V δ 1p alone or directed from E δ or E α 386 did not respond to cell stimulation, whereas it strongly responded when directed from E α 440 (Fig. 6C and unpublished observations). These results indicate that E α itself responds to cell stimulation and that calcineurin-mediated signals are crucially involved in such function. All our data together indicate that pre-TCR signals induce *Tcra* germline transcription and primary V α -to-J α recombination through calcineurin- and MAPK/ERK-dependent signaling pathways that activate E α through the assembly of a functional E α enhanceosome formed by multiple inducible factors.

DISCUSSION

Previous experiments established T α 1-T α 2 as a paradigm for enhanceosomes since it is supposed to be formed by a very strict and compact nucleoprotein structure created by stereospecific interactions among activators bound to the enhancer [20, 21]. This view was also supported by previous genomic footprinting experiments using DMS that revealed that T α 1-T α 4 and flanking areas are extensively occupied with no major differences between DN3a and DP thymocytes [17, 22, 23]. However, this notion has been recently challenged by creating a mutant version of E α , E α MC, in which E δ myb and runx sites were substituted for T α 2 runx and ets sites [23]. E α MC was a very potent enhancer indicating that stereospecific interactions among proteins that form an E α enhanceosome are rather flexible. These experiments suggested the possibility of assemblies of distinct sets of proteins on E α that might represent a more flexible form of information processing during thymocyte development. In support of this hypothesis, analysis of DNaseI sensitivity at nucleotide resolution revealed that E α chromatin is generally much more sensitive to digestion in DN3a than in DP thymocytes [18]. This suggests a more compact enhanceosome structure in the latter cell population. In addition to these general changes in E α DNA structure, striking differences were also found at specific nucleotides including 5'T α 1 and T α 1-T α 2 regions [22], suggesting

that a new complex might be formed in these regions. Hence, $E\alpha$ undergoes general chromatin structure changes at the DN3a to DP transition at specific regions that intriguingly are coincident to the regions where NFAT, AP-1 and Egr factors bind, suggesting that a new complex containing these inducible factors might be formed at a DN4/DP $E\alpha$ enhanceosome. In fact, detection of a post- β -selection enhanceosome containing NFAT and AP-1 factors provides a new explanation for the long-standing paradox regarding activation of this enhancer without obvious differences in the footprint of bound proteins using DMS [17, 18, 22, 23]. To note, NFAT sites 2 and 3 coincide with reported sites for Ets factors (GGA motifs with 3'-adenine tracts)(Fig. S1); in addition, NFAT site 10 constitutes an additional Ets site not identified previously. In fact, these three ets/NFAT sites are indistinguishable occupied *in vivo* in DN3a and DP thymocytes in genomic footprinting experiments using DMS [17, 22, 23], and both Ets and NFAT factors make exactly the same contacts with the GG core sequence of their respective CS *in vivo* [45]. Hence, NFAT might occupy the enhancer in DP cells with the same contacts as Ets factors in DN3a cells. In addition, the $T\alpha 1$ AP-1 site coincides exactly with a reported CRE site, which is essential for $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ function [20]. Previous EMSAs of CREB versus P-CREB binding to $T\alpha 1$ in DN3a and DP thymocytes showed that P-CREB binding was slightly detected in DN3a cells but not in DP cells, suggesting that $E\alpha$ activation at DN3a-to-DP transition was associated with P-CREB dephosphorylation [18, 22]. Our data provide a new interpretation in which $T\alpha 1$ -bound P-CREB in DN3a cells might be displaced by AP-1 binding in DN4 cells. In fact, binding of P-CREB to $T\alpha 1$ is much lower than that of AP-1 in EMSAs using nuclear extracts from stimulated cells (Fig. 3G). Similar competition between CREB and AP-1 factors has been reported at other single CRE/AP-1 sites [46]. Hence, AP-1 might occupy $E\alpha$ in DP cells with the same contacts as CREB /P-CREB in DN3a cells.

Based on the location of the binding sites for NFAT and AP-1 factors and the requirement of an intact $T\alpha 2$ for assembly of an $E\alpha$ enhanceosome *in vivo* [21], we favor a scenario in which these inducible factors occupy their sites in DN4/DP thymocytes without disturbing the general nucleoprotein structure established by binding of LEF-1/TCF-1-Runx1 and Ets-1 to $T\alpha 2$ in DN3a thymocytes (Fig. 7). In fact, the complex formed by these factors seems to be very stable based on *in vitro* [20] and *in vivo* studies [21, 47], since their sites at $T\alpha 2$ facilitate cooperative protein binding to DNA. We propose that binding of these lymphoid-restricted factors to $E\alpha$ prior to its activation would form a regulatory landscape for recruiting factors induced by pre-TCR signaling (Fig. 7). These inducible transcription factors bound to $E\alpha$ in DN4/DP cells will then recruit CBP/p300 co-activators to assemble an active enhanceosome which is

able to activate TEA and J α 49p by intrachromosomal E α -J α promoter physical interactions to trigger *Tcra* germline transcription and primary V α to J α rearrangements. Interestingly, specific interactions between inducible factors have also been demonstrated to be involved in other specific inducible enhancer-promoter interactions [48-50]. This attractive avenue for investigation will be addressed in future experiments.

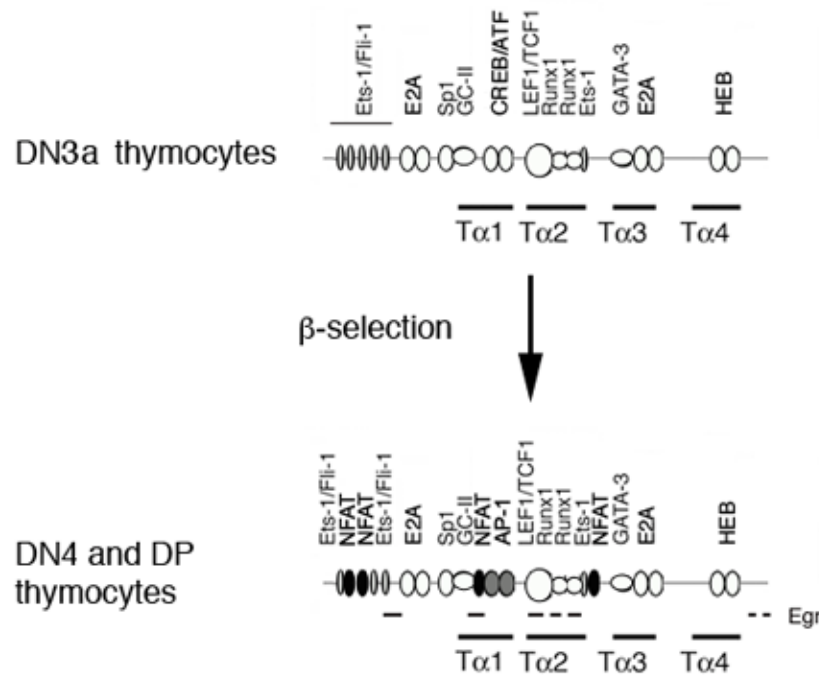


Figure 7.- Model for assembly of different E α enhanceosomes during thymocyte development. Described constitutive bound factors are indicated as white ovals, possible bound NFAT factors are indicated as black ovals, possible bound AP-1 factors are indicated as grey ovals, and possible Egr sites are indicated by black lines. Location of T α 1, T α 2, T α 3 and T α 4 are indicated. In DN3a thymocytes, only constitutive transcription factors would occupy their binding sites at E α . After β -selection, induced NFAT, AP-1 and Egr factors will occupy their sites within the enhancer and recruit the HATs CBP and p300; that would result in productive E α -TEA/J α 49p interactions that activate germline transcription and primary V(D)J recombination at *Tcra*.

No differences were detected by DMS genomic footprinting at the putative Egr binding sites within E α that could be indicative of new occupancy of these sites at DN3a to DP transition [17, 22, 23]. However, it is interesting to note that binding of rEgr-1 to E α *in vitro* is weak compared to that to the CS (Fig. 3H), and detection of factor binding by ChIP is more sensitive than that by DMS genomic footprinting due to the requirement of stable factor binding at a homogenous cell population for the later in

order to clearly detect DNA/protein contacts. In addition, we found that Egr-1 binding to $E\alpha$ detected by CHIP is increased in stimulated versus unstimulated $Rx\beta$ thymocytes, presumably due to the transient transcriptional induction of *Egr1* in synchronously stimulated cells [34], suggesting that $E\alpha$ is transiently occupied by these inducible transcription factors during DN3a to DN4/DP transition due, at least in part, to the low affinity binding sites for Egr factors present in $E\alpha$. Of note, weak binding of Egr factors in DP cells might explain detection of footprints in genomic footprinting experiments using DNase I [22]. These regions include the Sp1/GC-II site within $T\alpha1$, a GC site between CRE and TCF/LEF sites, and a site at the border between TCF/LEF and Runx sites. Presence of adjacent efficient binding sites for NFAT within 5' $T\alpha1$ and $T\alpha1$ - $T\alpha2$ regions might compensate *in vivo* for weak Egr binding since both factors can physically interact, forming heterodimers that cooperate in regulating gene expression [51]. In fact, NFAT site 2 is immediately adjacent to the unique Egr site present within 5' $T\alpha1$, and four potential Egr sites are positioned nearly to NFAT sites 7 and 10 within $T\alpha1$ - $T\alpha2$. Alternatively, Egr factors might be recruited to $E\alpha$ through their binding to $J\alpha$ promoters, via a process that loops out intervening DNA and creates a putative $J\alpha$ promoter/ $E\alpha$ holocomplex, similarly as it has been described between the $D\beta1$ promoter and $E\beta$ [52, 53]. Further dissection of the relevant Egr sites within $E\alpha$ and their collaboration with adjacent NFAT sites, as well as possible contribution of putative Egr sites within the $J\alpha$ promoters, in formation of an active $E\alpha$ enhanceosome will be addressed in future experiments.

An intriguing aspect of our CHIP experiments revealed the clear presence of AP-1 at the $E\alpha$ enhanceosome assembled in stimulated SCID.adh cells but not in $Rx\beta$ thymocytes. The fact that most Fos and Jun components decrease dramatically in the transition from DN3a (i.e. SCID.adh cells) to DP thymocytes (i.e. $Rx\beta$ thymocytes) [54, 55], together with the fact that the SCID.adh model allows synchronous induction of signaling in DN3a-like whereas $Rx\beta$ thymocytes represents continuous, steady state signaling in DP thymocytes, allowing detection of transient AP-1/DNA interactions in DN3a/DN4 transition that might be missed in $Rx\beta$ DP cell, might explain these results. In addition, the complex pattern of expression of Fos/Jun proteins during thymocyte development [54, 55] might require the usage of Abs with different specificities to resolve this. However, the fact that c-Jun binding to $E\alpha$ was clearly detected in stimulated SCID.adh cells strongly indicate that AP-1 is able to efficiently compete with CREB for binding to $T\alpha1$, being part of the functional $E\alpha$ enhanceosome assembled *in vivo*.

Our analysis supporting the requirement of inducible factors for activation of $E\alpha$ has important novel implications about the functional regulation of this enhancer during T-lymphocyte development. Our data suggest that $E\alpha$ activity during T-cell development is regulated through the ordered assembly of different enhanceosomes, with an essential role in the induction of germline *Tcra* transcription and $V\alpha$ - $J\alpha$ rearrangements at DN4/DP thymocytes. This model for activation-dependent $E\alpha$ function implies that its contribution might be dispensable for expression of a rearranged *Tcra* in resting naïve T-cells, as suggested in transgenic reporter constructs [56]. Similarly, different modes of *Tcrb* enhancer function have suggested assembly of different enhanceosomes in early thymocytes for triggering initial $D\beta$ - $J\beta$ recombination and in peripheral T-cells for expression of the assembled *Tcrb* [57]. In addition, our data prove an important role for $E\alpha$ -binding inducible transcription factors in regulating instructively the choice between $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T-cell lineages through activation of *Tcra* rearrangement and *Tcrd* recombinational deletion during β -selection. This molecular mechanism for $E\alpha$ activation might be involved in pre-TCR signaling-dependent repression of the $\gamma\delta$ lineage [58]. Future efforts will be focused on the molecular mechanisms to control $E\alpha$ activity along T lymphocyte maturation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank T.A. Waldman for hd245/332 α TAC hybridoma, F. Macián for rNFAT1-DBD, J.M. Redondo for 9xNFAT and 3xNFAT LUC reporter plasmids, M.S. Krangel for pJ α 49p and J α 49p-E α 386 pXPG constructs, A.M. Ibáñez for generation of V δ 1p-LUC plasmid, and C. Suñé and M.S. Krangel for critical reading. We also thank members of the C.H.M and C. Suñé laboratories for helpful discussions.

Author contributions: B.d.B. designed and executed the experiments; D.L.W. established the cellular system and participated in writing of the paper; C.H.M. supervised the project and wrote the paper.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Taghon, T., Yui, M.A., Pant, R., Diamond, R.A., and E.V. Rothenberg. 2006. Developmental and molecular characterization of emerging b- and gd-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* 24: 53-64.
2. Ciofani, M., Schmitt, T.M., Ciofani, A., Michie, A.M., Cuburu, N., Aublin, A., Maryanski, J.L., and J.C. Zúñiga-Pflucker. 2004. Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J. Immunol.* 172: 5230-5239.
3. Carter, J.H., Lefebvre, J.M., Wiest, D.L., and W.G. Tourtellote. 2007. Redundant role for early growth response transcriptional regulators in thymocyte differentiation and survival. *J. Immunol.* 178: 6796-6805.
4. Aifantis, I., Gounari, F., Scorrano, L., Borowski, C., and H. von Boehmer. 2001. Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca^{2+} mobilization and activation of NF- κ B and NFAT. *Nat. Immunol.* 2: 403-409.
5. Canté-Barrett, K., Winslow, M.M., and G.B. Crabtree. 2007. Selective role of NFATc3 in positive selection of thymocytes. *J. Immunol.* 179: 103-110.
6. Riera-Sans, L. and A. Behrens. 2007. Regulation of ab/gd T cell development by the Activator Protein 1 transcription factor c-Jun. *J. Immunol.* 178: 5690-5700.
7. Miyazaki, T. 1997. Two distinct steps during thymocyte maturation from $CD4^-CD8^-$ to $CD4^+CD8^+$ distinguished in the early growth response (Egr)-1 transgenic mice with a recombinase-activating gene-deficient background. *J. Exp. Med.* 186: 877-885.
8. Carleton, M., Haks, M.C., Smeele, S.A.A., Jones, A., Belkowski, S.M., Berger, M.A., Linsley, P., Kruisbeek, A.M., and D.L. Wiest. 2002. Early growth response transcription factors are required for development of $CD4^-CD8^-$ thymocytes to the $CD4^+CD8^+$ stage. *J. Immunol.* 168: 1649-1658.
9. Xi, H., and G.J. Kersh. 2004. Early growth response gene 3 regulates thymocyte proliferation during the transition from $CD4^-CD8^-$ to $CD4^+CD8^+$. *J. Immunol.* 172: 964-71.
10. Koltsova, E.K., Ciofani, A., Benezra, R., Miyazaki, T., Clipstone, N., Zúñiga-Pflucker, J.C., and D.L. Wiest. 2007. Early growth response and NF-ATc1 act in concert to promote thymocyte development beyond the b-selection checkpoint. *J. Immunol.* 179: 4694-4703.
11. Abarrategui, I., and M.S. Krangel. 2006. Regulation of T cell receptor- α gene recombination by transcription. *Nat. Immunol.* 7: 1109-1115.
12. Aifantis, I., Bassing, C.H., Garbe, A.I., Sawai, K., Alt, F.W., and H. von Boehmer. 2006. The Ed enhancer controls the generation of $CD4^-CD8^-$ abTCR-expressing T cells that can give rise to different lineages of ab T cells. *J. Exp. Med.* 203: 1543-1550.
13. Sleckman, B.P., Bardou, C.G., Ferrini, R., Davidson, L., and F.W. Alt. 1997. Function of the TCR α enhancer in ab and gd T cells. *Immunity* 7: 505-515.
14. Hawwari, A., and M.S. Krangel. 2005. Regulation of TCR δ and a repertoires by local and long-distance control of variable gene segment chromatin structure. *J. Exp. Med.* 202: 467-472.
15. Hawwari, A., Bock, C., and M.S. Krangel. Regulation of T cell receptor α gene assembly by a complex hierarchy of germline Ja promoters. *Nat. Immunol.* 6: 481-489.

16. Carleton, M., Ruetsch, N.R., Berger, M.A., Rhodes, M., Kaptik, S., and D.L. Wiest. 1999. Signals transduced by CD3e, but not by surface pre-TCR complexes, are able to induce maturation of an early thymic lymphoma in vitro. *J. Immunol.* 163: 2576-2585.
17. Hernández-Munain, C., Sleckman, B.P., and M.S. Krangel. 1999. A developmental switch from TCR d enhancer to TCR a enhancer function during thymocyte maturation. *Immunity* 10: 723-733.
18. Balmelle, N., Zamarreño, N., Krangel, M.S., and C. Hernández-Munain. 2004. Developmental activation of the TCR a enhancer requires functional collaboration among proteins bound inside and outside the core enhancer. *J. Immunol.* 173: 5054-5063.
19. Ho, I.C., Yang, L.H., Morle, G., and J.M. Leiden. 1989. A T-cell-specific transcriptional enhancer element 3' of Ca in the human T-cell receptor a locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 86: 6714-6718.
20. Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J.R., and R. Grosschedl. 1995. Assembly and function of a TCR a enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev.* 9: 995-1008.
21. Hernández-Munain, C., Roberts, J.L., and M.S. Krangel. 1998. Cooperation among multiple transcription factors is required for access to minimal T-cell receptor a-enhancer chromatin in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 1998. 18: 3223-3233.
22. Spicuglia, S., Payet, D., Tripathi, R.K., Rameil, P., Verthuy, C., Imbert, J., Ferrier, P., and W.M. Hempel. 2000. TCRa enhancer activation occurs via a conformational change of a pre-assembled nucleo-protein complex. *EMBO J.* 19: 2034-2045.
23. del Blanco, B., Roberts, J.L., Zamarreño, N., Balmelle-Devau, N., and C. Hernández-Munain. 2009. Flexible stereospecific interactions and composition within nucleoprotein complexes assembled on the TCRa gene enhancer. *J. Immunol.* 183: 1871-1883.
24. Shinkai, Y., Koyasu, S., Nakayama, K., Murphy, K.M., Loh, D.H., Reinherz, E.L., and F.W. Alt. 1993. Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science* 259: 822-825.
25. Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., and F.W. Alt. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68: 855-867.
26. Uchiyama, T., Nelson, D.L., Fleisher, T.A., and T.A. Waldmann. 1981. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. II. Expression of Tac antigen on activated cytotoxic killer T cells, suppressor cells, and one of two types of helper T cells. *J. Immunol.* 126: 1398-1403.
27. Jain, J., McCaffrey, P.G., Miner, Z., Kerppola, T.K., Lambert, J.N., Verdine, G.L., Curran, T., and A. Rao. 1993. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* 365: 352-355.
28. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M., and W. Schaffner. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17: 6419.
29. McMurry, M.T., and M.S. Krangel. 2000. A role for histone acetylation in the developmental regulation of VDJ recombination. *Science* 287: 495-498.
30. Redondo, J.M., Hata, S., Brocklehurst, C., and M.S. Krangel, M.S. 1990. A T cell-specific transcriptional enhancer within the human T cell receptor d locus. *Science* 247: 1225-1229.

31. Timmerman, L.A., Clipstone, N.A., Ho, S.N., Northrop, J.P., and G.B. Crabtree. 1996. Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression. *Nature* 383:837-840.
32. Wilkins, B.J., Dai, Y.S., Bueno, O.F., Parsons, S.A., Xu, J., Plank, D.M., Jones, F., Kimball, T.R. and Molkentin, J.D. 2004. Calcineurin/NFAT coupling participated in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 94:110-118.
33. Xi, H., Schwartz, R., Engel, I., Murre, C., and Kersh, G.J. 2006. Interplay between RORgammat, Egr3, and E proteins controls proliferation in response to pre-TCR signals. *Immunity* 24: 813-26.
34. Shao, H., Kono, D.H., Chen, L.-Y., Rubin, E.M., and J. Kaye. 1997. Induction of Early growth response (Egr) family of transcription factors during thymic selection. *J. Exp. Med.* 185: 731-744.
35. Shao, H., Wilkinson, B., Lee, B., Han, P.-C., and J. Kaye. 1999. Slow accumulation of active mitogen-activated protein kinase during thymocyte differentiation regulates the temporal pattern of transcription factor gene expression. *J. Immunol.* 163: 603-610.
36. Loots, G.G., Ovcharenko, I., Pachter, L., Dubchak, I., and E.M. Rubin. 2002. rVista for comparative sequence-based discovery of functional transcription factor binding sites. *Genome Res.* 12: 832-839.
37. Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., and T. Werner. 2005. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21: 2933-2942.
38. Wingender, E., Cehn, X., Hehl, R., Karas, H., Liebich, I., Matys, V., Meinhardt, T., Pruss, M., Reuter, I., and F. Schacherer. 2000. TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* 28: 316-219.
39. Macián, F., García-Rodríguez, C., and A. Rao. 2000. Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J.* 19: 4783-4795.
40. Falvo, J.V., Lin, C.H., Tsytsykova, A.V., Hwang, P.K., Thanos, D., Goldfeld, A.E., and T. Maniatis. 2008. A dimer-specific function of the transcription factor NFATp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 19637-19642.
41. Heintzman, N.D., Hon, G.C., Hawkins, R.D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L.F., Ye, Z., Lee, L.K., Stuart, R.K., Ching, C.W., Ching, K.A., Antosiewicz-Bourget, J.E., Liu, H., Zhang, X., Green, R.D., Lobanenkov, V.V., Stewart, R., Thompson, J.A., Crawford, G.E., Kellis, M., and B. Ren. 2009. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 559: 108-112.
42. Kumagai, N., Benedict, S.H., Mills, G.B., and E.W. Gelfand. 1988. Cyclosporin A inhibits initiation but not progression of human T cell proliferation triggered by phorbol esters and calcium ionophores. *J. Immunol.* 141: 3747-3752.
43. Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., and A.R. Saltiel. 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270: 27489-27494.
44. de Chasseval, R., and J.P. de Villartay. 1993. Functional characterization of the promoter for the human germ-line T cell receptor Ja (TEA) transcript. *Eur. J. Immunol.* 23: 1294-8.

45. Bowers, S.R., Calero-Nieto, F.J., Valeaux, S., Fernández-Fuentes, N., and P.N. Cockerill. 2010. Runx1 binds as a dimeric complex to overlapping Runx1 sites within a palindromic element in the human GM-CSF enhancer. *Nucleic Acids Res.* 38: 6124-6134.
46. Manna, P.R., and D.M. Stocco. 2007. Crosstalk of CREB and Fos/Jun on a single cis-element: transcriptional repression of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *J. Mol. Endocrinol.* 39: 261-277.
47. Hollenhorst, P.C., Shah, A.A., Hopkins, C., and B.J. Graves. 2007. Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family. *Genes Dev.* 21: 1882-1894.
48. Tsytsykova, A.V., Rajsbaum, R., Falvo, F.J., Ligeiro, F., Neely, S.R., and A.E. Goldfeld. 2007. Activation-dependent intrachromosomal interactions formed by the TNF gene promoter and two distal enhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 16850-16855.
49. Yun, K., So, J.S., Jash, A., and S.H. Im. 2009. Lymphoid enhancer binding factor 1 regulates transcription through gene looping. *J. Immunol.* 183: 5129-5137.
50. Chavanas, S., Adoue, V., Méchin, M.C., Ying, S., Dong, S., Duplan, H., Charveron, M., Takahara, H., Serre, G., and M. Simon. 2008. Long-range enhancer associated chromatin looping allows AP-1 regulation of the peptidylarginine deiminase 3 gene in differentiated keratinocyte. *PLOS One* 3: 1-11.
51. Decker, E.L., Nehman, N., Kampen, E., Eibel, H., Zipfel, P.F., and C. Sherka. 2003. Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression. *Nucleic Acids Res.* 31: 911-921.
52. Spicuglia, S., Kumar, S., Yeh, J.-H., Vachez, E., Chasson, L., Gorbach, S., Cautres, J., and P. Ferrier. 2002. Promoter activation by enhancer-dependent and -independent loading of activator and coactivator complexes. *Mol. Cell* 10: 1479-1487.
53. Oestreich, K.J., Cobb, R.M., Pierce, S., Chen, J., Ferrier, P., and E.M. Oltz. 2006. Regulation of the TCRb gene assembly by a promoter/enhancer holocomplex. *Immunity* 24: 381-391.
54. Chen, F., Chen, D., and E.V. Rothenberg. 1999. Specific regulation of Fos family transcription factors in thymocytes at two developmental checkpoints. *Int. Immunol.* 11: 677-688.
55. Wang, X., Xiao, G., Zhang, Y., Wen, X., Gao, X., Okada, S. and X. Liu. 2008. Regulation of Tcrb recombination ordering by c-Fos-dependent RAG deposition. *Nat. Immunol.* 9: 794-801.
56. Harrow, F., and B.D. Ortiz. 2005. The TCRA locus control region specifies thymic, but not peripheral, patterns of TCRA gene expression. *J. Immunol.* 175: 6659-6667.
57. Bonnet, M., Huang, F., Benoukraf, T., Cabaud, O., Verthuy, C., Boucher, A., Jaeger, S., Ferrier, P., and S. Spicuglia. 2009. Duality of enhancer functioning mode revealed in a reduced TCRb gene enhancer knockin mouse model. *J. Immunol.* 183: 7939-7048.
58. Aifantis, I., Azogui, O., Feinberg, J., Saint-Ruf, C., Buer, J., and H. von Boehmer. 1998. On the role of the pre-T cell receptor in ab versus gd T lineage commitment. *Immunity* 9: 649-55.

FOOTNOTES

¹This work was supported from Spanish Ministry of Science and Innovation grant BFU2009-08796, Junta de Andalucía grants CTS-6587 and CVI-4526, and CSIC grants 200620I040 and 201020E060. B.D.B. was supported by a pre-doctoral fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

²Address correspondence to Dr. Cristina Hernández-Munain, Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n. 18100-Armilla, Granada, Spain. Tel: 34-958-181646. Fax: 34-958-181632. Email: chmunain@ipb.csic.es

³Abbreviations used in this paper: CBP, CREB-binding protein; CHIP, chromatin immunoprecipitation; CS, consensus binding site; CsA, cyclosporine A; DMS, dimethylsulfate; DN, double negative; DP, double positive; E α , *Tcra* enhancer; E δ , *Tcrd* enhancer; Egr, early growth response factors; HAT, histone acetylase; J α 49p, J α 49 promoter; LUC, firefly *luciferase*; mCS, mutated consensus binding site; PLC γ , phospholipase C γ ; *Rag2*^{-/-} x *Tcrb*, Rx β ; SCID.adh, SCID.adh (TAC:CD3 ϵ); TEA, T early- α promoter; V δ 1p, V δ 1 promoter.

SUPPLEMENTARY TABLE AND FIGURE LEGEND

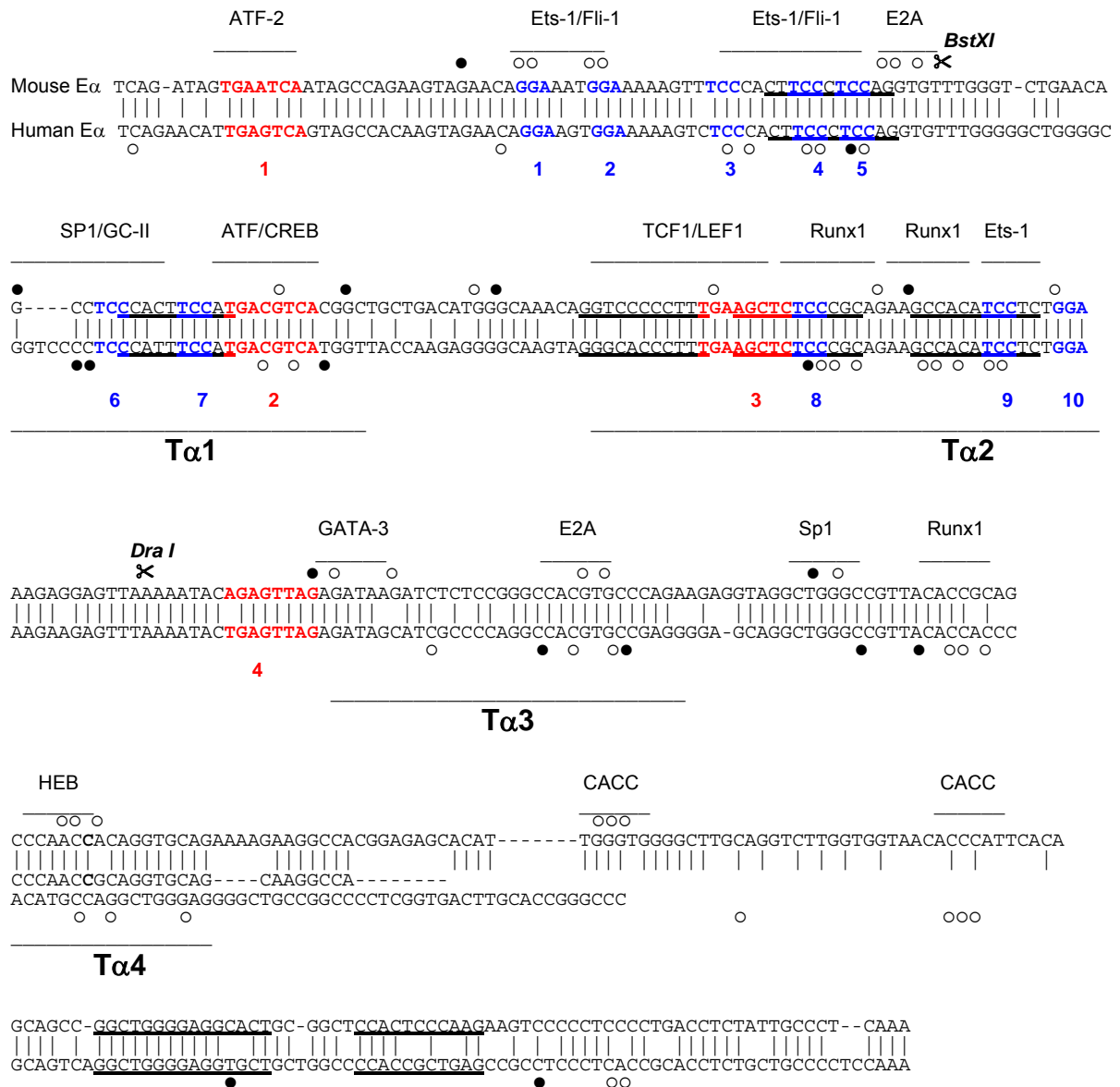


Figure S1.- Mouse and human $E\alpha$ structure. Diagram indicates location of the defined $T\alpha 1$, $T\alpha 2$, $T\alpha 3$ and $T\alpha 4$ regions, reported binding sites and summary DMS genomic footprinting experiments. Putative binding sites for NFAT, AP-1 and Egr factors are indicated. Summary of protected (open dots) and hypersensitive (filled dots) guanines observed in previous genomic footprinting experiments is shown [17, 23].

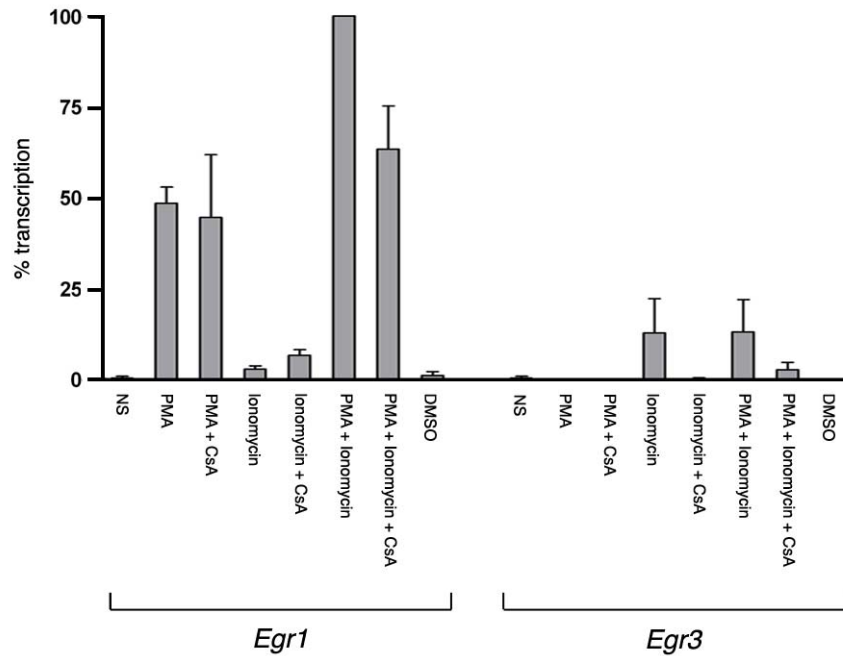


Figure S2.- Analysis by real time RT-PCR of *Egr1* and *Egr3* transcripts in SCID.adh cells. Unstimulated (NS) or stimulated cells with the indicated stimuli, and in absence or presence of CsA, were analyzed. Expression levels of transcripts were normalized to that of *Actb* in each sample and expressed as a percentage of the level of *Egr1* transcripts in PMA+ionomycin treated cells. Data represent the mean \pm s.e.m. of 2-3 determinations from two independent experiments.

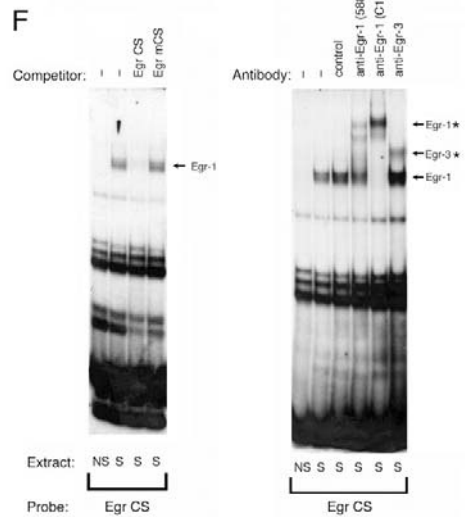
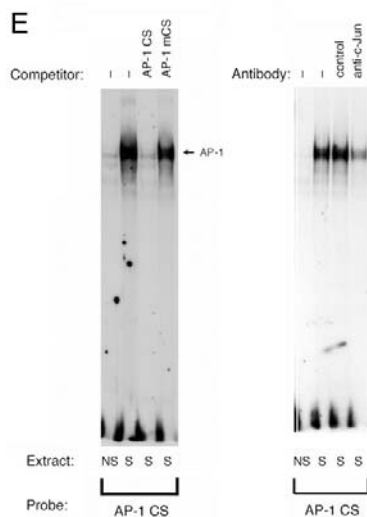
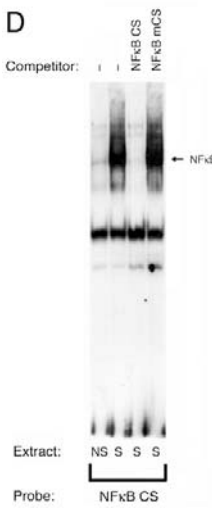
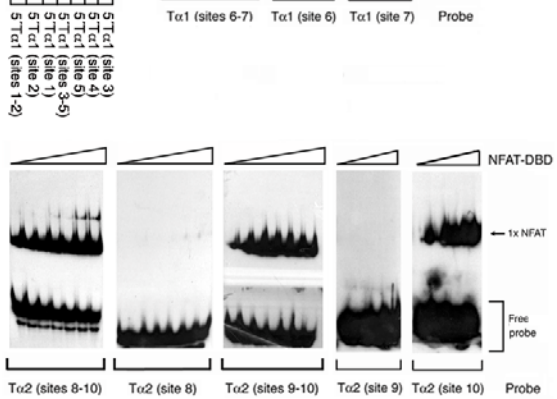
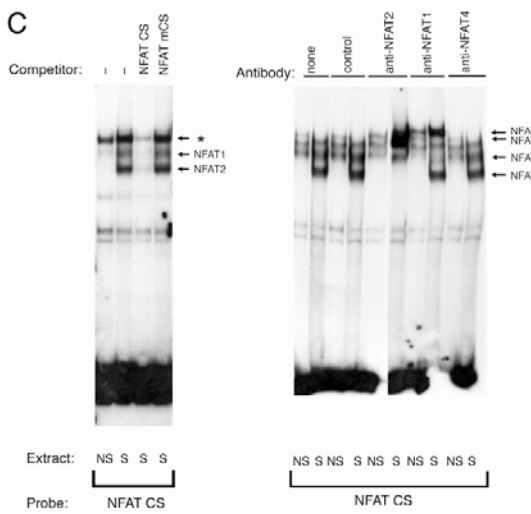
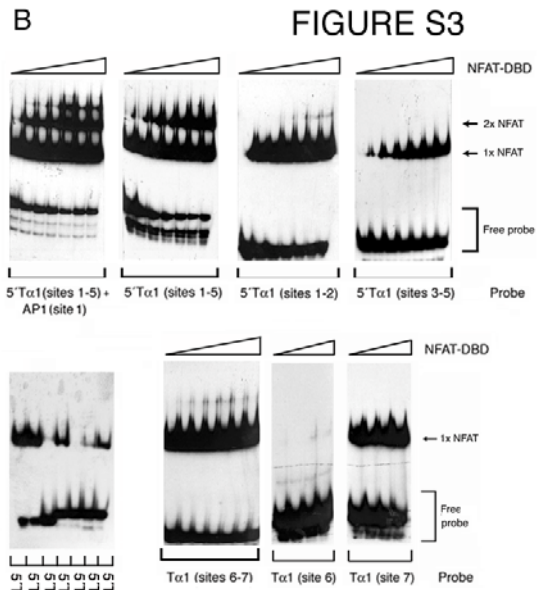
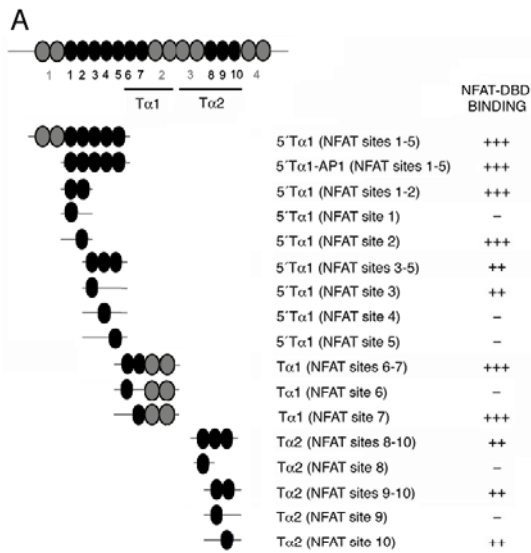


Figure S3.- Mapping of NFAT binding sites within E α and presence of inducible factors in stimulated SCID.adh cells. (A) Summary of putative NFAT and AP-1 sites in 5'T α 1-T α 2. NFAT factors are indicated as black ovals, and AP-1 factors are indicated by grey ovals. Structure of the different probes used to identify NFAT sites by EMSAs are shown (see sequences in Table SI). Relative binding of NFAT-DBD to each probe, as judged by EMSAs showed in (B) is indicated. (B) Radiolabeled oligonucleotides were incubated with increasing amounts of purified NFAT-DBD. DNA-protein complexes were resolved by PAGE. The NFAT-DBD-containing complexes with each probe are marked: 1xNFAT (complexes containing one molecule of NFAT-DBD) and 2xNFAT (complexes containing two molecules of NFAT-DBD). Presence of NFAT (C), NF κ B (D), AP-1 (E) and Egr (F) factors in unstimulated (NS) and PMA+ionomycin stimulated (S) SCID.adh cells was analyzed by EMSAs. Radiolabeled CS oligonucleotides were incubated with nuclear extracts from unstimulated or stimulated SCID.adh cells in presence or absence of CS or mCS competitors, and in absence or presence of control or NFAT1, NFAT2, NFAT4, c-Jun, Egr-1 or Egr-3 Abs. The NFAT1-, NFAT-2, NF κ B, AP-1 and Egr-1-containing complexes are marked. NFAT1*, NFAT2*, Egr-1* and Egr-3* denote new complexes formed in the presence of specific Abs. DNA-protein complexes were resolved by PAGE.

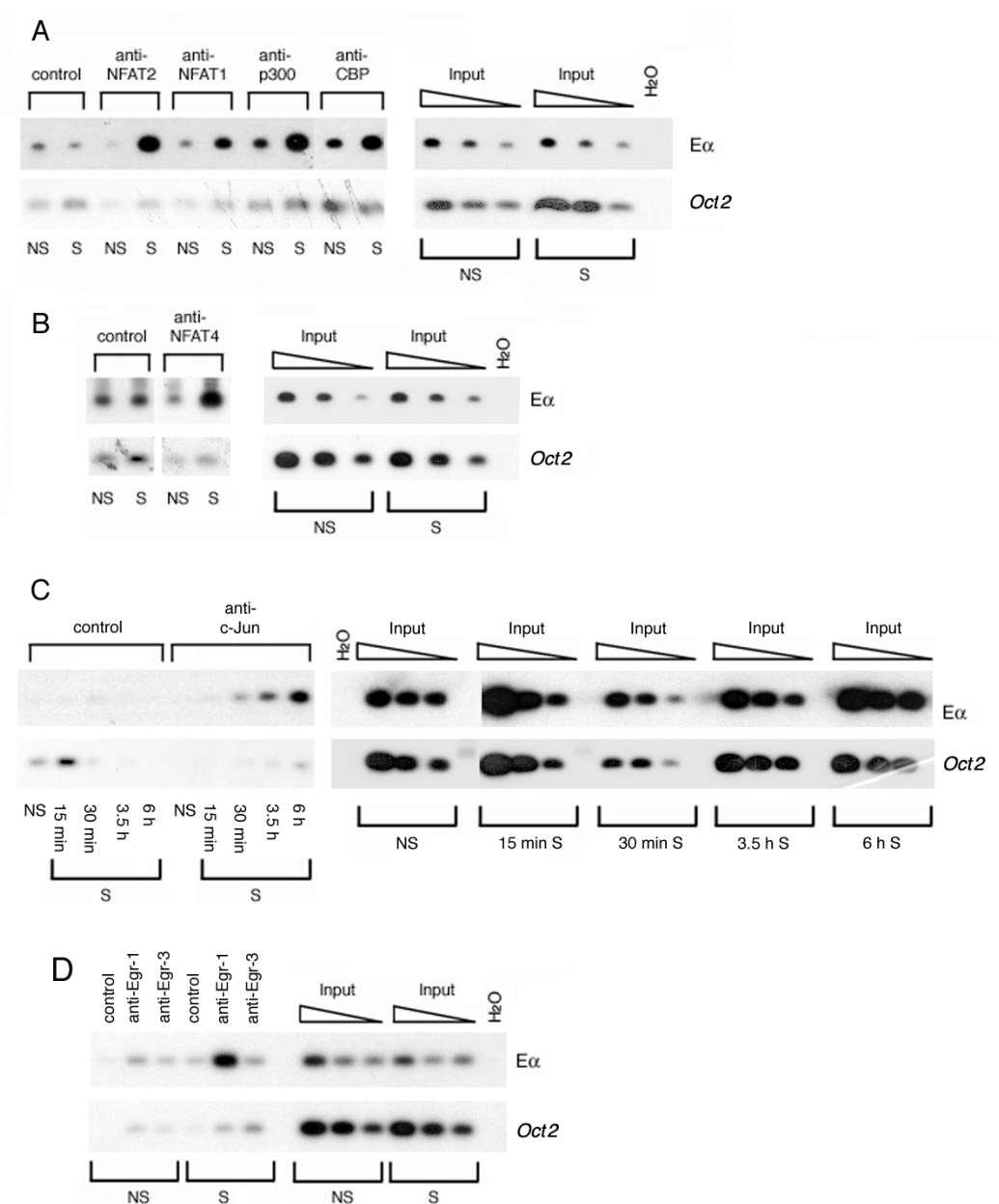


Figure S4.- NFAT, AP-1, Egr-1 and CBP/p300 factors are part of an active E α enhanceosome *in vivo* in SCID-adh cells. Chromatin preparations from unstimulated (NS) or PMA+ionomycin stimulated (S) SCID-adh cells during 6 h or the indicated times were immunoprecipitated with the indicated Abs: NFAT (A and B), AP-1 (C), Egr-1 (D and E) and CBP/p300 (A). Purified DNA samples from the Ab-bound fractions were used as a template for semiquantitative PCR to evaluate the presence of the E α and Oct2 sequences. Amplified fragments were detected on Southern blots using radiolabeled probes. Primers and probes for amplifying and detecting E α and Oct2 sequences were previously described [29]. Signals obtained from Southern-blots were quantified by a PhosphorImager. Results are representative of three experiments. Quantification of ChIPs is shown in Fig. 4.

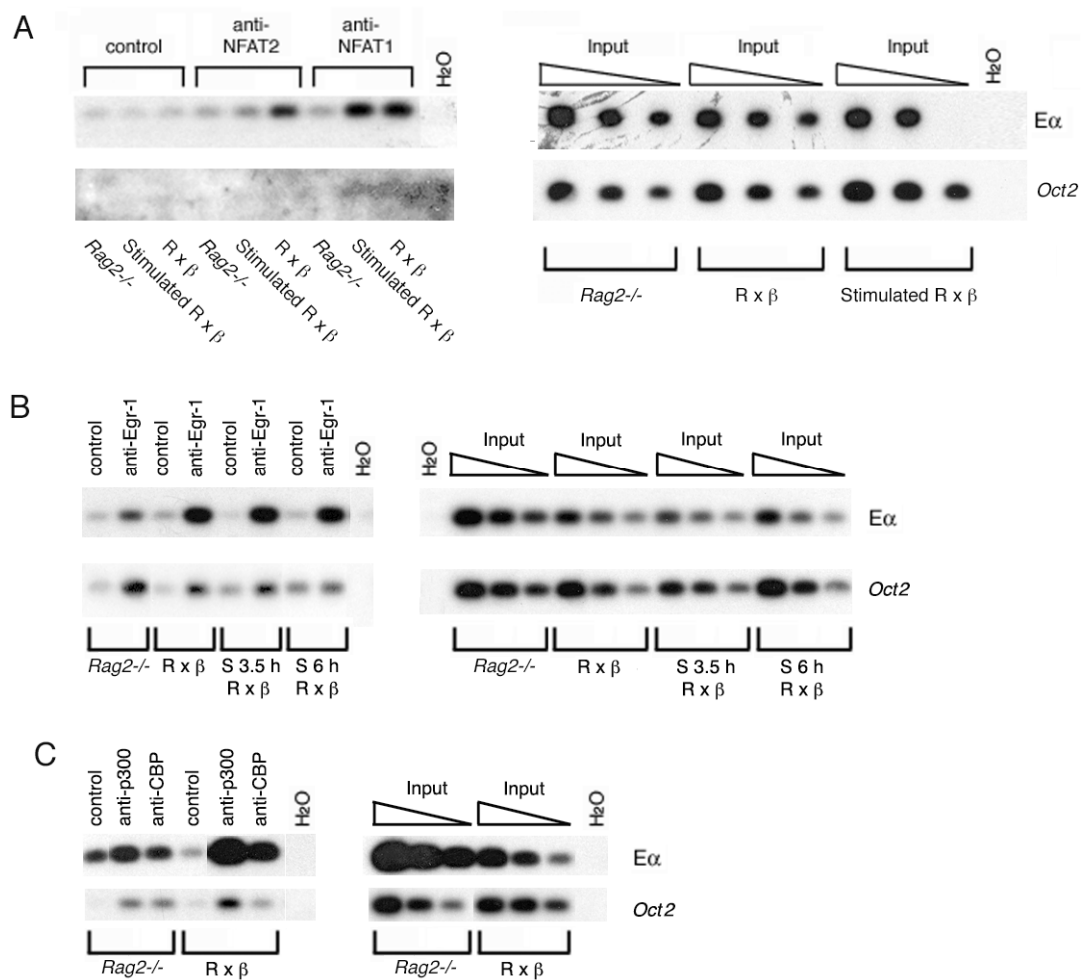


Figure S5.- NFAT, Egr-1 and CBP/p300 factors are part of an active E α enhanceosome *in vivo* in Rx β thymocytes. Chromatin preparations from Rag2^{-/-} thymocytes or unstimulated or PMA+ionomycin stimulated (S) Rx β thymocytes during 6 h or the indicated times were immunoprecipitated with the indicated Abs: NFAT (A), Egr-1 (B) and CBP/p300 (C). DNA purified from the Ab-bound fractions was used as a template for semiquantitative PCR to evaluate the presence of the E α and Oct2 sequences. Amplified fragments were detected on Southern blots using radiolabeled probes. Signals obtained from Southern-blots were quantified by PhosphorImager. Results are representative of three experiments. Quantification of ChIPs is shown in Fig. 5.

Table SI.- Sequences of oligonucleotides used for EMSAs in this study.

5'Tα1 (sites 1-5 + AP1-site 1)	ACATTGAGT TCAGTA GCCACAAGTAGAACAG GGA AGT GG AAAAAGT CTCC CACT TCC CTCCAGGT TGTA ACTCAGTCAT CGGTGTT CATCTTGTCTT CA CCT TTTT CAGAGG GTGA AGG GAGGTCCA 1 1 2 3 4 5
5'Tα1 (sites 1-5) short	GTAGAACAG GGA AGT GGA AAAAAGT CTCC CACT TCC CTCCAGGT CATCTTGT CCTTCA CCT TTTT CAGAGG GTGA AGG GAGGTCCA 1 2 3 4 5
5'Tα1 (sites 1-5)	GTAGAACAG GGA AGT GGA AAAAAGT CTCC CACT TCC CTCCAGGTGTTTGGG CATCTTGT CCTTCA CCT TTTT CAGAGG GTGA AGG GAGGTCCACAAACCC 1 2 3 4 5
5'Tα1 (sites 1-2)	GTAGAACAG GGA AGT GGA AAAAAGT CTC CATCTTGT CCTTCA CCT TTTT CAGAG 1 2
5'Tα1 (site 1)	GTAGAACAG GGA AGTTTAAAAAGT CTC CATCTTGT CCTTCA AAATTT CAGAG 1
5'Tα1 (site 2)	GTAGAACATTAAGT GGA AAAAAGT CTC CATCTTGTAA TTCA CCT TTTT CAGAG 2
5'Tα1 (sites 3-5)	AAAAAGT CTCC CACT TCC CTCCAGGTGTTTGGG TTTT CAGAGG GTGA AGG GAGGTCCACAAACCC 3 4 5
5'Tα1 (site 3)	AAAAAGT CTCC CACTTAACTAAAGT GTTTGGG TTTT CAGAGG GTGAATTGATTTCCACAAACCC 3
5'Tα1 (site 4)	AAAAAGTCTAACACT TCC CTAAAGT GTTTGGG TTTT CAGATTGTGA AGG GATTTCCACAAACCC 4
5'Tα1 (site 5)	AAAAAGTCTAACACTTAA CTCC AGGT GTTTGGG TTTT CAGATTGTGAATTG AGG TCCACAAACCC 5
Tα1 (sites 6-7)	GGCGGTCC CTCC ATT TCC ATGACGT CATGGTTAC CCGCCAGGGG AGG GTA AGG TACTGCAGTACCAATG 6 7
Tα1 (site 6)	GGCGGTCC CTCC ATTAAATGACGT CATGGTTAC CCGCCAGGGG AGG GTAATTTACTGCAGTACCAATG 6
Tα1 (site 7)	GGCGGTCC CTC TAACATT TCC ATGACGT CATGGTTAC CCGCCAGGGGATTGTAA AGG TACTGCAGTACCAATG 7
Tα2 (sites 8-10)	TTGAAGCT CTCC CGCAGAAGCCACAT CTC T GGA AAGAAGAGTT AACTTCGAG AGG GCGTCTTCGGT GTAGGAGA CCT TTCTTCTCAA 8 9 10
Tα2 (site 8)	TTGAAGCT CTCC CGCAGAAGCCA AACTTCGAG AGG GCGTCTTCGGT 8
Tα2 (site 9-10)	AGAAGCCACAT CTC T TGG AAAGAAGAGTT TCTTCGGT GTAGG AG CCT TTCTTCTCAA 9 10
Tα2 (site 9)	AGAAGCCACAT CTC TTTAAAGAAGAGTT TCTTCGGT GTAGG AGAAATTTCTTCTCAA 9
Tα2 (site 10)	AGAAGCCACATAAT CTGGA AAAGAAGAGTT TCTTCGGT GATTAGAC CCT TTCTTCTCAA 10
OLIGONUCLEOTIDES USED TO ANALYZE BINDING OF AP-1 TO Eα BY EMSA:	
5'Tα1 (AP-1 site 1)	GGTCAGACAT TGAGTCA GTAGCCACAAGTAGAA CCAGTCTGTAA ACTCAGT CATCGGTGTT CATCTT 1
Tα1 (AP-1 site 2)	CCTCC ATT TCC AT GACGTCA TGGTTAC GGAGG GTA AGG T ACTGCAGT ACCAATG 6 7 2
Tα2 (AP-1 site 3)	GGCACCCTT TGAAGCTCTCC CGCAGAAGCCA CCCGTGGGAA ACTTCGAGAGG GCGTCTTCGGT 3 8
Tα2/3 (AP-1 site 4)	TCTCT GGA AAGAAGAGTTTAAATA CTGAGTTA GAGATAGCATC AGGAGA CCT TTCTTCTCAAATTTTAT GACTCAA TCTATCGTAG 10 4
OLIGONUCLEOTIDES USED TO ANALYZE BINDING OF Egr-1 TO Eα BY EMSA:	
5'Tα1	AAAAAGTCTCC CACTTCCCTCC AGGTGTTTGGG TTTT CAGAGGGTCAAGG GAGGTCCACAAACCC
Human 3'Tα4	CCGCAGT CAGCTGGGGAGGTGCT CTGGCC CCACCGCTGAG CCGCCTCCCTCACCGCACCTT GCTGCCCTC CAAA GCGT CAGTCCGACCCCTCGAGCA CGACCG GGTGGGCACTC GGCGGAGGGAGTGGCGTGGAGACGACGGGGAGGTTT
Mouse 3'Tα4	CAGCAGCC GGCTGGGGAGGCACT CGCGCT CCACTCCCA AGAAGTCC CCCTGCCCTGAC CTATT GCCCTCAA A GTCGT CGCCGACCCCTCCGTGAC CGCC GGTGGG TTCTTCAGGGGGAGGGGACTGGAGATAACGGGAGTTT

CONCLUSIONES

B.1. La activación de PLC γ , las quinasas MAPK/ERKs y la calcineurina/NFAT, mediadas a través de la señalización por el pre-TCR, son necesarias para activar la transcripción germinal del locus de *Tcra* en células SCID.adh y en timocitos de ratón.

B.2. Hemos identificado y comprobado experimentalmente los siguientes sitios de unión para factores de transcripción inducibles: NFAT en las regiones 5'T α 1 y T α 1-T α 2, AP-1 en el elemento T α 1 y Egr-1 en las regiones 5'T α 1, T α 1-T α 2 y 3'T α 4. De hecho, estos sitios se concentran exactamente en la región esencial del enhancer descrita como el enhanceosoma E α , T α 1-T α 2 (y zonas adyacentes), donde se ha descrito la unión específica y esencial de múltiples factores de transcripción constitutivos durante el desarrollo de los timocitos.

B.3 Los factores de transcripción NFAT1, NFAT2 y NFAT4, Egr-1 y AP-1, junto con las HATs CBP/p300, forman un enhanceosoma E α activo in vivo en células SCID.adh estimuladas y timocitos de ratones Rx β , pero no en células SCID.adh no estimuladas y timocitos de ratones *Rag2*^{-/-}.

B.4 E α , y no los promotores primarios TEA y J α 49p, es el elemento responsable de la inducción de la transcripción germinal del locus *Tcra* a través de la ruta de la calcineurina/NFAT y mediada por el pre-TCR. La inducibilidad de E α por los factores NFAT está mediada a través de los sitios descritos en este trabajo.

B.5 Basándonos en los puntos anteriores podemos concluir que: E α se activa en la transición de timocitos DN3a a DP, mediante el ensamblaje de un enhanceosoma formado por los factores de transcripción NFAT, Egr-1 y AP-1, los cuales son inducidos a través de la señalización intracelular generada por el pre-TCR durante la selección- β , para reclutar las actividades HATs, CBP/p300, que median en la apertura de la cromatina del locus *Tcra* permitiendo la accesibilidad de las maquinarias de transcripción y de recombinación V(D)J.

Resultados

Anexos

(Datos no publicados)

Resultados

Anexo I

Análisis de la unión de los factores NFAT y Ets-1 a 5'T α 1

RESUMEN

$E\alpha$ alberga una variada combinación de sitios de unión de proteínas. Estos sitios se pueden dividir en dos tipos: Sitios de unión para proteínas que se expresan de forma constitutiva durante el desarrollo de los timocitos, como son proteínas CREB/ATF, Ets-1/Fli-1, LEF-1/TCF-1, SP1, GATA-3, Runx y proteínas E (E2A y HEB), y sitios de unión para proteínas inducibles a través del pre-TCR, como son los factores NFAT, Egr y AP-1. Sorprendentemente, el análisis de las secuencias de $E\alpha$ revela un amplio solapamiento entre ambos tipos de sitios de unión de proteínas. Por ejemplo, nuestros datos sugieren la existencia de un intercambio protéico entre la unión de CREB y AP-1 en el sitio CRE de $T\alpha_1$, de forma que AP-1 desplazaría a CREB durante la activación de $E\alpha$. De forma similar, existe una coincidencia exacta entre los sitios de unión de proteínas Ets y NFAT presentes en $5'T\alpha_1$ y $T\alpha_1$ - $T\alpha_2$, ya que ambos factores se unen a las mismas secuencias 5'-GGA-3'. Esto sugiere la posibilidad de que exista un intercambio protéico de factores Ets por factores NFAT en estas regiones durante la activación de $E\alpha$. La estabilidad en la unión de Ets-1 ejercida por la unión de Runx-1 a $T\alpha_2$, sugiere que este intercambio por competición de unión al ADN entre proteínas sea más difícil en $T\alpha_2$. Sin embargo, los sitios 2 y 3 de $5'T\alpha_1$ unen Ets-1/Fli-1 de forma no cooperativa con otros factores. Asimismo, NFAT no se une a estos sitios de forma cooperativa formando homodímeros. Esto permite hipotetizar en la posibilidad de una competición entre la unión de estos factores a $5'T\alpha_1$ durante la activación de $E\alpha$. De hecho, esta unión podría ser reversible durante la maduración de los linfocitos T. Estas evidencias abren nuevas posibilidades en el entendimiento del mecanismo de regulación de la activación de $E\alpha$, pudiendo las proteínas Ets-1/Fli-1 ejercer un efecto represor en $E\alpha$ en una población de timocitos DN3a formando parte de un enhanceosoma $E\alpha$ inactivo, mientras que la unión de NFAT, (junto con otros factores inducibles) ejerzan un efecto activador formando parte de un enhanceosoma $E\alpha$ activo.

Resultados. Anexo I. Análisis de la unión de los factores NFAT y Ets-1 a 5'T α 1***Identificación de posibles secuencias para la homodimerización de NFAT en 5'T α 1***

Las proteínas NFAT tienen la capacidad de regular una gran variedad de genes del sistema inmune durante el desarrollo. Las secuencias presentes en los elementos reguladores, enhancers y promotores restringen el contexto proteico en el que cooperan las proteínas NFAT para regular la transcripción de sus genes diana. A nivel estructural, las proteínas NFAT pueden actuar como monómeros o dímeros (homodímeros o heterodímeros). Cuando NFAT se une a sus secuencias consenso como heterodímeros, el monómero de NFAT interactúa con otro factor de transcripción, normalmente a través de su dominio de unión a ADN (DBD), como ocurre cuando interactúa con AP-1, para dar lugar a una cooperación funcional entre ambos. La activación transcripcional de genes regulados por heterodímeros NFAT/AP-1 se atribuye a la actuación de los dominios de transactivación de los complejos AP-1, teniendo las proteínas NFAT una misión de estabilización del complejo a las secuencias de ADN [204]. Por otra parte, las proteínas NFAT también pueden unirse al ADN como homodímeros, a través de su dominio DBD, y reclutar cofactores, como p300 y CBP, para la activación transcripcional de genes, como es el caso del promotor de TNF α [119, 205]. El análisis de las secuencias de ADN requeridas para la homodimerización de NFAT revela la existencia de distintas formas de homodimerización dependiendo de la distancia y la orientación que existen entre los dos sitios de unión de NFAT. Así, las secuencias de mayor afinidad para la unión de homodímeros NFAT contienen dos sitios 5'-GGA-3' invertidos, como ocurre en el sitio denominado PRDII del promotor INF β (Fig. 1). La formación cooperativa de homodímeros NFAT implica la existencia de un sitio de unión de NFAT de alta afinidad y otro de baja afinidad en posiciones invertidas, de tal forma que la unión de NFAT a su sitio de baja afinidad es potenciado al interaccionar con otra molécula de NFAT unida a un sitio de alta afinidad [119]. Existen otras secuencias que permiten la formación de homodímeros de menor afinidad denominadas GGADir, consistentes en dos secuencias de unión de NFAT 5'-GGA-3' no invertidas (Fig. 1). Una diferencia importante entre las dos formas de homodimerización (a secuencias GGAInv y

GGAdir) es que en la dimerización en secuencias GGAINV existe una unión cooperativa entre las dos moléculas de NFAT [119].

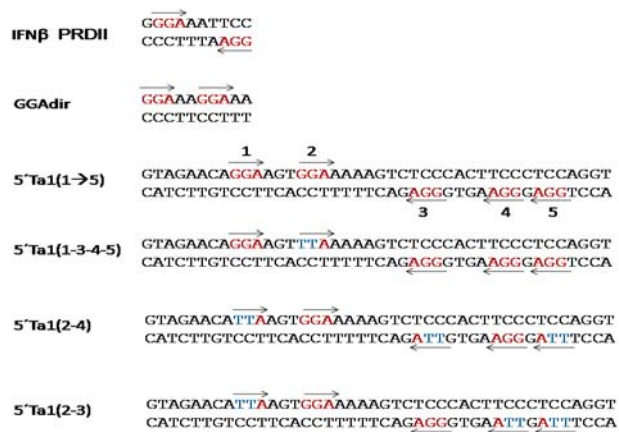


Figura 1. Secuencias de unión de proteínas NFAT a sondas consenso de homodimerización, GGAINV y GGAdir, y a 5'Tα1. Las secuencias de homodimerización de factores NFAT, GGAINV (INFβ, PRDII) y GGAdir están mostradas, junto con las secuencias de los sitios para NFAT presentes la región 5'Tα1 (rojo), indicando las mutaciones puntuales GG→TT introducidas de estos sitios (azul); La orientación GGA de los sitios de unión para NFAT mediante flechas.

Dada la cantidad de posibles sitios de unión para NFAT que encontramos a lo largo de toda la secuencia de Eα, analizamos los posibles sitios de homodimerización según los criterios descritos [119]. Después de realizar el mapeo detallado de los sitios de unión para NFAT a Eα (Resultados B, Tabla S1, Fig. S3), observamos un posible sitio GGAINV en la región 5'Tα1, formado por los sitios 2 y 3 para NFAT (Fig. 1). Los estudios realizados de homodimerización de NFAT han mostrado una serie de condiciones restrictivas de las secuencias de ADN para promover la homodimerización de NFAT [119], entre las que se encuentra la distancia entre los sitios de unión. Para la homodimerización de NFAT de alta afinidad en sitios de unión invertidos (GGAINV) se requiere una distancia de 9-10 bp entre los núcleos de la secuencia de unión 5'-GGA-3', no permitiéndose esta homodimerización cuando la distancia entre los sitios es 8, 11 o 12 bp, debido a un posible impedimento estérico o a una incapacidad de contacto entre ambas moléculas. En Eα, la distancia de las secuencias GGAINV formadas por los sitios 2 y 3 de unión para NFAT es de 13 bp (Fig. 1). Como la capacidad de promover la homodimerización de factores NFAT por secuencias GGAINV con una separación de 13 bp no había sido analizada anteriormente [119], y además, nuestros ensayos de comparación de afinidad relativa en la unión de moléculas individuales de NFAT a los sitios 2 y 3 para NFAT de 5'Tα1 demostraron

que el sitio 2 une NFAT con alta afinidad, mientras que el sitio 3 une NFAT con media o baja afinidad (Resultados B. Fig. S3), nos llevaron a testar la posible homodimerización de NFAT a estos sitios por unión cooperativa al ADN.

NFAT no forma homodímeros por unión cooperativa a la región 5'Tα1 de Ea

Para analizar la unión de NFAT *in vitro* a estas secuencias, utilizamos ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) con el DBD de NFAT1 (DBD-NFAT), ya que para las homodimerizaciones de NFAT solo es necesario este dominio [119], y distintas sondas de 5'Tα1 marcadas radiactivamente (Figs. 1 y 2). En estos experimentos, se observaron dos complejos conteniendo DBD-NFAT unidos a ADN: El complejo de mayor movilidad electroforética corresponde a la unión a la sonda de ADN de un monómero de DBD-NFAT (1xNFAT), mientras que el complejo de menor movilidad electroforética corresponde a la unión a la sonda de ADN de un posible dímero de DBD-NFAT o de dos monómeros de DBD-NFAT (2xNFAT)(Fig. 2).

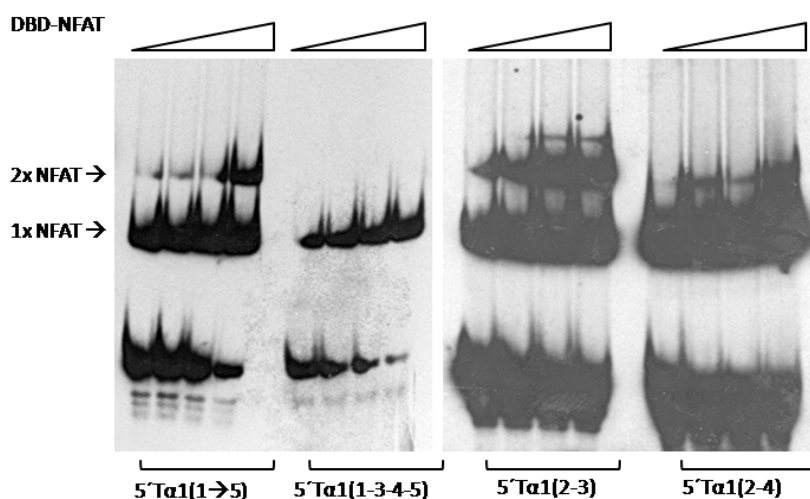


Figura 2. Análisis de dimerización de NFAT en la región 5'Tα1. EMSAs con sondas de la región 5'Tα1 y proteína recombinante DBD-NFAT. La unión de una o dos moléculas de DBD-NFAT, 1xNFAT y 2xNFAT, está indicado. Los triángulos indican la adición de concentraciones crecientes de DBD-NFAT. Las sondas usadas corresponden a la región 5'Tα1 y versiones mutadas de ésta en los sitios 2 o 3 (Fig.1).

Cuando se usa una sonda de la región 5'T α 1 o una sonda con los dos sitios para NFAT capaces de unir NFAT (sitios 2 y 3) intactos (sondas 5'T α 1 [1→5] y 5'T α 1 [2-3], respectivamente), se detectan dos bandas correspondientes a los complejos 1xNFAT y 2xNFAT (Fig. 2), indicando que dos moléculas de NFAT pueden unirse simultáneamente a una secuencia de ADN conteniendo estos dos sitios de unión de NFAT. Como era esperable, la introducción de mutaciones puntuales en los sitios 2 o 3 de unión para NFAT (sondas 5'T α 1 [1-3-4-5] y 5'T α 1 [2-4], respectivamente) destruye la capacidad de unión simultánea de las dos moléculas de DBD-NFAT a esta secuencia (Fig. 2). Los análisis de unión de una molécula de DBD-NFAT a estas sondas con un solo sitio de unión activo, corroboró los resultados de alta afinidad de unión de DBD-NFAT al sitio 2 y baja/media afinidad de unión de NFAT al sitio 3 obtenidos en análisis anteriores (Resultados B. Fig. S3)(Figs. 2 y 3). El hecho que se detecte la unión simultánea de dos moléculas de DBD-NFAT, junto con la observación que el sitio 2 es de alta afinidad y el 3 de media/baja afinidad, apoyaban la posibilidad que NFAT quizá pudiera homodimerizar en su unión a 5'T α 1.

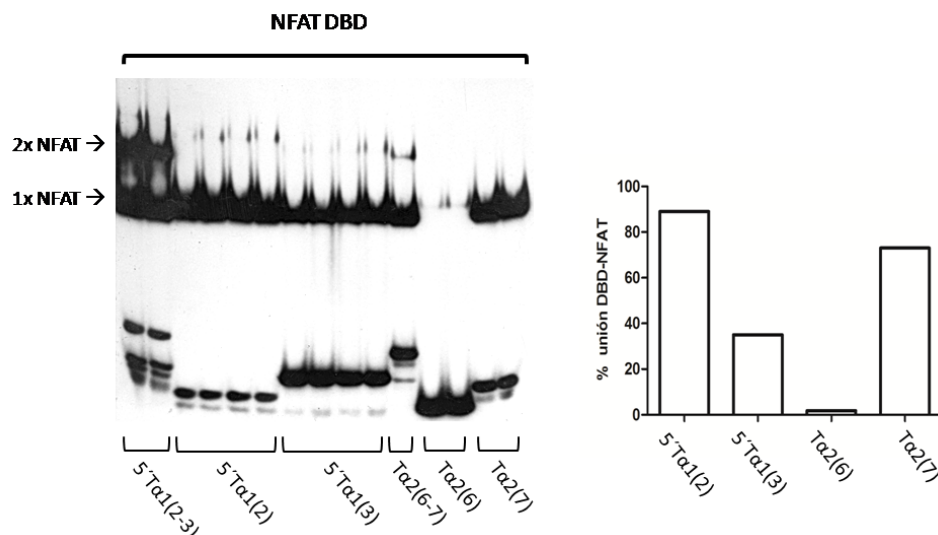


Figura 3. Análisis de afinidad de unión de NFAT a los sitios 2 y 3 de 5'T α 1 mediante EMSAs. Se realizaron EMSAs duplicados con sondas de la región 5'T α 1 y 0,14 μ g de proteína recombinante DBD-NFAT. Los complejos formados por una molécula y dos moléculas de DBD-NFAT, 1xNFAT y 2xNFAT, respectivamente, están indicados. Gráfica de las cuantificaciones de formación de los complejos 1xNFAT respecto al total de sonda.

En el caso que haya unión cooperativa entre los factores NFAT unidos a los sitios 2 y 3 de 5'T α 1, la formación de dímeros (complejo 2xNFAT) debe verse favorecida con respecto a la formación de monómeros (complejos 1xNFAT) a medida que aumentamos la concentración de DBD-NFAT en los ensayos de unión en vitro. Cuantificando la formación de estos complejos en EMSAs, se comprobó que la formación del complejo 2xNFAT no está favorecida, con respecto a la formación de los complejos 1xNFAT, a medida que se aumenta la concentración de proteína DBD-NFAT en el ensayo (Fig. 4). Al comparar la formación del complejo 2xNFAT en secuencias 5'T α 1[2-3], PRDII del promotor del INF β (con dos sitios GG_{Inv} capaces de inducir unión cooperativa de NFAT) y GG_{Dir} (con dos sitios GG_{Dir} capaces de unir dos moléculas de NFAT de forma no cooperativa)[119], comprobamos que la formación del complejo 2xNFAT en la sonda 5'T α 1[2-3] se asemeja más a la formación del complejo 2xNFAT observada con la sonda GG_{Dir}, que a la formación del complejo 2xNFAT observada con la secuencia PRDII.

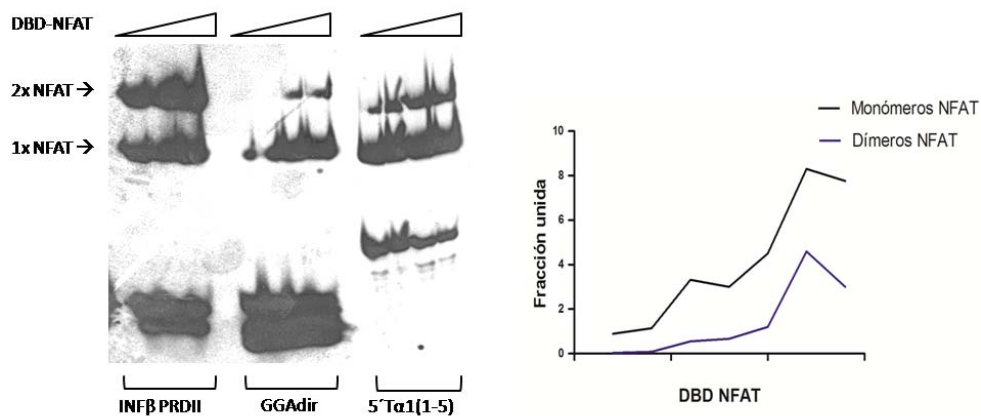


Figura 4. Unión no cooperativa de NFAT a la región 5'T α 1. Análisis comparativo de la formación de complejos 2xNFAT con concentraciones crecientes de DBD-NFAT. Gráfica representativa de la fracción de formación de complejos 1xNFAT y 2xNFAT respecto al total de sonda presente en el ensayo.

La ausencia de cooperatividad en la unión de DBD-NFAT a los sitios 2 y 3 para NFAT de 5'T α 1 indica que no hay interacción física entre las dos moléculas de NFAT unidas simultáneamente a esta secuencia de ADN. Estas moléculas posiblemente cooperen con otros factores de transcripción unidos a 5'T α 1, como pueden ser los factores Egr que son capaces de formar heterodímeros NFAT/Egr y cooperar funcionalmente con NFAT en la activación de la transcripción génica [144]. De hecho, el sitio 2 para NFAT de 5'T α 1 está inmediatamente adyacente a un sitio para Egr (Resultados B. Fig. S1). La disección de los sitios Egr en E α y su colaboración con los sitios adyacentes de NFAT serán objeto de futuras investigaciones.

Sustitución del factor Ets-1 por el factor NFAT durante la selección- β

Los experimentos de *footprinting* genómico usando DMS no mostraron diferencias apreciables en la ocupación de E α entre los timocitos DN3a y DP, indicando que las proteínas de unión a E α en ambos estadios podrían ser las mismas o muy relacionadas (Resultados B. Fig. S1). Nuestros resultados demuestran que los sitios de unión de los factores inducibles por el pre-TCR, NFAT, Egr-1 y AP-1, coinciden con varios sitios funcionales de unión a E α de factores constitutivos previamente descritos. En concreto, los sitios de unión 2 y 3 de NFAT en la región 5'T α 1 coinciden exactamente con sitios previamente descritos de unión para proteínas de la familia Ets, en concreto Ets-1 y Fli-1 [192, 196]. De hecho, los contactos ADN-proteína derivados de la unión de factores Ets y NFAT son indistinguibles mediante *footprinting* genómico con DMS [206]. La expresión constitutiva de los factores Ets-1/Fli-1 a lo largo de todo el desarrollo de los linfocitos T sugiere que éstas no sean responsables de la activación de E α en la transición de DN3a a DP. Estos datos juntos permiten hipotetizar en la posibilidad de un intercambio molecular entre las proteínas Ets-1/Fli-1 y las proteínas NFAT unidas a la región 5'T α 1 durante la formación de un enhanceosoma E α inducible en la transición de timocitos DN3a a DP. De hecho, la falta de unión cooperativa por homodimerización de proteínas NFAT a estos sitios también favorecería este posible intercambio reversible entre factores de transcripción por competición en su unión al ADN.

Para comprobar esta posible sustitución entre factores Ets y NFAT durante la activación de $E\alpha$, analizamos la unión en vitro de estas proteínas a la región $5'T\alpha1$. Para ello, realizamos EMSAs con extractos celulares procedentes de células SCID.adh en dos condiciones distintas: SCID.adh no estimuladas (con $E\alpha$ inactivo) y SCID.adh estimuladas con PMA e ionomicina (con $E\alpha$ activo) (Fig. 5). Se ha descrito que las proteínas Ets-1 tienen un mecanismo de autorregulación dependiente de Ca^{2+} , por el cual sufren un proceso de fosforilación que inhibe su unión al ADN [207]. En nuestros experimentos mostrados en la Fig. 5, se puede observar que la unión de Ets-1 a $5'T\alpha1$, detectada cuando el ensayo se hace en presencia de un extracto nuclear procedente de células no estimuladas (complejo marcado como Ets-1), es inhibida cuando el ensayo se realiza en presencia de un extracto nuclear procedente de células estimuladas, lo cual está en consonancia con la inhibición de la unión de Ets-1 descrita tras la estimulación celular [207]. La identidad del complejo marcado como

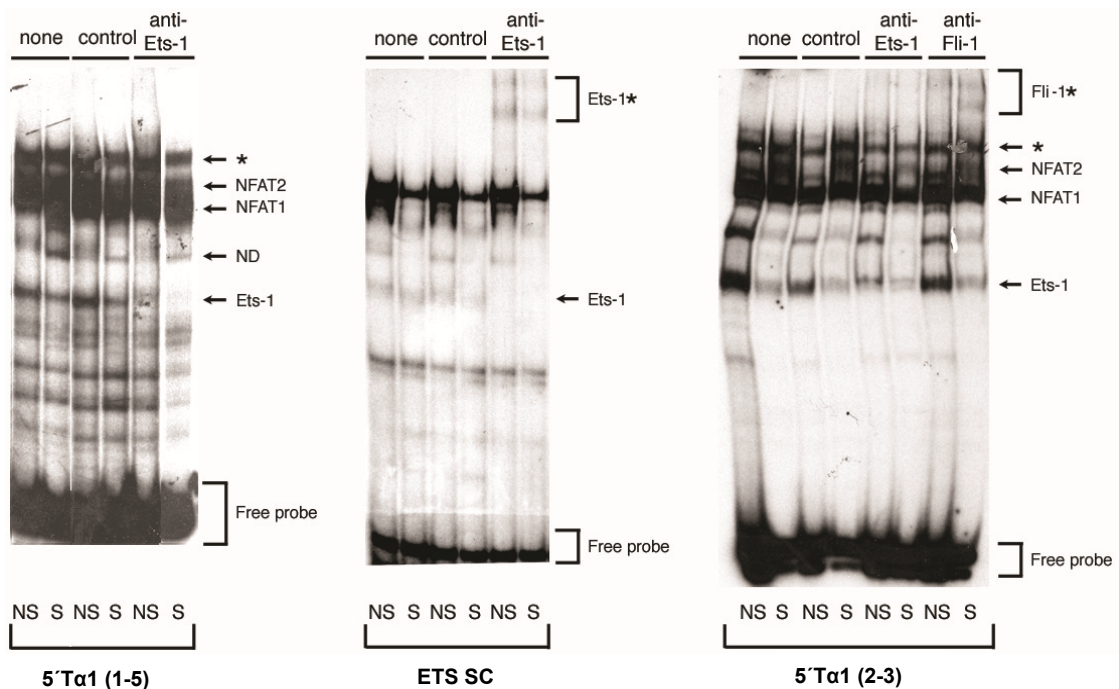


Figura 5. Factores Ets-1 unen específicamente a sitios de la región $5'T\alpha1$ de $E\alpha$. EMSA de la derecha: Formación de complejos con Ets-1 y NFAT con la sonda $5'T\alpha1$ en ensayos con extractos nucleares de células SCID.adh no estimuladas (NS) o estimuladas (S). La identidad de los complejos está indicada. EMSA del centro: Unión de Ets-1 a la secuencia consenso. La identidad del complejo conteniendo Ets-1 está indicada. Ets-1* indica el complejo conteniendo ADN, Ets-1 y anticuerpo. EMSA de la izquierda: Los complejos formados con las proteínas Ets y NFAT están indicados. ND, complejo no identificado. Los anticuerpos añadidos están indicados.

Ets-1 se realizó mediante la adición de un anticuerpo específico (Fig. 5), el cual produjo una inhibición de la formación de complejo conteniendo Ets-1 y/o un superretardo del complejo conteniendo Ets-1. La disminución de la unión de Ets-1 a ADN en células estimuladas, respecto a no estimuladas, también se evidenció mediante la comparación de la abundancia de los complejos conteniendo Ets-1 y anticuerpo (marcados como Ets-1*) (Fig. 1. EMSA del centro). Nuestros experimentos también evidenciaron la capacidad de Fli-1 de unirse a 5'T α 1 *in vitro* (Fig. 5; EMSA de la derecha), tal y como había sido descrito previamente *in vivo* [192].

El hecho de que la unión de NFAT a la sonda 5'T α 1 ocurra en sentido contrario a como ocurre con la unión de Ets-1, es decir se activa la unión de NFAT cuando se inhibe la unión de Ets-1, y que ambos factores reconozcan la misma secuencia GGA en el ADN, apoyan la hipótesis de la existencia de un intercambio de proteínas en la ocupación de estos sitios durante la activación de E α .

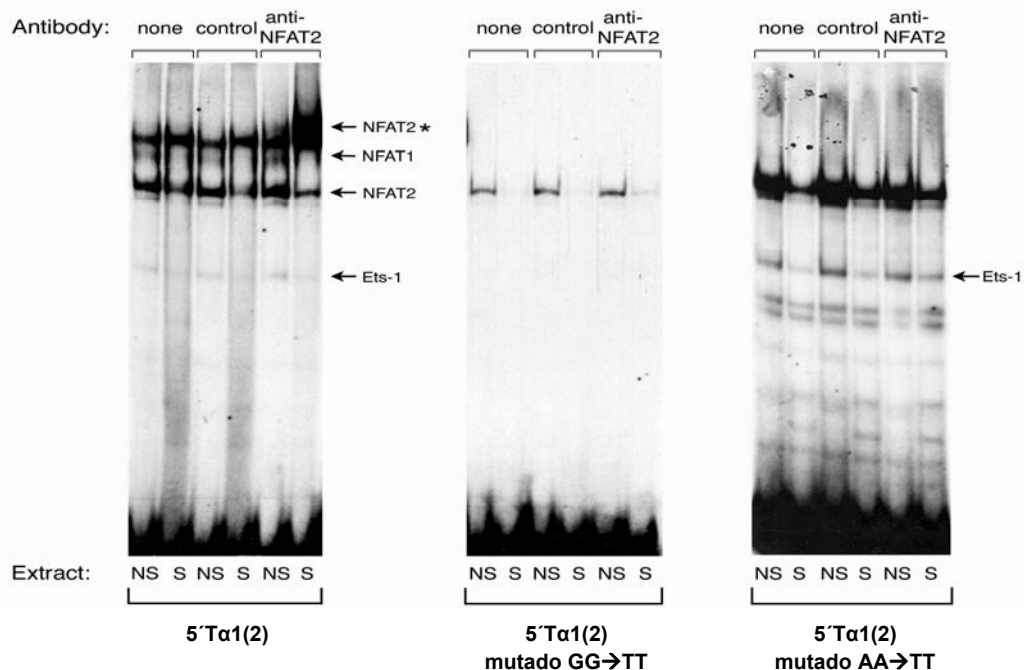


Figura 6. Unión de factores Ets-1 y NFAT al mismo sitio en 5'T α 1. EMSAs de factores Ets-1 y NFAT al sitio 2 de 5'T α 1 intacto o mutado (GG \rightarrow TT o AA \rightarrow TT), usando extractos nucleares de células SCID.adh no estimuladas (NS) y estimuladas (S).

Como se ha mostrado anteriormente (Resultados B: Fig. S3; Anexo I: Figs. 1 y 2), el sitio 2 de unión para NFAT en 5'T α 1 es el sitio de mayor afinidad dentro de este fragmento de ADN. Experimentos de unión a una sonda conteniendo sólo el sitio 2 para NFAT en el contexto de la sonda 5'T α 1 (5'T α 1[2]) demostraron la capacidad de Ets-1 y NFAT de unirse a este sitio (Fig. 6). Mediante la comparación de la abundancia de los complejos formados con la sonda 5'T α 1[2] mediante EMSAs realizados con extractos de células no estimuladas y estimuladas, se observó el mismo patrón de unión de NFAT y Ets-1 observado con la sonda 5'T α 1: NFAT se une preferentemente cuando se usan extractos de células estimuladas, y Ets-1 se une preferentemente cuando se usan extractos de células no estimuladas (Fig. 6).

Para comprobar que ambos factores se unen exactamente al mismo sitio diseñamos mutaciones puntuales capaces de inhibir específicamente la unión de uno u otro factor. Mediante el programa MatInspector identificamos posibles mutaciones que permiten eliminar la unión de NFAT, sin eliminar la unión de Ets-1, o eliminar la unión de ambos factores. Así, dentro del núcleo de unión de ambas proteínas al sitio 2 de 5'T α 1 (5'-GT**GG**AAAAGT-3'), la mutación GG→TT elimina la unión de ambas proteínas, mientras que la mutación de AA→TT solo elimina la unión de NFAT (Fig. 7).

```

5'T $\alpha$ (1→5)      1      2      3      4      5
GTAGAACAGGAAGTGGAAAAAGTCTCCCACTTCCCTCCAGGTGTTTGGG
CATCTTGTCCTTCACCTTTTTCAGAGGGTGAAGGGAGGTCCACAAACCC

5'T $\alpha$ (2)
GTAGAACAGGAAGTGGAAAAAGTCTCCCACTTC
CATCTTGTCCTTCACCTTTTTCAGAGGGTGAAG

5'T $\alpha$ (2)m 2GG
GTAGAACAGGAAGTTTAAAAAGTCTCCCACTTC
CATCTTGTCCTTCAAATTTTTCAGAGGGTGAAG

5'T $\alpha$ (2)m 2TT
GTAGAACAGGAAGTGGAATTAGTCTCCCACTTC
CATCTTGTCCTTCACCTTAATTCAGAGGGTGAAG

```

Figura 7. Esquema de oligos utilizados en EMSAs. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en estos experimentos de unión son mostradas. Todos los posibles sitios de unión de NFAT (azul) son mostrados. Las mutaciones en el sitio 2 (GG→TT o AA→TT) están marcadas en rojo.

El efecto de estas mutaciones fue examinado mediante EMSAs (Fig. 6). Se comprobó que la mutación GG→TT inhibe tanto la unión de Ets-1 en ensayos con extractos de células no estimuladas, como la unión de NFAT en ensayos con extractos de células estimuladas. Al analizar el efecto de la mutación AA→TT en la unión de estas proteínas, se observó que ésta únicamente inhibe la unión de proteínas NFAT, y no de Ets-1. Estos datos indican que ambos factores se unen exactamente al mismo sitio, y apoyan la hipótesis que pueda haber un intercambio de unión entre ambas proteínas, ya que no pueden ocupar simultáneamente la misma secuencia de ADN. Esto explicaría los datos de *footprinting* genómico con DMS, en los cuales no se ve cambio en la ocupación de la región 5'T α 1 cuando se comparan poblaciones de timocitos DN3a y DP.

Estos datos, junto con el hecho que no se vean diferencias apreciables en los contactos ADN/proteína en células DN3a y DP en experimentos de *footprinting* genómico, apoyan la hipótesis que Ets-1 ocupe estos sitios en células DN3a y NFAT ocupe estos sitios tras la estimulación por el pre-TCR. Estas evidencias abren nuevas posibilidades en el entendimiento del mecanismo de regulación de la activación de E α , pudiendo la proteína Ets-1 ejercer un efecto represor en E α en una población de timocitos DN3a, mientras que la unión de NFAT (y otros factores inducibles) ejerzan un efecto activador, mediante el reclutamiento de co-activadores y actividades modificadoras de la estructura de la cromatina, como es el caso de CBP/p300.

(*Nota: Material y métodos en resultados B).

CONCLUSIONES

C.1. Los sitios de unión 2 y 3 de la región 5'T α 1 no tienen capacidad de inducir la unión cooperativa de homodímeros de NFAT. Por tanto, las proteínas NFAT se unen como monómeros independientes a estos sitios en la región 5'T α 1.

C.2. Los factores Ets-1/Fli-1 se unen *in vitro* a la región 5'T α 1. Esta unión es inhibida tras una señalización equivalente a la trasducida por el pre-TCR (como es la que ocurre en la activación de células SCID.adh).

C.3 Las proteínas NFAT pueden sustituir *in vitro* a las proteínas Ets-1 en la ocupación del sitio 2 de la región 5'T α 1 durante la activación de células SCID.adh.

C.4. En función de todos los puntos anteriores, podemos concluir que: La posible sustitución de proteínas Ets-1/Fli-1 por proteínas NFAT en los sitios 2 y 3 de la región 5'T α 1 pudiera constituir un mecanismo de regulación de E α basado en la competición de unión entre estos factores durante la señalización por el pre-TCR. La ocupación de estos sitios por Ets-1/Fli-1 daría lugar al ensamblaje de un enhanceosoma E α inactivo en timocitos DN3a, mientras que el desplazamiento de estos factores mediado por la ocupación de estos sitios por los factores NFAT inducidos a través de la señalización por el pre-TCR, daría lugar al ensamblaje de un enhanceosoma E α activo durante la transición de timocitos DN3a a timocitos DP.

Resultados

Anexo II

**Análisis de la actividad de $E\alpha$ durante la maduración de los
linfocitos T**

RESUMEN

Nuestros datos revelan que el mecanismo para la activación de $E\alpha$ ocurre a través de la señalización por el pre-TCR, mediante el ensamblaje de un enhanceosoma activo conteniendo los factores inducibles NFAT, AP-1 y Egr-1, los cuales forman una plataforma molecular para el reclutamiento de las HATs CBP/p300 que dispara la transcripción germinal y las recombinaciones $V\alpha J\alpha$ primarias en el locus *Tcra*. La activación de estos factores inducibles se produce de manera transitoria en la primera fase de la señalización a través del pre-TCR, lo cual sugiere que éstos dejen de formar parte del enhanceosoma $E\alpha$, inactivándolo, cuando su disponibilidad disminuya en el núcleo en una segunda fase de señalización. De esta forma, la activación de $E\alpha$ sería transitoria durante el desarrollo de los linfocitos T, siendo únicamente necesaria en las etapas tempranas de la señalización mediada por el pre-TCR para activar la transcripción germinal y los reordenamientos primarios del locus *Tcra* durante la transición de timocitos DN3a a DP, siendo su función innecesaria en etapas posteriores, timocitos DP tardíos, timocitos SP y linfocitos T periféricos, cuando el locus presenta una configuración reordenada, cuya transcripción quizá dependa únicamente de los promotores asociados a los segmentos $V\alpha$ reordenados productivamente. Por esa razón, decidimos analizar la actividad de $E\alpha$ durante la maduración de los linfocitos T. En primer lugar, comparamos la capacidad de activar $E\alpha$ por las señalizaciones mediadas a través de un pre-TCR o un $TCR\alpha\beta$. Nuestros datos indican que ambas señalizaciones son prácticamente indistinguibles en su eficiencia para activar $E\alpha$ en timocitos de ratón en vivo. En segundo lugar, hemos analizado la funcionalidad de $E\alpha$ en linfocitos T periféricos en vivo, tanto en el locus *Tcra* endógeno como en una localización ectópica. Nuestros análisis cuantitativos de los transcritos dependientes de $E\alpha$ demuestran, de forma inequívoca, que este enhancer está inactivo en células T periféricas. Además, los análisis comparativos de la estructura de la cromatina de timocitos DP y linfocitos T periféricos muestran que las modificaciones epigenéticas conducentes a la apertura de la cromatina dependientes de $E\alpha$ se ven drásticamente reducidas en células T periféricas, tanto en un contexto endógeno como ectópico. Estos datos están en concordancia con el mecanismo molecular propuesto para la activación del enhanceosoma de $E\alpha$, demostrando que su actividad es transitoria, estando $E\alpha$ inactivo en timocitos DN3a, activo en timocitos DN4/DP e inactivo en linfocitos T periféricos.

Resultados. Anexo II.

Análisis de la actividad de E α durante la maduración de los linfocitos T

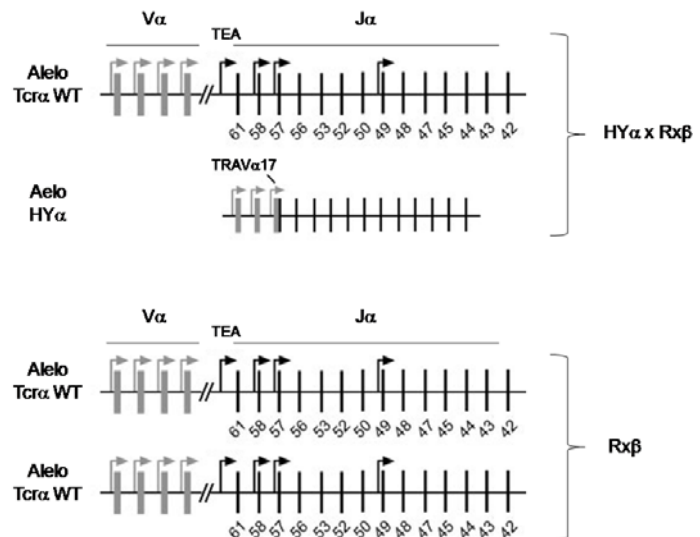
Las señalizaciones mediadas por los complejos TCR $\alpha\beta$ y pre-TCR son indistinguibles en la activación de E α en timocitos DN4/DP

La activación de E α en la transición de timocitos DN4 a DP induce la transcripción germinal del locus *Tcra*, la cual es necesaria para la iniciación de los reordenamientos $V\alpha J\alpha$ primarios [27, 164]. Nuestros datos demuestran que los factores inducibles a través del pre-TCR son esenciales para la activación de E α , y por tanto para la activación de los transcritos germinales y los reordenamientos primarios $V\alpha J\alpha$ en el locus *Tcra*. El acercamiento de los promotores de los segmentos $V\alpha$ reordenados a los segmentos $J\alpha$ regula los reordenamientos $V\alpha J\alpha$ secundarios [166], sin una demostración que E α sea necesario para dichos reordenamientos. Después del ensamblaje de un reordenamiento $V\alpha J\alpha$ productivo, los timocitos DP expresan un TCR $\alpha\beta$ funcional, capaz de señalar y dirigir los procesos de selección positiva que llevan a la diferenciación a timocitos SP-CD4 o SP-CD8, los cuales abandonan el timo como linfocitos T maduros “vírgenes”, migrando a los órganos linfoides periféricos. Debido a que los timocitos DP progresan desde una fase en la que expresan el pre-TCR, con un *Tcra* en configuración germinal o en proceso de reordenamiento, a otra fase en la que expresan un TCR $\alpha\beta$, con un *Tcra* en configuración reordenada cuya expresión pudiera depender exclusivamente de los promotores asociados a los $V\alpha$ reordenados, nos planteamos examinar si las señalizaciones transducidas por estos receptores eran diferentes en su capacidad de activar E α .

Para llevar a cabo un análisis comparativo entre la señalizaciones mediadas por el pre-TCR y el TCR $\alpha\beta$ en timocitos DP utilizamos un modelo de ratón previamente establecido [166, 208], consistente en la introducción de un reordenamiento $V\alpha 17 J\alpha 57$ productivo en el locus *Tcra*, con eliminación de la región entre $V\alpha 21/V\delta 12$ y $J\alpha 57$, y por tanto, reproduciendo de forma exacta un reordenamiento primario $V\alpha 17 J\alpha 57$ natural (Fig. 8). Esta cadena reordenada del

TCR α (HY α) es la misma que está presente en el modelo de ratón HY-I, que reconoce un péptido específico masculino en el contexto de un MHC H2D^b [208].

Figura 8. Estructura de los alelos de *Tcra* en el modelo HY α . Los rectángulos grises representan los segmentos génicos V α y los negros representan los segmentos génicos J α . Las flechas indican la ubicación de los promotores activos en ambos alelos de los modelos de ratón Rag2^{-/-} x Tcrb (Rxb) y HY α x Rx β . (Esquema adaptado de Hawwari A. y M.S. Krangel. 2007. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:903-907).



Estos ratones fueron previamente cruzados en el laboratorio del Dr. Michael S. Krangel, de Duke University (EEUU), con ratones Rag2^{-/-} x Tcrb (Rx β) para obtener ratones HY α x Rag2^{-/-} x Tcrb (HY α x Rx β), con el fin de estudiar el efecto de los reordenamientos primarios del locus del *Tcra* en los sucesivos reordenamientos secundarios en el locus [166].

Los timocitos DP de los ratones Rx β no reordenan y por tanto no expresan un transcrito del *Tcra* productivo o codificante (debido a la deficiencia de la proteína RAG-2), por tanto, solo expresan el pre-TCR. Además, al no haber competición de la cadena TCR α con la cadena p-T α por su ensamblaje con la cadena del TCR β [209], es esperable que el pre-TCR permanezca presente en la membrana de los timocitos DP de los ratones Rx β . De hecho, a pesar de la inhibición de la expresión del gen de p-T α que ocurre durante la señalización por el pre-TCR, los timocitos DP expresan significativas cantidades de transcritos de p-T α [209-210]. En el caso de los ratones HY α , la situación es muy distinta. La cadena HY α se expresa de forma prematura en el desarrollo de los linfocitos T, ensamblándose con la cadena TCR β dando lugar a la

expresión temprana de un TCR $\alpha\beta$ capaz de dirigir la diferenciación de DN3 a DP en ausencia de pre-TCR, examinado en ratones p-T $\alpha^{-/-}$ [211].

Usando estos modelos de ratón, hemos comparado las influencias que tienen las señalizaciones mediadas a través de un pre-TCR (timocitos de ratones Rx β) o mediadas a través de un TCR $\alpha\beta$ (timocitos de ratones HY α) en la activación de E α (Fig. 9). Para ello, hemos analizado la abundancia de transcritos germinales de J α 61, los cuales son dependientes de la actividad de E α y del promotor TEA por PCR mediante retrotranscriptasa (RT-PCR) a tiempo real o cuantitativa. Los ratones Rx β tienen los dos alelos del locus del *Tcra* en configuración germinal, mientras que en los ratones HY α cruzados con ratones Rx β , un alelo se encuentra en configuración germinal y el otro alelo tendrá el reordenamiento correspondiente a la cadena HY α (Fig. 8). Los transcritos J α 61 detectados solo pueden proceder de los alelos en configuración germinal, ya que están ausentes en el alelo HY α (Fig. 8).

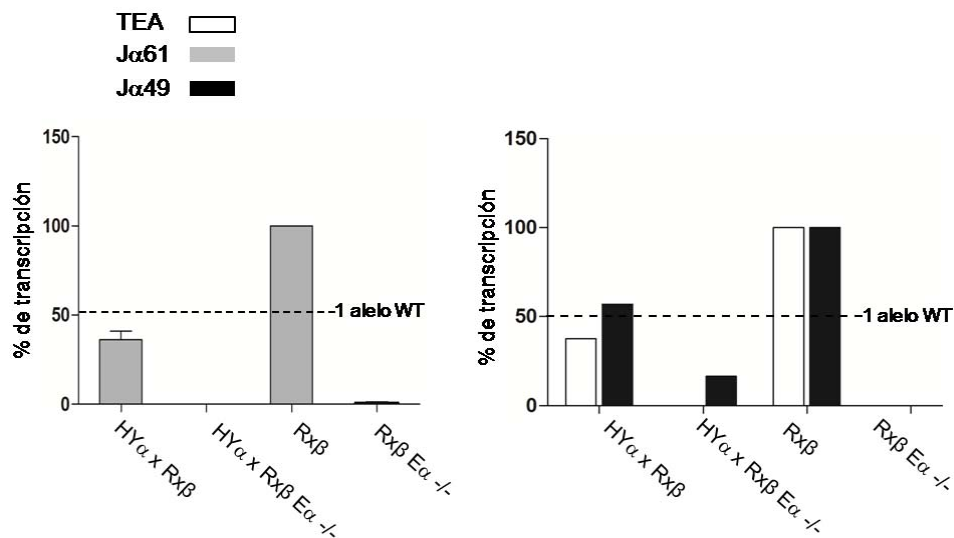


Figura 9. Transcripción germinal J α dependiente de E α . Porcentaje de transcripción de los segmentos TEA, J α 61 y J α 49 de timocitos totales de ratones Rx β , HY α x Rx β , HY α x Rx β E $\alpha^{-/-}$ y Rx β E $\alpha^{-/-}$. La transcripción detectada en timocitos totales de ratones Rx β se considera 100% de la transcripción. La línea discontinua marca el 50% de transcripción observada en ratones Rx β , correspondiente a la transcripción generada por un alelo del *Tcra* en configuración germinal.

Mediante estos análisis, hemos observado que los timocitos de los ratones $HY\alpha \times Rx\beta$ tienen un 36% de transcritos $J\alpha 61$, comparándolos con el 100% obtenido en timocitos de ratones $Rx\beta$ (Fig. 9). Como los transcritos de los ratones $Rx\beta$ proceden de dos alelos, calculando un 50% de transcripción/alelo, esto significa que la sustitución de un $TCR\alpha\beta$ por un pre-TCR da lugar a un 14% de inhibición de la transcripción dependiente de $E\alpha$. Para demostrar que los transcritos analizados realmente corresponden a transcritos dependientes de $E\alpha$, se analizaron los transcritos $J\alpha 61$ procedentes del cruce de ratones $HY\alpha$ con ratones $Rx\beta E\alpha^{-/-}$. En estos ratones, el alelo que está en configuración germinal ($Rx\beta$) no contiene $E\alpha$, mientras que el alelo $HY\alpha$ lo tiene intacto. Como $E\alpha$ actúa en *cis*, la eliminación de $E\alpha$ solo afecta a los transcritos del alelo $Rx\beta$. Como era esperable, el análisis de los transcritos $J\alpha 61$ demostró que éstos son dependientes de $E\alpha$ (Fig. 9). Resultados similares se obtuvieron mediante el análisis de estos transcritos utilizando oligonucleótidos que permiten amplificar todos los transcritos originados en el promotor TEA (Fig. 9). También se analizaron los transcritos iniciados en $J\alpha 49$ (Fig. 9). En el análisis de estos transcritos hay que tener en cuenta que el promotor $J\alpha 49$ está presente tanto en el alelo $Rx\beta$ como en el alelo $HY\alpha$ (Fig. 8). El hecho de que la transcripción iniciada en $J\alpha 49$ en el alelo $HY\alpha$ se encuentre disminuida debido al efecto negativo que ejercen sobre ella la transcripción activa desde promotores $V\alpha$ [166], permite su análisis. De hecho, la mayor parte de los transcritos $J\alpha 49$ detectados proceden del alelo $Rx\beta$. Se puede corregir la transcripción $J\alpha 49$ procedente del alelo $HY\alpha$, mediante la sustracción del fondo de transcripción observada en los ratones $HY\alpha \times Rx\beta E\alpha^{-/-}$, iniciada en los promotores $V\alpha$ del alelo $HY\alpha$ (Fig. 9). Así, nuestro análisis reveló una inhibición del 10% de transcritos $J\alpha 49$ en los ratones que señalizan por el TCR respecto a los ratones que señalizan por el pre-TCR (Fig. 9). Los bajos niveles de inhibición de la actividad de $E\alpha$ detectados (10-14%), en función del cambio de señalización de un pre-TCR por un TCR, no son significativos y permiten concluir que las señalizaciones mediadas por estos receptores son prácticamente equivalentes en su capacidad de activar $E\alpha$.

E α se inactiva en células T periféricas en reposo.

Nuestros datos demuestran que el ensamblaje de un enhanceosoma E α activo en la transición de timocitos DN3a a DN4/DP conlleva el reclutamiento de los factores inducibles NFAT, Egr-1 y AP-1 a través de la señalización por el pre-TCR. Estos factores transcripcionales están involucrados en la regulación de una gran variedad de genes durante la activación de las células T para coordinar la respuesta inmune celular. [116, 212]. Por tanto, para llevar a cabo sus funciones reguladoras, es de esperar que estos factores no estén funcionalmente activos en células T en reposo. Esto sugiere que E α quizá no esté activo en células T en reposo, siendo su actividad sólo realmente crucial durante el desarrollo de los timocitos, jugando un papel fundamental en los procesos de activación de transcripción germinal iniciada en los promotores primarios, TEA y J α 49, y en la activación de los reordenamientos V α J α primarios. En ese caso, la transcripción de un *Tcra* reordenado en células T periféricas dependería, no de la actividad de E α como se supone, sino de la actividad de los promotores de los segmentos génicos V α reordenados, cuya actividad podría ser independiente de E α , como así parece ser en al menos 2/3 partes de ellos [60].

Para examinar la actividad de E α en células T periféricas en reposo, hemos analizado la transcripción germinal iniciada en TEA, dependiente de E α , en timocitos y células T periféricas procedentes de ratones que expresan un TCR clonotípico, específico de un péptido del citocromo C de paloma en el contexto del MHC de clase II I-E^{ak} (ratones 5C.C7) [213], en el contexto de la mutación Rag2^{-/-} [18], ratones 5C.C7 Rag2^{-/-}. Los timocitos de estos ratones no sufren recombinación V(D)J, al carecer de la proteína RAG-2, pero sus timocitos maduran hasta células T debido a la expresión temprana en timocitos DN3a de un TCR derivado de transgenes reordenados de las cadenas TCR α y TCR β . Todas las células T periféricas de estos ratones son CD4+ [213]. Mediante PCR cuantitativa, hemos comparado los transcritos iniciados en el promotor TEA de timocitos DP purificados y células T aisladas de nódulos linfáticos de ratones 5C.C7 Rag2^{-/-} (Fig. 10, derecha). Observamos que hay una inhibición de la transcripción iniciada en el promotor TEA del locus *Tcra* endógeno en las células T periféricas de estos ratones de aproximadamente el 60%, comparada con el nivel de transcripción detectada en las células DP de los mismos animales. Estos datos sugieren que puede haber una disminución importante en el nivel de actividad E α en

células T periféricas, comparada con el nivel de transcritos de TEA observado en timocitos DP, en este modelo de ratón. Sin embargo, para concluir que hay una inhibición de la actividad de $E\alpha$ en la transición de timocitos DP a linfocitos T periféricos hay que tener en cuenta dos consideraciones importantes:

(1) El patrón de maduración de los timocitos en estos ratones está muy afectado, siendo la población DP minoritaria en el timo y una población CD4 SP preponderante por una selección positiva muy eficiente. Este patrón de poblaciones tímicas sugiere que la señalización mediada por el TCR en los timocitos de estos ratones dirige una maduración acelerada de los timocitos DN a SP. La activación de la transcripción mediada por $E\alpha$ puede ser transitoria, como así sugieren nuestros datos que indican su dependencia de factores de transcripción inducibles a través de una señalización activa por el pre-TCR o TCR, por lo cual los transcritos que estamos detectando en timocitos DP pueden ser los transcritos acumulados en esta población heterogénea, pero generados en etapas tempranas de señalización [112]. Por ello, para un análisis más preciso de la transcripción inducida por $E\alpha$ deberían analizarse poblaciones que estuvieran recibiendo esa señalización temprana y/o generando transcritos nacientes. Debido a las dificultades intrínsecas para este tipo de experimentos, como una primera aproximación decidimos comparar los niveles de transcritos dependientes de TEA, e iniciados en el segmento $J\alpha 61$, en timocitos totales (que incluyen las poblaciones más tempranas en recibir la señalización por el TCR (células DN4 y CD8 ISP)) y en linfocitos T periféricos de ratones 5C.C7 Rag2^{-/-} (Fig. 10, izquierda). Los datos obtenidos mediante PCR cuantitativa de estos transcritos mostraron un mayor nivel de inhibición (alrededor de un 80%) en células T periféricas, respecto a los transcritos observados en timocitos totales. Estos resultados muestran que hay una fuerte inhibición en la transcripción mediada a través del promotor TEA y $E\alpha$ durante la maduración de las células T.

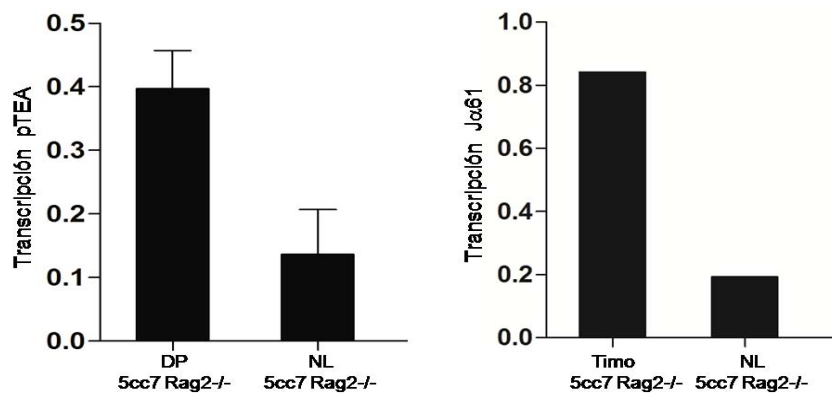


Figura 10. Transcripción de segmentos J α de timocitos de ratón 5C.C7 Rag2^{-/-}. (Derecha) Transcripción relativa iniciada en el promotor TEA en timocitos DP y linfocitos T procedentes de nódulos linfáticos del mismo ratón. (Izquierda) Transcripción relativa del segmento génico J α 61 de timocitos totales y linfocitos T de nódulos linfáticos del mismo ratón. Los valores corregidos respecto a los de β -actina en cada muestra.

(2) Otra consideración importante es que no se puede descartar que la inhibición de la transcripción, iniciada desde el promotor TEA, sea a causa de la inhibición de otra secuencia distinta a E α , como pudiera ser el propio promotor TEA. Para poder establecer inequívocamente una posible inactivación de E α durante la maduración de los linfocitos T, utilizamos otro modelo de ratón, denominado E α KI, de “E α knock-in” [214]. Este ratón tiene E α localizado ectópicamente, E α _i, dentro del cluster de segmentos génicos V β (a aproximadamente 0,5 kb 3' del segmento génico V β 12) en el locus *Tcrb* (Fig. 11a). El fragmento de E α integrado en esta construcción contiene todos los sitios necesarios para su activación [186], incluyendo la nueva región 5'T α 1 identificada en el trabajo descrito en esta tesis (Resultados B). Se utilizaron ratones E α KI con un fondo Rx β , E α KI Rx β , para conseguir una fuente homogénea de timocitos DP, con los dos alelos del locus *Tcrb* en configuración germinal, ya que la expresión del transgén *Tcrb* provoca la exclusión alélica de los dos alelos endógenos [214]. También se utilizaron ratones E α KI expresando el transgén productivo de *Tcrb*, ratones E α KI x *Tcrb* (E α KI x t β), para la obtención de células T periféricas con los dos alelos del locus *Tcrb* endógeno en configuración germinal [214] (Fig. 11b).

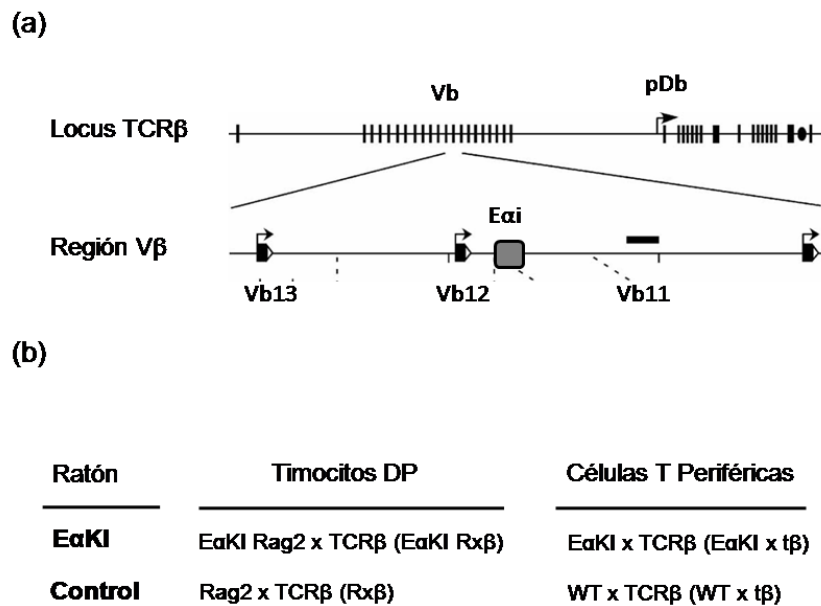


Figura 11. Modelo de ratón EαKI. (a) Estructura del locus *Tcrb* y localización ectópica de *Eα* (*Eαi*) en los ratones EαKI. (b) Esquema de las poblaciones analizadas en los modelos de ratón EαKI para analizar la transcripción germinal Vβ, dependiente de *Eα* (modificado de Jackson, 2005).

Se ha comprobado que *Eαi* influye en la estructura de la cromatina de los segmentos génicos Vβ, siendo capaz de activar la transcripción de los segmentos Vβ en la población de timocitos DP [214]. En un ratón WT, la región de segmentos génicos Vβ tiene una alta transcripción germinal en la población de timocitos DN3a, pero tras la selección-β, esta transcripción es inhibida debido al proceso de exclusión alélica que sufre el locus *Tcrb* como consecuencia de la señalización del pre-TCR [215]. Como había sido descrito previamente [214], la transcripción germinal de los segmentos Vβ se induce, mediada por *Eαi*, en timocitos DP de los ratones EαKI Rxβ, comparándola con su nula detección en timocitos DP de ratones Rxβ (Fig. 12). Estos datos indican que los transcritos Vβ detectados en timocitos DP dependen de la actividad de *Eαi*. Por tanto, este modelo de ratón es el ideal para comprobar la posible inactivación de *Eα*, de forma inequívoca, durante la maduración de los linfocitos T. Así, hemos comparado mediante RT-PCR cuantitativa, los niveles de transcripción de los segmentos génicos Vβ, dependientes de *Eαi*, en timocitos DP procedentes de ratones

$E\alpha$ KI $Rx\beta$ y linfocitos T periféricos procedentes de ratones $E\alpha$ KI x $t\beta$. Nuestros datos indican que los niveles de transcripción germinal de los segmentos $V\beta$ 11, $V\beta$ 12 y $V\beta$ 13 disminuyen bruscamente en la transición de timocitos DP a células T periféricas. El nivel de transcripción de los segmentos génicos $V\beta$ en células T periféricas de los ratones $E\alpha$ KI es comparable al observado en ratones WT x $t\beta$, los cuales carecen de $E\alpha$ i (Fig. 12). Estos datos demuestran inequívocamente y de forma definitiva que $E\alpha$ está inactivo en linfocitos T periféricos.

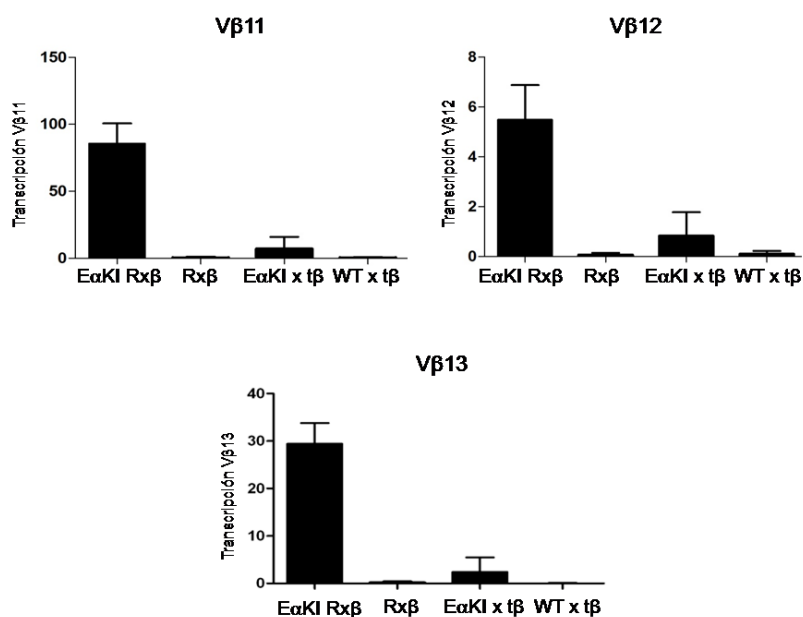
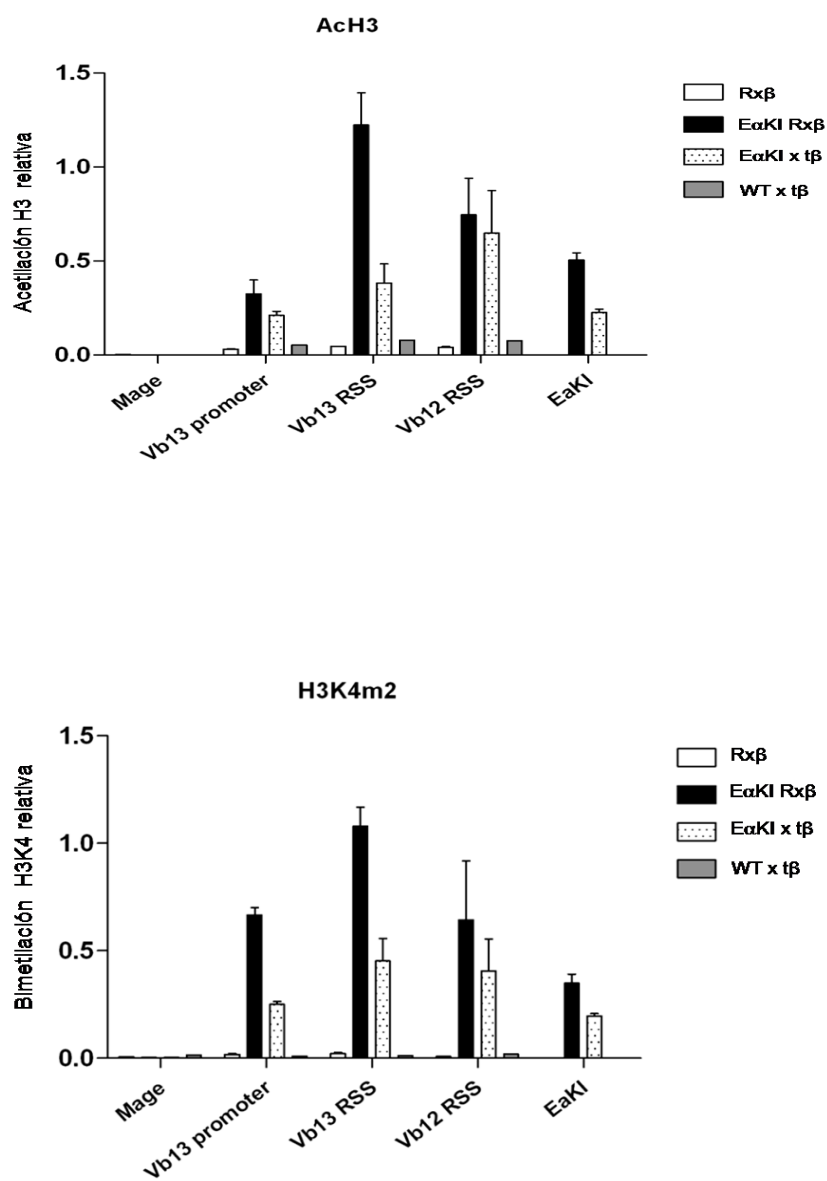


Figura 12. Transcripción germinal de timocitos DP vs células T periféricas de ratón $E\alpha$ KI. Análisis de los transcritos $V\beta$ 11, $V\beta$ 12 y $V\beta$ 13 por Q-PCR de cDNA preparado de timocitos totales y células T de nódulos linfáticos de ratones (ver en la figura fenotipo) de 7 semanas de edad. Valores corregidos respecto a β -actina de dos experimentos aislados.

Es conocido que $E\alpha$ ejerce su función mediante el establecimiento de cambios en la estructura de la cromatina en su área de influencia, tanto en el contexto de construcciones reporteras [43], como en el contexto del locus de *Tcra* [60, 169] y del locus de *Tcrb* [214]. Los cambios en la estructura de la cromatina de los segmentos $V\beta$ que ejerce $E\alpha$ i en timocitos DP incluyen H3Kac y H3K4me [214]. Estas marcas epigenéticas en las histonas están asociadas con cromatina permisiva para el

reordenamiento y la activación de la transcripción germinal de los loci de los receptores de los linfocitos, siendo la modificación H3K4me3 la más relevante [216]. Hemos analizado la estructura de cromatina de los segmentos V β en timocitos de ratones E α KI Rx β y linfocitos T de ratones E α KI x t β , mediante ChIPs con anticuerpos específicos para H3K4ac, H3K4me2 y H3K4me3 (Fig. 13).



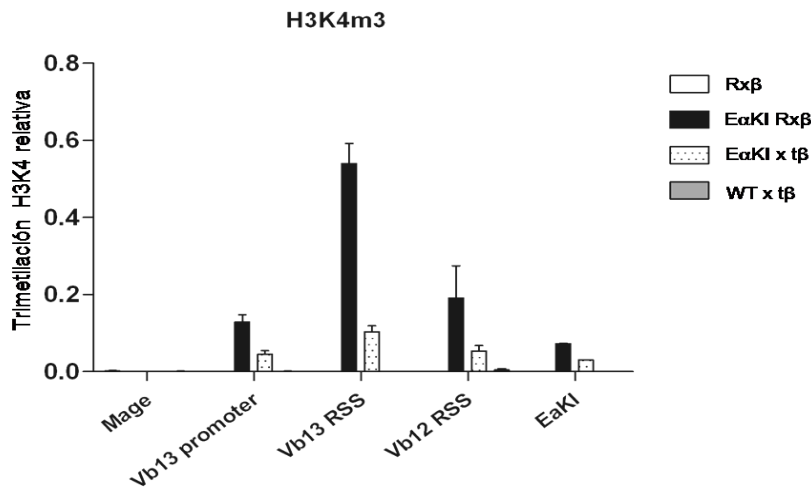


Figura 13. Modificación de histonas de timocitos EαKI Rxβ vs células T periféricas EαKI x tβ. Inmunoprecipitación de cromatina de mononucleosomas preparados de timocitos DP de ratones Rxβ y EαKI Rxβ, así como de células T periféricas de nódulos linfáticos de ratones WT x tβ y EαKI x tβ. Se analizaron secuencias RSS y promotores de los dos segmentos Vβ y de Eαi. El promotor del gen-2 del antígeno de melanoma (*Mage*) fue usado como control negativo. Los valores de PCR cuantitativa representados son relativos a los datos unión/input de los ChIPs con anticuerpos específicos para modificaciones de histonas y corregidos con los valores del promotor de β-actina. Los oligonucleótidos usados para el análisis de Eαi descartan la amplificación de Eα endógeno. Los datos presentados corresponden a los obtenidos en dos experimentos independientes realizados con ratones distintos.

El análisis por PCR cuantitativa de los inmunoprecipitados de cromatina muestran una disminución de las modificaciones de las histonas analizadas en el área de los segmentos Vβ en células T periféricas, comparándolas con las modificaciones de cromatina observadas en timocitos DP (Fig. 13). Eαi, en sí mismo, también experimenta una disminución de las marcas H3K4ac, H3K4me2 y H3K4me3 en células T periféricas de ratones EαKI x tβ, comparadas con timocitos DP de ratones EαKI x Rxβ (Fig. 13). Estos resultados se correlacionan perfectamente con el análisis de transcripción germinal de los segmentos Vβ en las mismas células (Fig. 5). Más aún, nuestros datos muestran que Eαi influye en la accesibilidad de las regiones Vβ que se encuentran a una distancia de al menos 7 kb hacia 5' del locus *Tcrb*, como ocurre en el caso del segmento Vβ13 (Fig. 13).

En el caso del locus endógeno *Tcra*, hemos analizado también la estructura de la cromatina mediante la cuantificación de las marcas epigenéticas H3Kac y H3K4me3 por ChIPs (Fig. 14). Nuestros datos indican que, también en este contexto, hay una disminución de estas marcas cuando se compara la acH3 y la H3K4me3 de la región de TEA en linfocitos T procedentes de ratones 5C.C7 x *Rag2*^{-/-} con timocitos totales de ratones *Rxβ* (Fig. 14). Por tanto, los datos obtenidos en el modelo *Eα*KI se corresponden perfectamente con los datos obtenidos en el locus *Tcra* endógeno.

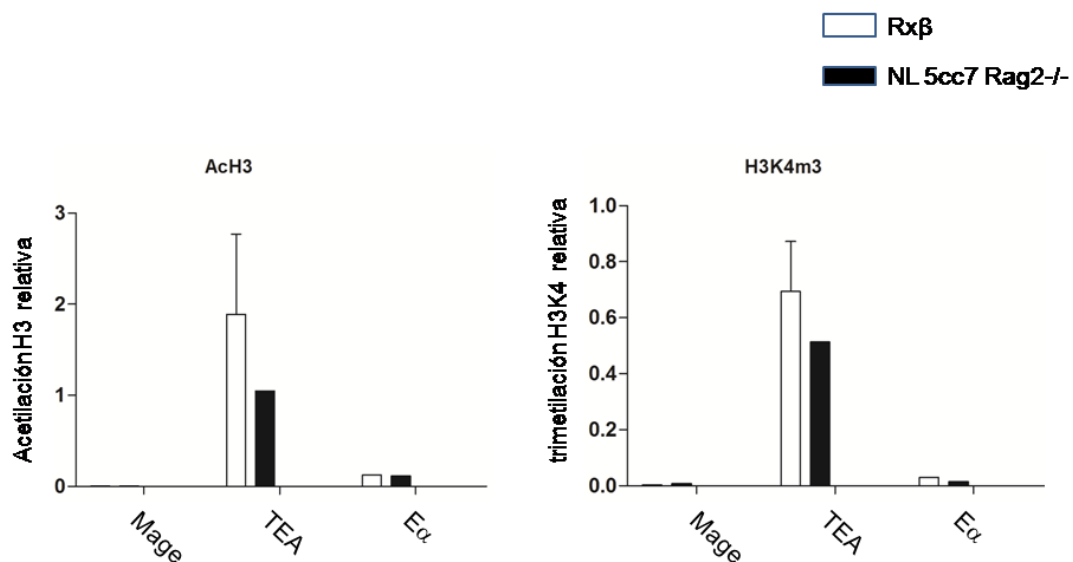


Figura 14. Modificación de histonas de timocitos totales *Rxβ* vs células T periféricas de ratones 5C.C7 x *Rag2*^{-/-}. Las gráficas muestran las cuantificaciones de ChIPs de mononucleosomas de timocitos *Rxβ* y células T periféricas de ratones 5C.C7 x *Rag2*^{-/-}. Se analizaron las secuencias del promotor TEA y de *Eα* endógeno. El promotor de *Mage* fue usado como control negativo. Se representan los valores de PCR cuantitativa relativos a unión/input de las modificaciones de histonas y corregidas con los valores obtenidos del análisis del análisis del promotor de *β*-actina en cada muestra. Los datos representan los resultados de dos experimentos independientes con ratones distintos.

Estos datos muestran que existe una inhibición de la transcripción germinal, que se correlaciona con una disminución de las modificaciones de histonas dependientes de la actividad de *Eα*, en células T periféricas en reposo, demostrando que *Eα* se inactiva durante la maduración de los linfocitos T.

Material y Metodología correspondientes al Anexo II

Modelos de ratón

Los ratones $Rx\beta$ [217], $Rx\beta \times E\alpha^{-/-}$ [159], $HY\alpha \times Rx\beta \times E\alpha^{-/-}$, $HY\alpha \times Rx\beta$ [166], $E\alpha KI \times Rx\beta$ [214], $E\alpha KI \times t\beta$ [214] y $WT \times t\beta$ [214] fueron descritos previamente.

Análisis de la transcripción de segmentos $J\alpha$ y $V\beta$

Los timocitos y células T periféricas fueron obtenidos de ratones de 6-7 semanas de edad. Las células T periféricas fueron purificadas con columnas de lana de nylon (Polysciences, Inc.). En resumen, una jeringa de 10 cc conteniendo 0,5 g de lana de nylon se lava con medio de cultivo completo y se incuba en ese medio durante 1 h a 37°C. Después de drenar el medio y cerrar la jeringa, se añaden las células procedentes de los ganglios linfáticos inguinales de un ratón suspendidas en 2 ml de medio completo, más 4-5 ml de medio después que la suspensión celular ha entrado en la lana de nylon, y se incuban durante 1 h a 37°C. Se recogen las células no adherentes (células T) en dos lavados de la columna con medio completo. El aislamiento de células DP se realizó por separación mediante citometría de flujo (*cell sorting*) con anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8, acoplados a ficoeritrina (PE) o isotiocianato de fluoresceína (FITC), respectivamente (Sigma). El ARN fue purificado con reactivo de Trizol® (Invitrogen), tal como indica el fabricante. Para los experimentos de RT-PCR, 3-4 µg de ARN fueron digeridos con 2 unidades de Dnasa I (Biolabs) en un volumen de 10 µl durante 30min, y posteriormente se inactiva la Dnasa I 10 min a 75°C. A continuación, el ARN fue incubado a 37°C durante 1 hora con los componentes del kit “SuperScript® III Reverse Transcriptase” (Invitrogene) para la obtención del ADN codificante (cADN). El cADN obtenido fue cuantificado por PCR usando la mezcla 2x para PCR rápida “Kapa SYBR Green Fast” (Kapa Biosystems) en una máquina de PCR LightCycler 2.0 (Roche), usando una curva estándar de ADN genómico. Todas la amplificaciones de PCR se hicieron usando el protocolo de “PCR touchdown” con temperaturas de alineamiento de 68°C a 56°C en 10 ciclos, y posterior alineamiento a 56°C en 40 ciclos. Todas las señales de amplificación se corrigieron respecto a las señales de β -actina de cada muestra. La lista de secuencias de oligonucleótidos se muestra en la Tabla I.

ChIP de modificaciones de histonas

Los timocitos primarios y las células T periféricas fueron lavados sucesivamente con “Buffer de Lavado I” (1x PBS sin Mg^{2+}/Ca^{2+} , 10mM butirato de sodio, 5mM Na_3EDTA , pH:7, añadiendo en fresco: 0,15 mM de espermina, 0,5 mM de espermidina, 0,1 M de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 0,1 mM de benzamida) y “Buffer de Lavado II” (igual que el Buffer de lavado I, pero sin butirato de sodio). 10×10^6 células fueron lisadas con “Buffer de Lisis” (80mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH:7,5, 10 mM butirato sódico, 6 mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$, 250mM sacarosa y 0,04 % NP-40) para extraer los núcleos. Los núcleos fueron resuspendidos en 200 μ l “Buffer de Digestión” (10 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH:7,5, 10 mM butirato sódico, 3 mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$ y 250 mM sacarosa) e incubados durante 5 min a 37°C con 5 unidades de nucleasa de micrococo (MNasa)(Worthington). La reacción fue parada con 300 μ l “Buffer $T_{10}E_5$ ” (10 mM Tris pH:6,5, 5 mM EDTA y 10 mM butirato sódico). A continuación, se realiza un chequeo rutinario para comprobar la eficiencia de la digestión de cromatina por MNasa y ver el patrón de mononucleosomas y dinucleosomas. En los siguientes pasos, los ChIPs se realizan igual a como se describe en el apartado de Resultados B, pero usando 5 μ g de anticuerpos policlonales de conejo específicos anti-acH3, anti-H3K4me2 y anti-H3K4me3 (Upstate Biotechnology) y un anticuerpo control de conejo anti-IgG₁ (Sigma). El análisis de los inmunoprecipitados se realizó por PCR cuantitativa al igual que se explica en el apartado anterior.

Transcripción V β

V β 11 F 5' -AAGGAACGATTCTCAGCTC-3'
 V β 11 R 5' -CTCTGTGTCTAAGCTGCTT-3'

V β 12 F 5' -TCAGCTGTGTATCTGTGTG-3'
 V β 12 R 5' -AAAGTTCAGAACTGGTGGG-3'

V β 13 F 5' -ACAGCCACCTATCTCTGT-3'
 V β 13 R 5' -GGAGTATAAGAAATAGTCCC-3'

Transcripción J α

TEA F 5' -TCCAAGATTCTGGGACAAC-3'
 TEA R 5' -AAGCAGGAGCCTTTCATTA-3'

J α 61 F 5' -TTGCTGGAGGGAGATGGAAGT-3'
 J α 61 R 5' -TTGCCGTCTCTGGGACATTG-3'

TEA.2 F 5' -CCTGGGGACAAGCTGGCTTAATG-3'
 J α 49 F 5' -ATCTTGGCAGGTGAAGCTTGTG-3'
 C α R 5' -GGACAAGTTTGACTGTCATTCC3'

Inmunoprecipitación de cromatina

E α KI F 5' -ACCACACATATGTGTAGAGTC-3'
 E α KI R 5' -ATCTGACCAGCTTACCCATTTC-3'

V β 13 P F 5' -CTTACCATTCCCTATGGAAGTTCAG-3'
 V β 13 P R 5' -CATATGCACAGACTGCATGTGAG-3'

V β 13 RSS F 5' -ACAGCCACCTATCTCTGT-3'
 V β 13 RSS R 5' -GGAGTATAAGAAATAGTCCC-3'

V β 12 RSS F 5' -TCAGCTGTGTATCTGTGTG-3'
 V β 12 RSS R 5' -AAAGTTCAGAACTGGTGGG-3'

E α F 5' -CTGACATGGGCAACAGGTC-3'
 E α R 5' -GTGGCCCGGAGAGATCTTAT-3'

TEA F 5' -TCCAAGATTCTGGGACAAC-3'
 TEA R 5' -AAGCAGGAGCCTTTCATTA-3'

Mage2 F 5' -AACGTTTTGTGAACGTCCTGAG-3'
 Mage2 R 5' -GACGCTCCAGAACAAAATGGC-3'

ActinP F 5' -CGCCATGGATGACGATATCG-3'
 ActinP R 5' -CGAAGCCGGCTTTGCACATG-3'

Tabla I: Secuencias de oligonucleótidos utilizados

CONCLUSIONES

D.1 Las señalizaciones mediadas por los complejos pre-TCR o TCR $\alpha\beta$ son indistinguibles en su capacidad de activar E α en timocitos DN4/DP.

D.2 La transcripción germinal de los segmentos J α dependiente de E α en el locus *Tcra* endógeno se encuentra inhibida en células T periféricas, comparada con la misma en timocitos DP.

D.3 La transcripción germinal de los segmentos V β dependiente de E α i (E α en una localización ectópica) se encuentra inhibida en células T periféricas, comparada con la misma en timocitos DP. Por tanto, E α se encuentra inactivo en linfocitos T periféricos.

D.4 Las modificaciones epigenéticas dependientes de E α y E α i, que dan lugar a la apertura de la cromatina de las regiones J α y V β , respectivamente, están disminuidas en células T periféricas comparadas con timocitos DP.

D.5 En función de todos los puntos anteriores, podemos concluir que: (1) Tanto la señalización mediada por el pre-TCR, como la mediada por el TCR $\alpha\beta$, son capaces de activar eficientemente E α durante la transición de timocitos DN3a a DP. (2) La actividad de E α es transitoria durante la maduración de los linfocitos T, pasando de un estado inactivo en timocitos DN2/DN3a, a un estado activo en timocitos DN4/DP y, finalmente, a un estado inactivo en linfocitos T periféricos.

VI. Discusión

Discusión

$E\alpha$ es esencial para la activación de la transcripción germinal y recombinación $V\alpha J\alpha$ durante el desarrollo de los linfocitos T, y por tanto para la generación de los linfocitos $T\alpha\beta$. $E\alpha$ se ha considerado como paradigma de enhanceosomas, definidos como complejos multiprotéicos muy compactos ensamblados en una secuencia reguladora. Estas secuencias están compuestas por sitios de unión muy conservados para factores de transcripción, lo cual indica que existe una gran restricción a nivel de los factores de transcripción que han de ensamblarse para coordinar su actuación. Los sitios de unión para factores de transcripción presentes en los enhancers están organizados de una forma muy precisa, permitiendo el ensamblaje de complejos multiprotéicos con un alto nivel de complejidad tridimensional, como ocurre en los casos del enhancer del $INF-\alpha$ y el promotor del $TNF-\alpha$ [120, 218-219]. Los factores de transcripción que forman parte de un enhanceosoma tienen un alto grado de cooperatividad en su ensamblaje y un sinergismo funcional muy fuerte entre sí, de tal forma que la alteración de uno solo de los sitios de unión para factores de transcripción tiene efectos drásticos en la función del enhancer. Este es también el caso de los enhanceosomas $E\alpha$ y $E\delta$, los cuales albergan una gran variedad de sitios de unión para factores de transcripción, que permiten el ensamblaje de complejos multiproteicos donde se establecen interacciones débiles, pero esenciales, entre todos sus componentes. La mutación de sitios específicos dentro de estos enhanceosomas destruye su función [173, 177, 180-181, 188, 198]. De esta forma, la actividad de estos enhanceosomas es más que la suma de cada componente individual, siendo el resultado de un entramado de interacciones estereoespecíficas entre todas las proteínas unidas que asegura que un determinado gen sólo va a ser activado si todos los componentes del complejo están simultáneamente presentes en el mismo núcleo celular [179, 198]. Este alto nivel de organización estructural asegura un alto nivel de cooperatividad funcional entre todos los componentes de un enhanceosoma.

En general, se acepta que proteínas estructurales organizan la formación de los enhanceosomas, facilitando la unión de factores de transcripción unidos distalmente a ambos lados. Así se propuso que las proteínas LEF-1 y TCF-1 son las primeras en unirse a la cromatina de $T\alpha 1-T\alpha 2$ y las proteínas Runx las primeras en unirse a la cromatina de $\delta E3$, facilitando el acceso de las demás proteínas de unión a

ambos enhancers [179, 188]. Así, en el caso concreto del enhanceosoma $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$, se propuso una jerarquía en el ensamblaje del enhanceosoma, en la cual las proteínas TCF-1 o LEF-1 acceden a la cromatina del enhancer y, mediante su dominio HMG, promueven la curvatura del ADN para facilitar el acceso e interacción mutua de las proteínas que se unen a ambos lados del sitio TCF/LEF: factores CREB/ATF al lado 5' en $T\alpha 1$ y factores Runx-1 y Ets-1, unidos cooperativamente entre sí, al lado 3' en $T\alpha 2$ [188, 220-221]. La formación de este complejo multiproteico se supone que se estabiliza mediante el reclutamiento adicional de proteínas coactivadoras, como es el cofactor ALY que es capaz de interactuar directamente con LEF-1 y Runx-1 [202]. Aunque la hipótesis de un ensamblaje jerarquizado en el enhanceosoma $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ fue ampliamente aceptada como modelo de ensamblaje de enhanceosomas, esta visión fue descartada experimentalmente hace años mediante el análisis por *footprinting* genómico de construcciones conteniendo distintas versiones de $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ en timocitos de ratón [198]. En estos experimentos se comparó la ocupación de $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ y versiones mutadas del mismo en los sitios TCF/LEF o ets. La observación que en presencia de cualquiera de las dos mutaciones se inhibiera totalmente la ocupación del enhancer proporcionó el mecanismo molecular para explicar el efecto funcional de la inactivación del enhancer por ambas mutaciones [181]. Estos resultados eran importantes ya que establecían que la unión de TCF-1 o LEF-1 no tenía un papel especial de apertura de la cromatina del enhancer, como había sido propuesto [188], sino que todas las proteínas de unión a $T\alpha 2$, incluyendo TCF-1/LEF-1, Ets-1 y, probablemente, Runx-1, que se une cooperativamente con Ets-1, han de estar presentes simultáneamente en el núcleo para permitir el ensamblaje de un enhanceosoma $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ funcional. Estos experimentos, junto con la no evidencia de cambios de ocupación entre un enhanceosoma inactivo, en timocitos DN3a, y un enhanceosoma activo, en timocitos DP, por ensayos de *footprinting* genómico con DMS [101, 196] (Resultados A), han establecido la noción que se necesita una identidad protéica específica para el ensamblaje apropiado de un complejo funcional con una estructura muy rígida en $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$.

Nuestros experimentos combinados de *footprinting* genómico y ChIP han identificado un número importante de las proteínas que forman parte de un enhanceosoma $E\alpha$ endógeno en vivo en timocitos de ratón (Resultados A), corroborando la extensa ocupación proteica de la región 5' $T\alpha 1$ - $T\alpha 4$ descrita anteriormente [101, 196]. Hemos confirmado la presencia en vivo de los factores ATF-

2, CREB, GATA-3 y Ets-1 en el enhanceosoma $E\alpha$ en timocitos totales de ratón [192, 222-223] y hemos demostrado la presencia de los factores Fli-1, Sp1, HEB y E2A en el mismo. Más aún, hemos identificado una caja-E de unión específica para los factores HEB. Así pues, el conocimiento actual de ocupación de $E\alpha$ por factores de transcripción, basado en los experimentos previos realizados en vivo e *in vitro* [164, 186, 188-189, 192, 198, 201, 222-224] y en nuestros resultados propios resultados (Resultados A), permite establecer que: (1) CREB se une al sitio CRE de $T\alpha 1$; (2) ATF-2 se une al sitio GATA/AP-1 de $5'T\alpha 1$, formando un complejo AP-1 con c-Jun; (3) Ets-1 se une cooperativamente con Runx-1 a $T\alpha 2$; (4) Los factores Runx pueden unirse también a $T\alpha 4$; (5) Ets-1 y Fli-1 se unen indistintamente los sitios ets de $5'T\alpha 1$; (6) GATA-3 se une a $T\alpha 3$; (7) Sp1 puede unirse a $5'T\alpha 1$ y una región intermedia entre $T\alpha 3$ y $T\alpha 4$; y (7) E2A se une a la caja-E I de $5'T\alpha 1$ y a la caja-E II de $T\alpha 3$, mientras que HEB se une a la caja-E III de $T\alpha 4$. Así pues, el enhanceosoma $E\alpha$ está formado por un complejo entramado de múltiples proteínas que colaboran entre sí para dar lugar a un complejo multiproteico funcional. En adición a estos factores de transcripción con acceso directo al ADN, y de acuerdo con la capacidad de $E\alpha$ de inducir acetilación de H3 y H4 en su área de influencia [60, 169], nuestros datos demuestran el reclutamiento en vivo de las HATs, CBP y p300 en timocitos totales de ratón (Resultados A). De forma concordante, observamos ausencia del reclutamiento a $E\alpha$ en vivo de HDAC1 y de su correpresor mSin3 en timocitos totales de ratón. Como los timocitos totales equivalen a aproximadamente un 80-85% de timocitos DP, no podemos descartar que estos co-represores sean reclutados por $E\alpha$ en poblaciones minoritarias en las cuales el enhancer está inactivo, como son los timocitos DN1/DN3a. Se necesita realizar estos análisis con poblaciones purificadas para una mejor definición de la composición del enhanceosoma $E\alpha$ a lo largo del desarrollo de los timocitos, como puede ser el análisis en timocitos DN3a, procedentes de ratones *Rag2*^{-/-}, y timocitos DP, procedentes de ratones *Rxβ* (Resultados B).

La ocupación diferencial de la caja-E III observada en ratones *Heb*^{-/-} es especialmente interesante. Los heterodímeros de E2A/HEB son la forma predominante de dímeros de proteínas E presentes en timocitos, por lo cual se ha pensado que pudieran tener un papel redundante y similar durante el desarrollo de los timocitos [151]. Sin embargo, la inactivación de los genes E2A o HEB en linfocitos T tiene efectos distintos durante el desarrollo: Las proteínas E2A son importante en

estadios tempranos del desarrollo y en la regulación de la accesibilidad del locus *Tcrb* [153, 225], mientras que la proteína HEB tiene un papel importante en la transición entre timocitos DN3a a DP, ya que los ratones *Heb*^{-/-} tienen una acumulación de timocitos ISP CD8⁺ [155]. Es interesante destacar que nuestros experimentos han revelado la presencia de una caja-E (caja-E III de T α 4) como un posible sitio específico de unión para HEB en vivo y no las cajas-E I y II. Así pues, la caja-E III estaría ocupada por homodímeros de HEB o heterodímeros de proteínas HEB con otras proteínas E, mientras que las cajas-E I y II estarían ocupadas por dímeros de proteínas E distintas a HEB, presumiblemente por homodímeros de proteínas E2A. Estos datos indican que las distintas cajas-E puedan ser ocupadas por distintas combinaciones de proteínas E, estableciendo las bases moleculares para los papeles diferenciales que tienen estas proteínas durante el desarrollo de los timocitos.

Según todas las observaciones descritas [101, 188, 196, 198], se hubiera esperado que una destrucción de la organización de la estructura proteica de E α , como ocurre en E α MC, inactivara la actividad del enhancer, debido a su incapacidad de ensamblar un complejo multiproteico funcional. Los resultados funcionales de actividad transcripcional y recombinacional obtenidos con E α MC son sorprendentes, ya que el enhancer quimérico no sólo resultó ser activo, sino que se trata de un enhancer transcripcional más potente que ninguno de los enhancers de los cuales procede (E α y E δ). Estos datos demuestran que la identidad y las interacciones estereoespecíficas entre las proteínas que forman E α pudieran ser más flexibles de lo que se supone y cambian la visión restrictiva de la identidad de proteínas que deben unirse a E α para formar un enhanceosoma activo. Más aún, estos datos permiten especular la formación de distintos enhanceosomas E α a lo largo del desarrollo de los timocitos, especialmente durante la activación del mismo mediada por la señalización por el pre-TCR en la transición de timocitos DN3a a DP. Los cambios locales en el área 5'T α 1-T α 2 y el área de influencia del enhancer de la estructura de la cromatina, observados por ensayos de sensibilidad a la DNasal de alta resolución y medidas de acetilación de H3 y H4 por ChIPs, en la transición de timocitos DN3a a timocitos DP [60, 169, 186, 196], apoyan esta hipótesis. Nuestros análisis dirigidos a la determinación del mecanismo molecular de activación de E α durante la señalización por el pre-TCR han mostrado una intrigante concentración de sitios de unión conservados para los factores de transcripción inducibles NFAT, AP-1 y Egr en 5'T α 1-T α 2 (Resultados B). Por tanto, E α sufre cambios generales en la estructura de su

cromatina durante la transición de timocitos DN3a a DP en una región que coincide exactamente con la región donde se unen estos factores inducibles, sugiriendo que un nuevo enhanceosoma conteniendo estos factores se forma en timocitos DN4/DP. Nuestros datos demuestran que estos factores son capaces de ensamblarse en un enhanceosoma $E\alpha$ activo mediado por la señalización a través del pre-TCR, observado en dos modelos distintos: (1) Una línea celular de timocitos DN3a, procedente de ratones SCID, capaz de diferenciar a un estadio DN4 tras señalización mediada por CD3 ϵ , equivalente a la mediada por el pre-TCR (células SCID.adh) [226], y (2) timocitos de ratones $Rag2^{-/-}$ (como fuente de timocitos DN3a) y timocitos de ratones $Rag2^{-/-}$ x $Tcrb$, $Rx\beta$, (como fuente de timocitos DP). NFAT, AP-1 y Egr-1 están presentes en los enhanceosomas $E\alpha$ presentes en células SCID.adh activadas y timocitos de ratones $Rx\beta$, pero no en células SCID.adh no activadas y timocitos de ratones $Rag2^{-/-}$. Además, el reclutamiento de estos factores inducibles coincide con la presencia en el enhanceosoma de $E\alpha$ de las HATs, CBP y p300. Estos datos implican que la actividad de $E\alpha$ está regulada por el ensamblaje de distintos enhanceosomas a lo largo del desarrollo de los timocitos.

El análisis comparativo de $E\alpha$ en timocitos DN3a y timocitos DP a través de *footprinting* genómico usando DMS [164, 196](Resultados A), que permite analizar la ocupación in vivo de secuencias reguladoras mediante la visualización de los contactos de proteínas unidas a guaninas en el surco ancho del ADN (la inmensa mayoría de los factores de transcripción), reveló la ausencia de diferencias apreciables que representarían posibles cambios en la ocupación de proteínas de la región 5'T α 1-T α 4. Estos experimentos sugerían que la activación de $E\alpha$ podría deberse a intercambios entre factores de transcripción de la misma familia (que tengan los mismos contactos ADN/proteína), a modificaciones post-traduccionales de factores de transcripción previamente unidos o al reclutamiento de co-activadores que no contactan directamente con el ADN. Estos datos dieron lugar a una paradoja en el entendimiento de activación de $E\alpha$ durante el desarrollo de los linfocitos T que perdura desde hace más de 10 años. Es interesante destacar que sitios detectados para factores de transcripción inducibles son coincidentes en gran manera con los sitios esenciales previamente descritos en $E\alpha$ para factores de transcripción constitutivos de timocitos. En concreto, hay un solapamiento exacto entre el sitio de unión para CREB y AP-1 en el sitio CRE de T α 1, y existe una coincidencia exacta entre los sitios de

unión de proteínas Ets y NFAT presentes en 5'T α 1. Este intercambio entre factores de transcripción con una misma identidad entre los sitios de unión proporciona una explicación convincente para la paradoja de no detección de diferencias en los *footprints* de E α entre timocitos DN3a y DP [164, 196], como se detalla a continuación:

(1) Los experimentos previos por EMSAs para analizar la unión de P-CREB a T α 1 en timocitos DN3a y DP dieron lugar a un intrigante resultado [186, 196]. En contra de lo esperado, la unión de P-CREB se detectaba preferentemente en timocitos DN3a frente a timocitos DP, cuando es P-CREB, y no CREB, la forma activa de este factor de transcripción que funciona mediante el reclutamiento de CBP/p300 [227]. Sin embargo, nuestros datos proporcionan una nueva interpretación para estos resultados: P-CREB unido a T α 1 en timocitos DN3a pudiera ser desplazado por AP-1 en timocitos DN4/DP. De hecho, la unión de P-CREB a T α 1 observada en EMSAs con extractos nucleares de células SCID.adh no estimuladas es mucho más baja que la unión de AP-1 observada en EMSAs con extractos de células SCID.adh estimuladas (Resultados B. Fig. 3G). Similares competiciones entre CREB y AP-1 se han descrito en otros sitios CRE/AP-1[131]. Por tanto, nosotros proponemos que AP-1 pudiera ocupar E α en timocitos DP con los mismos contactos que CREB/P-CREB en timocitos DN3a.

Un aspecto intrigante de nuestros experimentos de ChiP es la detección de la unión de AP-1 en vivo a E α en células SCID.adh estimuladas, pero no en timocitos DP de ratones Rx β (Resultados B). Esta aparente discrepancia podría explicarse por el hecho que la mayoría de los componentes de las familias de Fos y Jun disminuyen su expresión dramáticamente en la transición de timocitos DN3a a DP [136-137], no siendo los timocitos DP capaces de inducir la activación de AP-1 tras su estimulación [108](Datos no mostrados). Los timocitos tienen un complejo patrón de expresión de proteínas Fos/Jun durante su desarrollo [136-137], lo cual dificulta su detección, requiriéndose quizá el uso de anticuerpos con distintas especificidades en estos experimentos. Por otra parte, las células SCID.adh permiten la inducción de una señalización sincronizada que permite la detección de una activación transitoria de AP-1, mientras que los timocitos DP representan poblaciones en distintas fases de señalización por las distintas activaciones continuadas recibidas en vivo. El hecho de que la señalización a través del pre-TCR sea transitoria con dos fases diferenciables en la expresión de factores de transcripción presentes en el núcleo de los timocitos

[112], permite especular que los distintos estados de señalización celular, sincronizada en células SCID.adh y no sincronizada en timocitos de ratones $Rx\beta$, estén implicados en la dificultad para la detección de los complejos AP-1 presentes en un enhanceosoma $E\alpha$ activo en timocitos DP de ratón. De todas formas, la eficiente unión de los complejos AP-1, detectada *in vitro* en $E\alpha$ usando extractos nucleares de células SCID.adh estimuladas, capaz de competir con la unión de CREB a $T\alpha 1$, apoya fuertemente la noción que AP-1 sea parte del enhanceosoma $E\alpha$ ensamblado *in vivo* durante su activación a través de la señalización por el pre-TCR.

(2) Los sitios 2 y 3 para NFAT en $5'T\alpha 1$ coinciden con sitios descritos previamente para Ets-1 y Fli-1, indistintamente, *in vitro* e *in vivo* [192, 196], ya que ambos reconocen secuencias 5'-GGA-3' (Resultados C). Estos factores se unen aisladamente a estos sitios, en ausencia de unión cooperativa con otros factores adyacentes, a diferencia de lo que ocurre en la unión de Ets-1 a $T\alpha 2$, que está favorecida por la unión adyacente de Runx-1 [188, 192, 201]. El sitio 10 en $T\alpha 2$ para NFAT pudiera constituir un sitio ets adicional, no descrito anteriormente. De hecho, estos tres sitios NFAT están ocupados idénticamente en timocitos DN3a y DP en experimentos de *footprinting* genómico usando DMS [101, 196] (Resultados A). Es interesante destacar que los factores Ets y NFAT establecen exactamente los mismos contactos con el ADN *in vivo* en ensayos de *footprinting* genómico con DMS [206]. Estos datos indican que NFAT podría ocupar $E\alpha$ en timocitos DP, estableciendo los mismos contactos que los factores Ets en timocitos DN3a. Esto sugiere que el intercambio de Ets-1/Fli-1 por NFAT por competición de unión al ADN en $5'T\alpha 1$ (y quizá también el sitio 10 para NFAT) durante la activación de $E\alpha$ sea una posibilidad real. Es más, nuestros experimentos *in vitro* muestran una inhibición de la unión de los factores Ets que coincide con una activación de la unión de los factores NFAT a $5'T\alpha 1$ durante la estimulación de las células SCID.adh (Resultados C). Estas evidencias abren nuevas posibilidades en el entendimiento del mecanismo de regulación de la activación de $E\alpha$, pudiendo las proteínas Ets-1/Fli-1 ejercer un efecto represor en $E\alpha$ en una población de timocitos DN3a, formando parte de un enhanceosoma $E\alpha$ inactivo, mientras que la unión de NFAT (junto con otros factores inducibles) ejerzan un efecto activador, formando parte de un enhanceosoma $E\alpha$ activo.

De hecho, debido a la coincidencia exacta entre estos sitios de unión de los factores de transcripción constitutivos e inducibles, nosotros proponemos que el

ensamblaje de un enhanceosoma $E\alpha$ activo venga determinado por un intercambio entre estos factores mediado por una competición en su unión al ADN (figura 1). Basándonos en la localización de los sitios de unión para NFAT y AP-1 y en el requerimiento para un sitio ets intacto en $T\alpha 2$ para el ensamblaje de un enhanceosoma $E\alpha$ en vivo [198], nuestros datos apoyarían un modelo en el cual estos factores inducibles ocupan sus sitios en DN4/DP sin afectar la estructura general del complejo formado por LEF-1/TCF-1-Runx-1-Ets-1 en $T\alpha 2$ en timocitos DN3a. De hecho, el complejo formado por estas proteínas parece ser muy estable *in vitro* [188] y en vivo [192, 198], ya que sus sitios de unión facilitan su unión cooperativa al ADN de $E\alpha$.

Los factores, Ets-1, Runx-1 y TCF-1/LEF-1, que se unen al elemento $T\alpha 2$ son esenciales para una correcta transición de timocitos DN3a a DP, y por tanto, para una correcta selección- β [193, 228-230]. Sin embargo, varias evidencias nos hacen no descartar definitivamente que la formación del nuevo enhanceosoma $E\alpha$ no vaya acompañada de un desensamblaje transitorio del complejo formado en $T\alpha 2$, durante la transición de timocitos DN3a a DP. (1) La unión de Ets-1 se inhibe durante la señalización por el TCR [231]; (2) La expresión de Runx-1 disminuye drásticamente por la señalización a través del pre-TCR [93]; (3) Los estudios de cooperatividad de unión entre estos factores han sido realizados *in vitro* o en líneas celulares, las cuales tienen una expresión muy alta de estos factores, como por ejemplo células Jurkat, o fueron transfectadas con vectores de expresión de estos factores de transcripción [188, 192, 201]. (4) Los resultados obtenidos con el enhancer quimérico $E\alpha MC$ implican que la alteración de los factores de unión a $T\alpha 2$ pueden dar lugar a un enhancer funcional, sugiriendo la posibilidad del ensamblaje de enhanceosomas $E\alpha$ funcionales con alterada composición de proteínas unidas a este elemento. De hecho, para la creación de $E\alpha MC$, hemos sustituido los sitios de unión runx/ets de $T\alpha 2$ por los sitios myb/runx de $\delta E3$, en el contexto de un fragmento del enhancer que incluye aproximadamente 450 bp de ADN 5' de $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ y 600 bp de ADN 3' $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$, conteniendo $T\alpha 3$ - $T\alpha 4$. Este mutante fue inicialmente diseñado con la idea de sustituir el sitio esencial ets de $T\alpha 2$, que colabora funcionalmente por unión cooperativa con Runx-1, por el sitio esencial myb de $\delta E3$, que colabora funcionalmente con Runx-1. Sin embargo, el reemplazamiento directo de estos dos sitios de unión hubiera orientado al sitio myb de forma distinta respecto al sitio runx a como se encuentra en $\delta E3$.

Previamente se había demostrado que el mantenimiento de un alineamiento y una distancia exactos son condiciones imprescindibles para el sinergismo funcional entre c-Myb y Runx-1 en la activación de $\delta E3$ [174], por tanto se mantuvo intacta deliberadamente la organización entre estos sitios en el diseño del nuevo mutante quimérico. $E\alpha MC$ retiene dos sitios runx en $T\alpha 2$, como $E\alpha$, pero están organizados de distinta forma. En $E\alpha$, los dos sitios runx están adyacentes, con una orientación respecto al sitio ets: runx/runx/ets, mientras que en $E\alpha MC$, los dos sitios runx están separados por el sitio myb con una orientación: runx/myb/runx. Teniendo en cuenta todo lo expuesto, junto con los hechos que la identidad de estos sitios se requiera para el ensamblaje de un enhanceosoma $E\alpha$ funcional [198], que hay una alta capacidad de unión de estos factores en timocitos DN3a y que se unen alta al ADN con alta cooperatividad, apoyamos la hipótesis que su unión a $T\alpha 2$ sea parte esencial de la plataforma requerida para el ensamblaje del enhanceosoma $E\alpha$ funcional. Sin embargo, el establecimiento de si su unión es constante, sin un desplazamiento transitorio durante las primeras etapas de la señalización por el pre-TCR, es una cuestión a investigar.

El enhancer quimérico $E\alpha MC$ ha proporcionado, además, información sobre las interacciones requeridas entre los distintos factores de transcripción de unión a $E\alpha$ para la correcta activación temporal de este enhancer durante el desarrollo de los timocitos (Resultados A). Previamente se había establecido que la recombinación V(D)J de una construcción reportera dirigida por $T\alpha 1-T\alpha 2$ es prematura, mientras que la dirigida por $T\alpha 1-T\alpha 4$ tiene una correcta regulación temporal, mediante el análisis de poblaciones purificadas de timocitos en líneas de ratones transgénicos [181, 186]. En concreto, $T\alpha 1-T\alpha 2$ activó los reordenamientos $V\delta D\delta$ a $J\delta$, dependientes de enhancer, de un minilocus *Tcrd* no reordenado, en timocitos DN3 y células $T\gamma\delta$ de ratones transgénicos, mientras que $T\alpha 1-T\alpha 4$ activó estos reordenamientos en timocitos DN4/DP y células $T\alpha\beta$. Estos datos indicaron que la colaboración funcional entre $T\alpha 1-T\alpha 2$ y $T\alpha 3-T\alpha 4$ es necesaria para una correcta activación de $E\alpha$ durante el desarrollo de los timocitos. La activación de la recombinación V(D)J dirigida por $E\alpha MC$ durante el desarrollo de los timocitos resultó no tener la regulación temporal correcta, siendo ésta prematura e indistinguible de la dirigida por $T\alpha 1-T\alpha 2$. Estos resultados indican que las proteínas unidas a $T\alpha 3-T\alpha 4$, por sí mismas, son capaces de controlar la activación prematura de $T\alpha 1-T\alpha 2$, pero no la de $T\alpha 1-T\alpha 2 MC$. Por tanto, estos resultados revelan

la necesidad de una cooperación funcional entre las proteínas unidas específicamente a los sitios runx/ets de $T\alpha 2$ y las proteínas unidas a $T\alpha 3$ - $T\alpha 4$ para la correcta activación de $E\alpha$ durante el desarrollo. Actualmente no se conoce el mecanismo molecular por el cual los factores de transcripción que se unen a $T\alpha 3$ - $T\alpha 4$ colaboran con los sitios runx/ets de $T\alpha 2$ para la correcta activación funcional del enhancer durante el desarrollo de los timocitos. Mediante experimentos de *footprinting* genómico comparativos entre $E\alpha$ y $E\alpha MC$ en timocitos de ratones transgénicos no hemos observado diferencias en la ocupación de estos enhancers en áreas distintas a la mutación en sí misma (Datos no mostrados). Por tanto, la mutación $E\alpha MC$ en $T\alpha 2$ no afecta la ocupación de $T\alpha 1$ y $T\alpha 3$ - $T\alpha 4$, indicando que el cambio de sitios runx/ets por sitios myb/runx no parece afectar la unión de otras proteínas al enhancer. El hecho que $\delta E3$ - $\delta E4$ no pueda activar la recombinación $V\delta D\delta$ a $J\delta$ en el contexto del minilocus de *Tcrd* en timocitos transgénicos [180], y por tanto menos aún lo es el elemento $\delta E3$ solo, indica que $\delta E3$ no puede actuar como un elemento dominante temprano por sí mismo en el contexto de $E\alpha MC$. Así pues, la pérdida de la regulación temporal de $E\alpha MC$ se debe a la incapacidad de $T\alpha 3$ - $T\alpha 4$ de retrasar la activación prematura de $T\alpha 1$ - $T\alpha 2 MC$, a diferencia de lo que ocurre con $T\alpha 1$ - $T\alpha 2$ [181, 186]. La desregulación de la activación de la recombinación $V(D)J$ durante el desarrollo dirigida por $E\alpha MC$ puede ser consecuencia de la pérdida del sitio ets, del cambio de localización de los sitios runx, o de ambos. Actualmente se desconocen la identidad de estas interacciones que regulan la temporalidad de $E\alpha$ en vivo, pero han de estar supuestamente relacionadas con la interacción de los factores Runx y Ets de $T\alpha 2$ con los factores de unión a $T\alpha 3$ - $T\alpha 4$, los cuales incluyen GATA-3, factores Runx, proteínas E (en concreto HEB) y proteínas de unión a cajas CACC y GC. La identificación de estas interacciones serán el objeto de futuros experimentos. La regulación de la expresión temporal de la cadena $TCR\alpha$ es una cuestión fundamental porque durante el desarrollo de los linfocitos $T\alpha\beta$ por dos razones principales: (1) La activación prematura de los reordenamientos $V\alpha J\alpha$ en el locus *Tcrad* delecionan el locus *Tcrd* del genoma, impidiendo a esas células tener la oportunidad de ensamblar una cadena $TCR\delta$, ya que la expresión del locus *Tcrd* extracromosomal está inhibida [164]; (2) La expresión temprana de una cadena $TCR\alpha$ genera complejos $TCR\alpha\gamma$, capaces de dirigir la transición de timocitos DN3a a DP e inhibiendo la normal diferenciación de los timocitos, que son conducidos a una ruta de desarrollo aberrante [232].

El hecho que la unión de Egr-1 a E α sea claramente detectada por ChIP, pero no por *footprinting* genómico con DMS, es intrigante [164, 196] (Resultados A y B). Sin embargo, es importante señalar que la detección de la unión de factores de transcripción por ChIP es más sensible que la detección por *footprinting* genómico usando DMS, ya que esta última requiere una población celular homogénea para una clara detección de los contactos ADN/proteína. Además, el hecho que la unión de Egr-1 a E α detectada por ChIP se incremente durante la estimulación de timocitos de ratones Rx β , supuestamente debido a una inducción transcripcional transitoria de Egr-1 en células estimuladas sincronizadas, sugiere que E α se ocupe transitoriamente por los factores Egr durante la transición de timocitos DN3a a DN4/DP, hecho favorecido también por la baja afinidad de los sitios para factores Egr presentes en E α . Esta ocupación transitoria de los sitios egr en E α puede ser la causa de su no detección por *footprinting* genómico con DMS. La presencia de sitios de unión eficiente para NFAT adyacentes pudiera compensar la débil unión de los factores Egr, ya que ambos factores pueden interactuar físicamente formando heterodímeros que cooperan funcionalmente en la regulación de la expresión génica [144]. Así, el sitio 2 de unión de NFAT está inmediatamente adyacente al único sitio Egr presente en la región 5'T α 1 y hay cuatro posibles sitios Egr cercanos a los sitios 7 y 10 de unión de NFAT en T α 1-T α 2. De hecho, la débil y transitoria unión de Egr-1 explicaría los datos que demuestran los cambios de hipersensibilidad detectadas en experimentos de *footprinting* usando DNasa I, pero no usando DMS [164, 196] (Resultados A). Estas regiones incluyen el sitio Sp1/GC-II de T α 1, el sitio GC entre los sitios CRE y TCF/LEF, y un sitio entre los sitios TCF/LEF y runx. Otra explicación alternativa para la fuerte detección de Egr-1 por ChIP en E α en vivo, a pesar de su baja afinidad por la unión al ADN del enhancer, es que su reclutamiento se realice a través de los promotores J α primarios del locus *Tcra*, mediante interacciones físicas entre secuencias reguladoras. Así, se ha demostrado que factores de transcripción unidos a una región reguladora pueden ser indirectamente reclutados hacia otra en el mismo locus, a través de holocomplejos promotor/enhancer mediados por lazos intracromosomales [233-235]. De esta forma, Egr-1 podría formar parte de un holocomplejo funcional entre los promotores J α primarios, TEA o J α 49p, y E α , tal como se ha demostrado en el caso del holocomplejo formado entre el promotor D β 1 y E β [64, 222]. Estos datos dejan una puerta abierta a futuras investigaciones sobre la

formación de interacciones promotor/enhancer en el locus de *Tcrad* mediadas a través de los factores transcripción ensamblados en un enhanceosoma $E\alpha$ activo.

Nuestro modelo de activación de $E\alpha$ en la transición de timocitos DN3a a DP propone que la unión de factores constitutivos a $E\alpha$ durante el desarrollo de los timocitos, antes de la activación del enhancer, genera una plataforma para el reclutamiento de factores inducibles durante la señalización por el pre-TCR (figura. 1). Estos factores de transcripción inducibles unidos a $E\alpha$ en timocitos DN4/DP son responsables de reclutar los co-activadores CBP/p300 para el ensamblaje de un enhanceosoma activo, capaz de activar a los promotores TEA y $J\alpha 49p$, mediante interacciones físicas intracromosomales $E\alpha$ /promotor, lo cual dispara la transcripción germinal del locus *Tcra* y los reordenamientos primarios $V\alpha J\alpha$. La activación de los factores inducibles NFAT, AP-1 y Egr se produce de manera transitoria durante una primera fase de la señalización a través del pre-TCR [112], lo cual sugiere que éstos puedan dejar de formar parte del enhanceosoma $E\alpha$ cuando su disponibilidad disminuye en el núcleo en una segunda fase de señalización. Este escenario plantea la posibilidad que la activación de $E\alpha$ sea transitoria durante el desarrollo de los linfocitos T, siendo únicamente necesaria en las etapas tempranas de la señalización mediada por el pre-TCR para activar la transcripción germinal y los reordenamientos primarios del locus *Tcra* durante la transición de timocitos DN3a a DP, siendo su función innecesaria en etapas posteriores, timocitos DP tardíos, timocitos SP y linfocitos $T\alpha\beta$ periféricos, cuando el locus presenta una configuración reordenada, cuya transcripción quizá dependa únicamente de los promotores asociados a los segmentos $V\alpha$ reordenados productivamente. Por esa razón, hemos analizado la actividad de $E\alpha$ durante la maduración de los linfocitos T (Resultados C).

Nuestros datos indican que las señalizaciones mediadas por los complejos pre-TCR o $TCR\alpha\beta$ son indistinguibles en su capacidad de activar $E\alpha$ en timocitos DN4/DP. El $TCR\alpha\beta$ ensayado en estos experimentos se expresa prematuramente en timocitos DN3a, lo cual permite que señalice en ausencia de ligando promoviendo la diferenciación a timocitos DP [236]. Estas características pueden establecer que las señalizaciones que hemos comparado sean intrínsecamente más similares entre sí, que las que puede haber entre un pre-TCR y un $TCR\alpha\beta$ codificado por un locus *Tcra* endógeno y expresado en timocitos DP, cuya señalización es dependiente de ligando. En cualquier caso, nuestros datos indican que no hay diferencias sustanciales entre

las capacidades de un pre-TCR y un TCR $\alpha\beta$ expresado en timocitos DN3a en la activación de los transcritos germinales de locus *Tcra*.

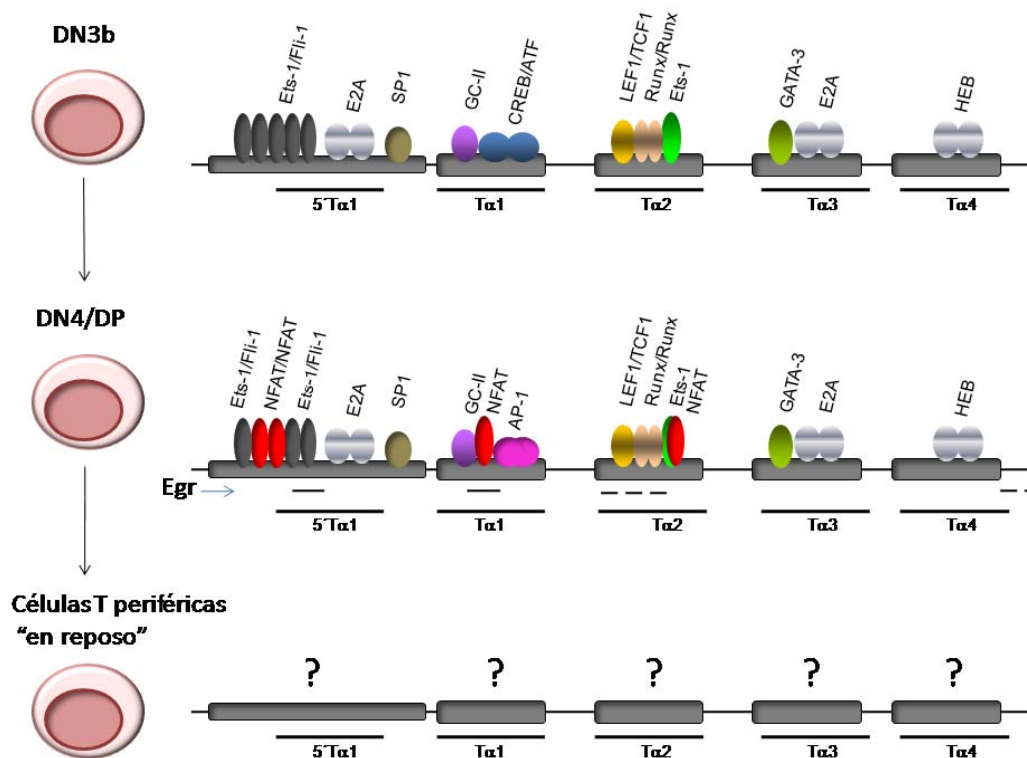


Figura 1. Modelo de ensamblaje de diferentes enhanceosomas en $E\alpha$ durante la maduración de los linfocitos $T\alpha\beta$. Descripción de los posibles factores que forman parte de los enhanceosomas ensamblados en $E\alpha$ durante el desarrollo de los timocitos. Las proteínas unidas al ADN se representan como óvalos de colores (estando NFAT representado por óvalos rojos y AP-1 por óvalos rosas). Los sitios de unión para factores Egr se representan con líneas negras. Se indica la localización de las regiones reguladoras 5'T α 1, T α 1, T α 2, T α 3 y T α 4. En timocitos DN3a, $E\alpha$ estaría ocupado por factores de transcripción constitutivos de timocitos, dando lugar a un enhanceosoma $E\alpha$ inactivo. Durante la transición de timocitos DN3a a DP las proteínas NFAT, AP-1 y Egr-1 se unirían a $E\alpha$, mediante el desplazamiento de factores constitutivos, como ciertos factores Ets y CREB, para crear un enhanceosoma $E\alpha$ funcional. En linfocitos T $\alpha\beta$ periféricos, $E\alpha$ es inactivado, por el desensamblaje del enhanceosoma $E\alpha$ funcional. El mecanismo molecular para la inactivación de $E\alpha$ durante la maduración de los timocitos T $\alpha\beta$ se desconoce por el momento y será objeto de futuras investigaciones.

Nuestro análisis de la funcionalidad de $E\alpha$ en linfocitos T periféricos en vivo ha demostrado que $E\alpha$ se encuentra inactivo en periferia, tanto en el locus *Tcra* endógeno como en una localización ectópica. Estos datos están en concordancia con el mecanismo molecular propuesto para la activación del enhanceosoma de $E\alpha$, demostrando que su actividad es transitoria, estando $E\alpha$ inactivo en timocitos DN3a, activo en timocitos DN4/DP e inactivo en linfocitos T periféricos. Actualmente desconocemos si $E\alpha$ está sólo activo en la transición de timocitos DN3a a DP durante la activación de los reordenamientos primarios, o si sigue estando activo en timocitos DP que expresan una cadena $TCR\alpha$. Se necesitará el análisis de los transcritos nacientes germinales del locus *Tcra* de poblaciones tímicas purificadas para determinar esta cuestión.

Otra cuestión interesante es el sentido biológico una inactivación de $E\alpha$ en periferia. Esta inhibición pudiera ser fundamental para la regulación de los niveles de la cadena $TCR\alpha$ en la superficie celular de las células $T\alpha\beta$. La expresión de los componentes del complejo $TCR\alpha\beta$ está dinámicamente regulada durante el desarrollo de los linfocitos T. La baja expresión de los complejos $TCR\alpha\beta$ en timocitos DP, respecto a la que presentan los linfocitos T periféricos, parece ser consecuencia de la baja supervivencia de la cadena $TCR\alpha$ en timocitos DP, debido a su degradación acelerada en el retículo endoplasmático [237-238]. La limitada vida media de los transcritos reordenados del locus *Tcra* en timocitos DP puede hacer esencial la contribución de la función de $E\alpha$ para la expresión de la cadena $TCR\alpha$ dirigida por los promotores $V\alpha$ en estas células. Otra posibilidad interesante, no excluyente con la anterior, es que se necesite limitar el número de complejos $TCR\alpha\beta$ expresados en periferia para una correcta funcionalidad de las células T, ya que hay una correlación directa entre el número de complejos TCR requeridos para la activación celular, en función de la afinidad TCR/ligando [239], y de esta relación va a depender la decisión de una célula en responder, o no, al estímulo [240]. De hecho, cantidades altas de antígeno o estimulaciones repetidas dan lugar a una tolerancia a largo plazo por un exceso de señalización, de forma similar a cómo los superantígenos, después de una activación celular inicial, dan lugar a delección clonal y a anergia, lo que finalmente conduce a una tolerancia inmune periférica [27, 241-243]. Por otro lado, un exceso de señalización basal en linfocitos T en reposo [244], debida a un exceso de complejos

TCR $\alpha\beta$ en superficie podría conducir, por sí mismo, a programas de anergia y tolerancia en periferia.

Futuros experimentos irán también encaminados a dilucidar si la inactivación de $E\alpha$ en periferia es reversible durante la activación de las células T. De hecho, nuestros experimentos de no homodimerización de los factores NFAT unidos a 5'T α 1 apoyan la idea de una posible reversibilidad de la situación por competición en su unión al ADN con factores Ets represores (Resultados C). Por otro lado, los experimentos de delección de $E\alpha$ en el locus *Tcrd* endógeno [159], revelaron que este enhancer contribuye de forma muy importante a la expresión del locus *Tcrd* en células T $\gamma\delta$. Por tanto, será interesante en futuras investigaciones estudiar la funcionalidad de $E\alpha$ durante el desarrollo de los linfocitos T $\gamma\delta$.

VII. Conclusiones

CONCLUSIONES

1.- Las proteínas ATF-2, CREB-1, GATA-3, Ets-1, Fli-1, Sp1, HEB y E2A se unen a $E\alpha$ en vivo en timocitos de ratón. HEB se une de forma específica a la caja-E III, y no las cajas-E I y II de $E\alpha$, estableciendo las bases para los papeles diferenciables que tienen las proteínas E durante el desarrollo de los timocitos.

2.- El análisis de la transcripción germinal y reordenamientos V(D)J regulados por el enhancer quimérico $E\alpha$ MC revelan que el ensamblaje de un $E\alpha$ funcional puede ser más flexible de lo que se había supuesto, abriendo la posibilidad que distintos complejos multiprotéicos se ensamblen en $E\alpha$ durante el desarrollo de los timocitos.

3.- Se necesita una colaboración funcional entre las proteínas que se unen a los sitios runx/ets en $T\alpha 2$ y las que se unen a $T\alpha 3$ - $T\alpha 4$ para la correcta regulación temporal de $E\alpha$ durante el desarrollo de los timocitos.

4.- $E\alpha$ se activa por una señalización constante del pre-TCR mediada por $PLC\gamma$, las quinasas MAPK/ERK y la ruta de Ca^{2+} /calcineurina.

5.- La señalización por el pre-TCR media el ensamblaje de un enhanceosoma $E\alpha$ funcional formado por los factores de transcripción NFAT, Egr-1 y AP-1, los cuales reclutan las actividades HATs, CBP/p300, que median la apertura de la cromatina del locus *Tcra* permitiendo la accesibilidad de las maquinarias de transcripción y de recombinación V(D)J.

6.- La sustitución de AP-1 por CREB en $T\alpha 1$, y de NFAT por Ets-1/Fli-1 en $5'T\alpha 1$, puede constituir la base de la activación de $E\alpha$ durante el desarrollo de los timocitos, en ausencia de cambios detectables en experimentos de footprinting genómico usando DMS.

7.- Las señalizaciones mediadas por los complejos pre-TCR y $TCR\alpha\beta$ son indistinguibles en su capacidad de activar $E\alpha$ durante el desarrollo de los timocitos.

8.- $E\alpha$ está inactivo en linfocitos $T\alpha\beta$ periféricos, sugiriendo que $E\alpha$ es dispensable para la expresión de un *Tcra* reordenado en células T maduras.

VIII. Perspectivas

PERSPECTIVAS

Los datos experimentales obtenidos en esta tesis abren nuevas avenidas de trabajo, que se plantearán en las siguientes líneas para ser desarrolladas en el futuro:

- A. Ahondar en la composición molecular y función de los enhanceosomas $E\alpha$ formados durante el desarrollo de los timocitos: Estudios de unión de proteínas y estudios funcionales. Estos estudios incluirán estudios de las interacciones entre proteínas unidas a $T\alpha 2$ y $T\alpha 3$ - $T\alpha 4$ y estudios de cooperatividad en las uniones NFAT y Egr-1, entre otros.
- B. Caracterización molecular de los promotores primarios TEA y $J\alpha 49p$.
- C. Discriminación de los factores reclutados en vivo a $E\alpha$ y a los promotores $J\alpha$ primarios, TEA y $J\alpha 49p$.
- D. Evaluación del papel de los factores inducibles por el pre-TCR en la formación de un holocomplejo promotor/enhancer.
- E. Determinación de los transcritos germinales nacientes del locus *Tcra* en poblaciones purificadas de timocitos: DN3a, DN4, ISP, DP tempranas y tardías, timocitos $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$, y en células $T\gamma\delta$ periféricas, en cruces F1 de ratones $HY\alpha$ x $Rx\beta$.
- F. Identificación del mecanismo molecular de inactivación de $E\alpha$ en células $T\alpha\beta$ periféricas en reposo: Caracterización del enhanceosoma $E\alpha$ en estas células.
- G. Determinación de la actividad de $E\alpha$ durante la activación de las células $T\alpha\beta$ periféricas: Evaluación de la posible reversibilidad del estado inactivo de $E\alpha$ de células T en reposo.
- H. Estudios comparativos de la actividad de $E\alpha$ y caracterización del enhanceosoma $E\alpha$ en células $T\alpha\beta$ y $T\gamma\delta$.
- I. Generación de un ratón condicional deficiente en $E\alpha$ para la determinación en vivo del papel de este enhancer en periferia.

IX. Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Glusman, G., et al., *Comparative genomics of the human and mouse T cell receptor loci*. *Immunity*, 2001. **15**(3): p. 337-49.
2. Bosc, N. and M.P. Lefranc, *The mouse (*Mus musculus*) T cell receptor alpha (TRA) and delta (TRD) variable genes*. *Dev Comp Immunol*, 2003. **27**(6-7): p. 465-97.
3. Krangel, M.S., et al., *Enforcing order within a complex locus: current perspectives on the control of V(D)J recombination at the murine T-cell receptor alpha/delta locus*. *Immunol Rev*, 2004. **200**: p. 224-32.
4. Gellert, M., *V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation*. *Annu Rev Biochem*, 2002. **71**: p. 101-32.
5. Lieber, M.R., *The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway*. *Annu Rev Biochem*, 2010. **79**: p. 181-211.
6. Oettinger, M.A., et al., *RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination*. *Science*, 1990. **248**(4962): p. 1517-23.
7. Oltz, E.M., et al., *A V(D)J recombinase-inducible B-cell line: role of transcriptional enhancer elements in directing V(D)J recombination*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(10): p. 6223-30.
8. Fugmann, S.D., *The origins of the Rag genes--from transposition to V(D)J recombination*. *Semin Immunol*, 2010. **22**(1): p. 10-6.
9. Matthews, A.G. and M.A. Oettinger, *RAG: a recombinase diversified*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(8): p. 817-21.
10. Sakano, H., et al., *Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes*. *Nature*, 1979. **280**(5720): p. 288-94.
11. Drejer-Teel, A.H., S.D. Fugmann, and D.G. Schatz, *The beyond 12/23 restriction is imposed at the nicking and pairing steps of DNA cleavage during V(D)J recombination*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(18): p. 6288-99.
12. Bassing, C.H., et al., *Recombination signal sequences restrict chromosomal V(D)J recombination beyond the 12/23 rule*. *Nature*, 2000. **405**(6786): p. 583-6.
13. Bassing, C.H., W. Swat, and F.W. Alt, *The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination*. *Cell*, 2002. **109** **Suppl**: p. S45-55.
14. Sleckman, B.P., et al., *Mechanisms that direct ordered assembly of T cell receptor beta locus V, D, and J gene segments*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(14): p. 7975-80.
15. Desiderio, S., *Temporal and spatial regulatory functions of the V(D)J recombinase*. *Semin Immunol*, 2010. **22**(6): p. 362-9.
16. Swanson, P.C., *Fine structure and activity of discrete RAG-HMG complexes on V(D)J recombination signals*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(5): p. 1340-51.
17. Yancopoulos, G.D., et al., *Introduced T cell receptor variable region gene segments recombine in pre-B cells: evidence that B and T cells use a common recombinase*. *Cell*, 1986. **44**(2): p. 251-9.
18. Shinkai, Y., et al., *RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement*. *Cell*, 1992. **68**(5): p. 855-67.
19. Yancopoulos, G.D. and F.W. Alt, *Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments*. *Cell*, 1985. **40**(2): p. 271-81.
20. Cobb, R.M., et al., *Accessibility control of V(D)J recombination*. *Adv Immunol*, 2006. **91**: p. 45-109.
21. Schatz, D.G., M.A. Oettinger, and D. Baltimore, *The V(D)J recombination activating gene, RAG-1*. *Cell*, 1989. **59**(6): p. 1035-48.

22. Stanhope-Baker, P., et al., *Cell type-specific chromatin structure determines the targeting of V(D)J recombinase activity in vitro*. Cell, 1996. **85**(6): p. 887-97.
23. Kwon, J., et al., *Accessibility of nucleosomal DNA to V(D)J cleavage is modulated by RSS positioning and HMG1*. Mol Cell, 1998. **2**(6): p. 829-39.
24. Golding, A., *Roots of violence*. J R Soc Med, 1999. **92**(5): p. 219-21.
25. Ji, Y., et al., *Promoters, enhancers, and transcription target RAG1 binding during V(D)J recombination*. J Exp Med, 2010. **207**(13): p. 2809-16.
26. Olsen, R.W., et al., *gamma-Aminobutyric acid receptor binding in mammalian brain. Heterogeneity of binding sites*. Mol Pharmacol, 1981. **19**(2): p. 217-27.
27. Abarategui, I. and M.S. Krangel, *Regulation of T cell receptor-alpha gene recombination by transcription*. Nat Immunol, 2006. **7**(10): p. 1109-15.
28. Bolland, D.J., et al., *Antisense intergenic transcription in V(D)J recombination*. Nat Immunol, 2004. **5**(6): p. 630-7.
29. Bolland, D.J., et al., *Antisense intergenic transcription precedes Igh D-to-J recombination and is controlled by the intronic enhancer Emu*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(15): p. 5523-33.
30. Kim, A., et al., *Beta-globin intergenic transcription and histone acetylation dependent on an enhancer*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(8): p. 2980-6.
31. Tripathi, R., A. Jackson, and M.S. Krangel, *A change in the structure of Vbeta chromatin associated with TCR beta allelic exclusion*. J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2316-24.
32. Jackson, A.M. and M.S. Krangel, *Allele-specific regulation of TCR beta variable gene segment chromatin structure*. J Immunol, 2005. **175**(8): p. 5186-91.
33. Skok, J.A., et al., *Reversible contraction by looping of the Tcra and Tcrb loci in rearranging thymocytes*. Nat Immunol, 2007. **8**(4): p. 378-87.
34. Roldan, E., et al., *Locus 'decontraction' and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene*. Nat Immunol, 2005. **6**(1): p. 31-41.
35. Wolffe, A.P. and D. Guschin, *Review: chromatin structural features and targets that regulate transcription*. J Struct Biol, 2000. **129**(2-3): p. 102-22.
36. Jacobs, S.A., W. Fischle, and S. Khorasanizadeh, *Assays for the determination of structure and dynamics of the interaction of the chromodomain with histone peptides*. Methods Enzymol, 2004. **376**: p. 131-48.
37. Fahrner, J.A. and S.B. Baylin, *Heterochromatin: stable and unstable invasions at home and abroad*. Genes Dev, 2003. **17**(15): p. 1805-12.
38. Richards, E.J. and S.C. Elgin, *Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects*. Cell, 2002. **108**(4): p. 489-500.
39. Berger, S.L., *Histone modifications in transcriptional regulation*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(2): p. 142-8.
40. Li, B., M. Carey, and J.L. Workman, *The role of chromatin during transcription*. Cell, 2007. **128**(4): p. 707-19.
41. Berger, S.L., *The complex language of chromatin regulation during transcription*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 407-12.
42. Krangel, M.S., et al., *Accessibility control of T cell receptor gene rearrangement in developing thymocytes. The TCR alpha/delta locus*. Immunol Res, 2000. **22**(2-3): p. 127-35.
43. McMurry, M.T., et al., *Enhancer control of local accessibility to V(D)J recombinase*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(8): p. 4553-61.
44. Hannigan, M.O., et al., *Abnormal migration phenotype of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-/- neutrophils in Zigmund chambers containing formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine gradients*. J Immunol, 2001. **167**(7): p. 3953-61.

45. Kwon, J., et al., *Histone acetylation and hSWI/SNF remodeling act in concert to stimulate V(D)J cleavage of nucleosomal DNA*. Mol Cell, 2000. **6**(5): p. 1037-48.
46. Lachner, M., et al., *Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 116-20.
47. Peters, A.H., et al., *Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin*. Mol Cell, 2003. **12**(6): p. 1577-89.
48. Morshead, K.B., et al., *Antigen receptor loci poised for V(D)J rearrangement are broadly associated with BRG1 and flanked by peaks of histone H3 dimethylated at lysine 4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11577-82.
49. Johnson, K., et al., *B cell-specific loss of histone 3 lysine 9 methylation in the V(H) locus depends on Pax5*. Nat Immunol, 2004. **5**(8): p. 853-61.
50. Hsieh, C.L., G. Gauss, and M.R. Lieber, *Replication, transcription, CpG methylation and DNA topology in V(D)J recombination*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **182**: p. 125-35.
51. Mostoslavsky, R., et al., *Kappa chain monoallelic demethylation and the establishment of allelic exclusion*. Genes Dev, 1998. **12**(12): p. 1801-11.
52. Villey, I., et al., *Germ-line transcription and methylation status of the TCR-J alpha locus in its accessible configuration*. Eur J Immunol, 1997. **27**(7): p. 1619-25.
53. Mathieu, N., et al., *Chromatin remodeling by the T cell receptor (TCR)-beta gene enhancer during early T cell development: Implications for the control of TCR-beta locus recombination*. J Exp Med, 2000. **192**(5): p. 625-36.
54. Maston, G.A., S.K. Evans, and M.R. Green, *Transcriptional regulatory elements in the human genome*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2006. **7**: p. 29-59.
55. Rosenfeld, M.G., V.V. Lunyak, and C.K. Glass, *Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response*. Genes Dev, 2006. **20**(11): p. 1405-28.
56. Heintzman, N.D., et al., *Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression*. Nature, 2009. **459**(7243): p. 108-12.
57. Visel, A., et al., *ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers*. Nature, 2009. **457**(7231): p. 854-8.
58. Lemon, B. and R. Tjian, *Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control*. Genes Dev, 2000. **14**(20): p. 2551-69.
59. Osipovich, O. and E.M. Oltz, *Regulation of antigen receptor gene assembly by genetic-epigenetic crosstalk*. Semin Immunol, 2010. **22**(6): p. 313-22.
60. Hawwari, A. and M.S. Krangel, *Regulation of TCR delta and alpha repertoires by local and long-distance control of variable gene segment chromatin structure*. J Exp Med, 2005. **202**(4): p. 467-72.
61. Afshar, R., et al., *Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5'DQ52 region in targeting DHJH recombination*. J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2439-47.
62. Sikes, M.L., et al., *A developmental stage-specific promoter directs germline transcription of D beta J beta gene segments in precursor T lymphocytes*. J Immunol, 1998. **161**(3): p. 1399-405.
63. Whitehurst, C.E., S. Chattopadhyay, and J. Chen, *Control of V(D)J recombinational accessibility of the D beta 1 gene segment at the TCR beta locus by a germline promoter*. Immunity, 1999. **10**(3): p. 313-22.
64. Oestreich, K.J., et al., *Regulation of TCRbeta gene assembly by a promoter/enhancer holocomplex*. Immunity, 2006. **24**(4): p. 381-91.

65. Ryu, C.J., et al., *The T-cell receptor beta variable gene promoter is required for efficient V beta rearrangement but not allelic exclusion*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(16): p. 7015-23.
66. Hawwari, A., C. Bock, and M.S. Krangel, *Regulation of T cell receptor alpha gene assembly by a complex hierarchy of germline Jalpha promoters*. Nat Immunol, 2005. **6**(5): p. 481-9.
67. Villey, I., et al., *Defect in rearrangement of the most 5' TCR-J alpha following targeted deletion of T early alpha (TEA): implications for TCR alpha locus accessibility*. Immunity, 1996. **5**(4): p. 331-42.
68. Liu, Y., et al., *A plant homeodomain in RAG-2 that binds Hypermethylated lysine 4 of histone H3 is necessary for efficient antigen-receptor-gene rearrangement*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 561-71.
69. Matthews, A.G., et al., *RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination*. Nature, 2007. **450**(7172): p. 1106-10.
70. Wang, Z., et al., *Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome*. Nat Genet, 2008. **40**(7): p. 897-903.
71. Ji, Y., et al., *The in vivo pattern of binding of RAG1 and RAG2 to antigen receptor loci*. Cell, 2010. **141**(3): p. 419-31.
72. Shimazaki, N., A.G. Tsai, and M.R. Lieber, *H3K4me3 stimulates the V(D)J RAG complex for both nicking and hairpinning in trans in addition to tethering in cis: implications for translocations*. Mol Cell, 2009. **34**(5): p. 535-44.
73. Gondor, A. and R. Ohlsson, *Chromosome crosstalk in three dimensions*. Nature, 2009. **461**(7261): p. 212-7.
74. Bulger, M. and M. Groudine, *Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation*. Genes Dev, 1999. **13**(19): p. 2465-77.
75. Fraser, P. and W. Bickmore, *Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 413-7.
76. Hadjur, S., et al., *Cohesins form chromosomal cis-interactions at the developmentally regulated IFNG locus*. Nature, 2009. **460**(7253): p. 410-3.
77. Liu, Z. and W.T. Garrard, *Long-range interactions between three transcriptional enhancers, active V kappa gene promoters, and a 3' boundary sequence spanning 46 kilobases*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 3220-31.
78. Rothenberg, E.V., J.E. Moore, and M.A. Yui, *Launching the T-cell-lineage developmental programme*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 9-21.
79. Rothenberg, E.V. and D.D. Scripture-Adams, *Competition and collaboration: GATA-3, PU.1, and Notch signaling in early T-cell fate determination*. Semin Immunol, 2008. **20**(4): p. 236-46.
80. Rodewald, H.R., et al., *Intrathymically expressed c-kit ligand (stem cell factor) is a major factor driving expansion of very immature thymocytes in vivo*. Immunity, 1995. **3**(3): p. 313-9.
81. Aspinall, R., *T cell development, ageing and Interleukin-7*. Mech Ageing Dev, 2006. **127**(6): p. 572-8.
82. Capone, M., R.D. Hockett, Jr., and A. Zlotnik, *Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)CD25(+) Pro-T thymocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12522-7.
83. Livak, F., et al., *Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2575-80.
84. Godfrey, D.I., et al., *Onset of TCR-beta gene rearrangement and role of TCR-beta expression during CD3-CD4-CD8- thymocyte differentiation*. J Immunol, 1994. **152**(10): p. 4783-92.

85. Wilson, A., W. Held, and H.R. MacDonald, *Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1355-60.
86. Prinz, I., et al., *Visualization of the earliest steps of gammadelta T cell development in the adult thymus*. Nat Immunol, 2006. **7**(9): p. 995-1003.
87. Dudley, E.C., et al., *T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice*. Immunity, 1994. **1**(2): p. 83-93.
88. von Boehmer, H. and H.J. Fehling, *Structure and function of the pre-T cell receptor*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 433-52.
89. Groettrup, M., et al., *A novel disulfide-linked heterodimer on pre-T cells consists of the T cell receptor beta chain and a 33 kd glycoprotein*. Cell, 1993. **75**(2): p. 283-94.
90. Saint-Ruf, C., et al., *Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene*. Science, 1994. **266**(5188): p. 1208-12.
91. Ciofani, M., et al., *Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5230-9.
92. Xu, M., et al., *Pre-TCR-induced beta-catenin facilitates traversal through beta-selection*. J Immunol, 2009. **182**(2): p. 751-8.
93. Taghon, T., et al., *Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus*. Immunity, 2006. **24**(1): p. 53-64.
94. Williams, J.A., et al., *Regulated costimulation in the thymus is critical for T cell development: dysregulated CD28 costimulation can bypass the pre-TCR checkpoint*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4199-207.
95. Teague, T.K., et al., *CD28 expression redefines thymocyte development during the pre-T to DP transition*. Int Immunol, 2010. **22**(5): p. 387-97.
96. Haks, M.C., et al., *Attenuation of gammadeltaTCR signaling efficiently diverts thymocytes to the alphabeta lineage*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 595-606.
97. Hayes, S.M., L. Li, and P.E. Love, *TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 583-93.
98. Garbe, A.I. and H. von Boehmer, *TCR and Notch synergize in alphabeta versus gammadelta lineage choice*. Trends Immunol, 2007. **28**(3): p. 124-31.
99. Garcia-Peydro, M., V.G. de Yébenes, and M.L. Toribio, *Sustained Notch1 signaling instructs the earliest human intrathymic precursors to adopt a gammadelta T-cell fate in fetal thymus organ culture*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2444-51.
100. Schmitt, T.M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro*. Immunity, 2002. **17**(6): p. 749-56.
101. Hernandez-Munain, C., B.P. Sleckman, and M.S. Krangel, *A developmental switch from TCR delta enhancer to TCR alpha enhancer function during thymocyte maturation*, in *Immunity*. 1999. p. 723-33.
102. Wilson, A., J.P. de Villartay, and H.R. MacDonald, *T cell receptor delta gene rearrangement and T early alpha (TEA) expression in immature alpha beta lineage thymocytes: implications for alpha beta/gamma delta lineage commitment*. Immunity, 1996. **4**(1): p. 37-45.
103. Petrie, H.T., et al., *T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production*. J Exp Med, 1995. **182**(1): p. 121-7.
104. Krangel, M.S., et al., *Developmental regulation of V(D)J recombination at the TCR alpha/delta locus*. Immunol Rev, 1998. **165**: p. 131-47.

105. Yamasaki, S., et al., *Mechanistic basis of pre-T cell receptor-mediated autonomous signaling critical for thymocyte development*. Nat Immunol, 2006. **7**(1): p. 67-75.
106. Aifantis, I., et al., *Regulation of T-cell progenitor survival and cell-cycle entry by the pre-T-cell receptor*. Immunol Rev, 2006. **209**: p. 159-69.
107. Michie, A.M. and J.C. Zuniga-Pflucker, *Regulation of thymocyte differentiation: pre-TCR signals and beta-selection*. Semin Immunol, 2002. **14**(5): p. 311-23.
108. Zuniga-Pflucker, J.C., H.L. Schwartz, and M.J. Lenardo, *Gene transcription in differentiating immature T cell receptor(neg) thymocytes resembles antigen-activated mature T cells*. J Exp Med, 1993. **178**(4): p. 1139-49.
109. Sen, J., et al., *Expression and induction of nuclear factor-kappa B-related proteins in thymocytes*. J Immunol, 1995. **154**(7): p. 3213-21.
110. Voll, R.E., et al., *NF-kappa B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 677-89.
111. Aifantis, I., et al., *Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca²⁺ mobilization and activation of NF-kappaB and NFAT*. Nat Immunol, 2001. **2**(5): p. 403-9.
112. Xi, H., et al., *Interplay between RORgammat, Egr3, and E proteins controls proliferation in response to pre-TCR signals*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 813-26.
113. Koltsova, E.K., et al., *Early growth response 1 and NF-ATc1 act in concert to promote thymocyte development beyond the beta-selection checkpoint*. J Immunol, 2007. **179**(7): p. 4694-703.
114. Shaw, J.P., et al., *Identification of a putative regulator of early T cell activation genes*. Science, 1988. **241**(4862): p. 202-5.
115. Rao, A., C. Luo, and P.G. Hogan, *Transcription factors of the NFAT family: regulation and function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 707-47.
116. Macian, F., *NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(6): p. 472-84.
117. Oh-hora, M., *Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells*. Immunol Rev, 2009. **231**(1): p. 210-24.
118. Wu, H., et al., *NFAT signaling and the invention of vertebrates*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(6): p. 251-60.
119. Falvo, J.V., et al., *A dimer-specific function of the transcription factor NFATp*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(50): p. 19637-42.
120. Falvo, J.V., et al., *Stimulus-specific assembly of enhancer complexes on the tumor necrosis factor alpha gene promoter*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(6): p. 2239-47.
121. Hodge, M.R., et al., *Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice*. Immunity, 1996. **4**(4): p. 397-405.
122. Xanthoudakis, S., et al., *An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1*. Science, 1996. **272**(5263): p. 892-5.
123. Yoshida, H., et al., *The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production*. Immunity, 1998. **8**(1): p. 115-24.
124. Ranger, A.M., et al., *Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-ATc*. Immunity, 1998. **8**(1): p. 125-34.
125. Oukka, M., et al., *The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells*. Immunity, 1998. **9**(3): p. 295-304.
126. Cante-Barrett, K., M.M. Winslow, and G.R. Crabtree, *Selective role of NFATc3 in positive selection of thymocytes*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 103-10.

127. Rengarajan, J., B. Tang, and L.H. Glimcher, *NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naive T(H)cells*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(1): p. 48-54.
128. Peng, S.L., et al., *NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation*. *Immunity*, 2001. **14**(1): p. 13-20.
129. Ranger, A.M., et al., *Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development*. *Immunity*, 1998. **9**(5): p. 627-35.
130. Benbrook, D.M. and N.C. Jones, *Heterodimer formation between CREB and JUN proteins*. *Oncogene*, 1990. **5**(3): p. 295-302.
131. Manna, P.R. and D.M. Stocco, *Crosstalk of CREB and Fos/Jun on a single cis-element: transcriptional repression of the steroidogenic acute regulatory protein gene*. *J Mol Endocrinol*, 2007. **39**(4): p. 261-77.
132. Chinenov, Y. and T.K. Kerppola, *Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity*. *Oncogene*, 2001. **20**(19): p. 2438-52.
133. Vogt, P.K., *Fortuitous convergences: the beginnings of JUN*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(6): p. 465-9.
134. Eferl, R. and E.F. Wagner, *AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(11): p. 859-68.
135. Kaminska, B., et al., *Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity*. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2000. **60**(3): p. 395-402.
136. Chen, F., D. Chen, and E.V. Rothenberg, *Specific regulation of fos family transcription factors in thymocytes at two developmental checkpoints*. *Int Immunol*, 1999. **11**(5): p. 677-88.
137. Wang, X., et al., *Regulation of Tcrb recombination ordering by c-Fos-dependent RAG deposition*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(7): p. 794-801.
138. Riera-Sans, L. and A. Behrens, *Regulation of alphabeta/gammadelta T cell development by the activator protein 1 transcription factor c-Jun*. *J Immunol*, 2007. **178**(9): p. 5690-700.
139. Joseph, L.J., et al., *Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(19): p. 7164-8.
140. Shao, H., et al., *Induction of the early growth response (Egr) family of transcription factors during thymic selection*. *J Exp Med*, 1997. **185**(4): p. 731-44.
141. Shao, H., et al., *Slow accumulation of active mitogen-activated protein kinase during thymocyte differentiation regulates the temporal pattern of transcription factor gene expression*. *J Immunol*, 1999. **163**(2): p. 603-10.
142. Rengarajan, J., et al., *Sequential involvement of NFAT and Egr transcription factors in FasL regulation*. *Immunity*, 2000. **12**(3): p. 293-300.
143. Collins, S., et al., *Opposing regulation of T cell function by Egr-1/NAB2 and Egr-2/Egr-3*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(2): p. 528-36.
144. Decker, E.L., et al., *Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(3): p. 911-21.
145. Ye, S.K., et al., *Transcriptional regulation of the mouse interleukin-2 receptor beta chain gene by Ets and Egr-1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **329**(3): p. 1094-101.
146. Carleton, M., et al., *Early growth response transcription factors are required for development of CD4(-)CD8(-) thymocytes to the CD4(+)CD8(+) stage*. *J Immunol*, 2002. **168**(4): p. 1649-58.

147. Miyazaki, T., *Two distinct steps during thymocyte maturation from CD4-CD8- to CD4+CD8+ distinguished in the early growth response (Egr)-1 transgenic mice with a recombinase-activating gene-deficient background.* J Exp Med, 1997. **186**(6): p. 877-85.
148. Bettini, M., et al., *Thymocyte development in early growth response gene 1-deficient mice.* J Immunol, 2002. **169**(4): p. 1713-20.
149. Xi, H. and G.J. Kersh, *Early growth response gene 3 regulates thymocyte proliferation during the transition from CD4-CD8- to CD4+CD8+.* J Immunol, 2004. **172**(2): p. 964-71.
150. Carter, J.H., et al., *Redundant role for early growth response transcriptional regulators in thymocyte differentiation and survival.* J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6796-805.
151. Zhuang, Y., P. Soriano, and H. Weintraub, *The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation.* Cell, 1994. **79**(5): p. 875-84.
152. Bain, G., et al., *E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements.* Cell, 1994. **79**(5): p. 885-92.
153. Agata, Y., et al., *Regulation of T cell receptor beta gene rearrangements and allelic exclusion by the helix-loop-helix protein, E47.* Immunity, 2007. **27**(6): p. 871-84.
154. Bain, G., et al., *E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(8): p. 4782-91.
155. Barndt, R., M.F. Dai, and Y. Zhuang, *A novel role for HEB downstream or parallel to the pre-TCR signaling pathway during alpha beta thymopoiesis.* J Immunol, 1999. **163**(6): p. 3331-43.
156. Rothenberg, E.V. and T. Taghon, *Molecular genetics of T cell development.* Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 601-49.
157. Hendriks, R.W., et al., *Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus.* Eur J Immunol, 1999. **29**(6): p. 1912-8.
158. Kim, D., X.C. Peng, and X.H. Sun, *Massive apoptosis of thymocytes in T-cell-deficient Id1 transgenic mice.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(12): p. 8240-53.
159. Sleckman, B.P., et al., *Function of the TCR alpha enhancer in alphabeta and gammadelta T cells.* Immunity, 1997. **7**(4): p. 505-15.
160. Monroe, R.J., et al., *Developmental regulation of TCR delta locus accessibility and expression by the TCR delta enhancer.* Immunity, 1999. **10**(5): p. 503-13.
161. Capone, M., et al., *TCR beta and TCR alpha gene enhancers confer tissue- and stage-specificity on V(D)J recombination events.* EMBO J, 1993. **12**(11): p. 4335-46.
162. Lauzurica, P. and M.S. Krangel, *Temporal and lineage-specific control of T cell receptor alpha/delta gene rearrangement by T cell receptor alpha and delta enhancers.* J Exp Med, 1994. **179**(6): p. 1913-21.
163. Lauzurica, P. and M.S. Krangel, *Enhancer-dependent and -independent steps in the rearrangement of a human T cell receptor delta transgene.* J Exp Med, 1994. **179**(1): p. 43-55.
164. Hernandez-Munain, C., B.P. Sleckman, and M.S. Krangel, *A developmental switch from TCR delta enhancer to TCR alpha enhancer function during thymocyte maturation.* Immunity, 1999. **10**(6): p. 723-33.
165. Carabana, J., E. Ortigoza, and M.S. Krangel, *Regulation of the murine Ddelta2 promoter by upstream stimulatory factor 1, Runx1, and c-Myb.* J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4144-52.

166. Hawwari, A. and M.S. Krangel, *Role for rearranged variable gene segments in directing secondary T cell receptor alpha recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 903-7.
167. Shih, H.Y. and M.S. Krangel, *Distinct contracted conformations of the Tcra/Tcrd locus during Tcra and Tcrd recombination*. J Exp Med, 2010. **207**(9): p. 1835-41.
168. Redondo, J.M., et al., *A T cell-specific transcriptional enhancer within the human T cell receptor delta locus*. Science, 1990. **247**(4947): p. 1225-9.
169. McMurry, M.T. and M.S. Krangel, *A role for histone acetylation in the developmental regulation of VDJ recombination*. Science, 2000. **287**(5452): p. 495-8.
170. Huang, C.Y. and B.P. Sleckman, *Developmental stage-specific regulation of TCR-alpha-chain gene assembly by intrinsic features of the TEA promoter*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 449-54.
171. Zhong, X.P. and M.S. Krangel, *An enhancer-blocking element between alpha and delta gene segments within the human T cell receptor alpha/delta locus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5219-24.
172. Sleckman, B.P., et al., *Assessing a role for enhancer-blocking activity in gene regulation within the murine T-cell receptor alpha/delta locus*. Immunology, 2001. **104**(1): p. 11-8.
173. Redondo, J.M., J.L. Pfohl, and M.S. Krangel, *Identification of an essential site for transcriptional activation within the human T-cell receptor delta enhancer*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(11): p. 5671-80.
174. Hernandez-Munain, C. and M.S. Krangel, *c-Myb and core-binding factor/PEBP2 display functional synergy but bind independently to adjacent sites in the T-cell receptor delta enhancer*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(6): p. 3090-9.
175. Redondo, J.M., et al., *Indistinguishable nuclear factor binding to functional core sites of the T-cell receptor delta and murine leukemia virus enhancers*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(11): p. 4817-23.
176. Hernandez-Munain, C. and M.S. Krangel, *Regulation of the T-cell receptor delta enhancer by functional cooperation between c-Myb and core-binding factors*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(1): p. 473-83.
177. Hernandez-Munain, C., P. Lauzurica, and M.S. Krangel, *Regulation of T cell receptor delta gene rearrangement by c-Myb*. J Exp Med, 1996. **183**(1): p. 289-93.
178. Zhong, X.P., J. Carabana, and M.S. Krangel, *Flanking nuclear matrix attachment regions synergize with the T cell receptor delta enhancer to promote V(D)J recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(21): p. 11970-5.
179. Hernandez-Munain, C. and M.S. Krangel, *Distinct roles for c-Myb and core binding factor/polyoma enhancer-binding protein 2 in the assembly and function of a multiprotein complex on the TCR delta enhancer in vivo*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4362-9.
180. Lauzurica, P., et al., *Regulation of T cell receptor delta gene rearrangement by CBF/PEBP2*. J Exp Med, 1997. **185**(7): p. 1193-201.
181. Roberts, J.L., P. Lauzurica, and M.S. Krangel, *Developmental regulation of VDJ recombination by the core fragment of the T cell receptor alpha enhancer*. J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 131-40.
182. Ho, I.C., et al., *A T-cell-specific transcriptional enhancer element 3' of C alpha in the human T-cell receptor alpha locus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(17): p. 6714-8.

183. Winoto, A. and D. Baltimore, *A novel, inducible and T cell-specific enhancer located at the 3' end of the T cell receptor alpha locus*. EMBO J, 1989. **8**(3): p. 729-33.
184. Abarrategui, I. and M.S. Krangel, *Noncoding transcription controls downstream promoters to regulate T-cell receptor alpha recombination*. EMBO J, 2007. **26**(20): p. 4380-90.
185. Ho, I.C. and J.M. Leiden, *The T alpha 2 nuclear protein binding site from the human T cell receptor alpha enhancer functions as both a T cell-specific transcriptional activator and repressor*. J Exp Med, 1990. **172**(5): p. 1443-9.
186. Balmelle, N., et al., *Developmental activation of the TCR alpha enhancer requires functional collaboration among proteins bound inside and outside the core enhancer*. J Immunol, 2004. **173**(8): p. 5054-63.
187. Bassing, C.H., et al., *T cell receptor (TCR) alpha/delta locus enhancer identity and position are critical for the assembly of TCR delta and alpha variable region genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2598-603.
188. Giese, K., et al., *Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions*. Genes Dev, 1995. **9**(8): p. 995-1008.
189. Mayall, T.P., et al., *Distinct roles for P-CREB and LEF-1 in TCR alpha enhancer assembly and activation on chromatin templates in vitro*. Genes Dev, 1997. **11**(7): p. 887-99.
190. Travis, A., et al., *LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]*. Genes Dev, 1991. **5**(5): p. 880-94.
191. van de Wetering, M., et al., *Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box*. EMBO J, 1991. **10**(1): p. 123-32.
192. Hollenhorst, P.C., et al., *Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family*. Genes Dev, 2007. **21**(15): p. 1882-94.
193. Okamura, R.M., et al., *Redundant regulation of T cell differentiation and TCRalpha gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1*. Immunity, 1998. **8**(1): p. 11-20.
194. Ho, I.C., et al., *Sequence-specific binding of human Ets-1 to the T cell receptor alpha gene enhancer*. Science, 1990. **250**(4982): p. 814-8.
195. Waterman, M.L., W.H. Fischer, and K.A. Jones, *A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor C alpha enhancer*. Genes Dev, 1991. **5**(4): p. 656-69.
196. Spicuglia, S., et al., *TCRalpha enhancer activation occurs via a conformational change of a pre-assembled nucleo-protein complex*. Embo J, 2000. **19**(9): p. 2034-45.
197. Ho, I.C., et al., *Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T cell receptor alpha gene*. EMBO J, 1991. **10**(5): p. 1187-92.
198. Hernandez-Munain, C., J.L. Roberts, and M.S. Krangel, *Cooperation among multiple transcription factors is required for access to minimal T-cell receptor alpha-enhancer chromatin in vivo*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(6): p. 3223-33.
199. Tutter, A.V., C.J. Fryer, and K.A. Jones, *Chromatin-specific regulation of LEF-1-beta-catenin transcription activation and inhibition in vitro*. Genes Dev, 2001. **15**(24): p. 3342-54.
200. Carlsson, P., M.L. Waterman, and K.A. Jones, *The hLEF/TCF-1 alpha HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that*

- induces the TCR alpha enhancer in T cells.* Genes Dev, 1993. **7**(12A): p. 2418-30.
201. Wotton, D., et al., *Cooperative binding of Ets-1 and core binding factor to DNA.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(1): p. 840-50.
 202. Bruhn, L., A. Munnerlyn, and R. Grosschedl, *ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCRalpha enhancer function.* Genes Dev, 1997. **11**(5): p. 640-53.
 203. Hsu, S.C., J. Galceran, and R. Grosschedl, *Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(8): p. 4807-18.
 204. Luo, C., E. Burgeon, and A. Rao, *Mechanisms of transactivation by nuclear factor of activated T cells-1.* J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 141-7.
 205. Tsai, E.Y., et al., *Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp.* Mol Cell Biol, 1996. **16**(2): p. 459-67.
 206. Bowers, S.R., et al., *Runx1 binds as a dimeric complex to overlapping Runx1 sites within a palindromic element in the human GM-CSF enhancer.* Nucleic Acids Res, 2010. **38**(18): p. 6124-34.
 207. Cowley, D.O. and B.J. Graves, *Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition.* Genes Dev, 2000. **14**(3): p. 366-76.
 208. Buch, T., et al., *Failure of HY-specific thymocytes to escape negative selection by receptor editing.* Immunity, 2002. **16**(5): p. 707-18.
 209. Trop, S., et al., *Competitive displacement of pT alpha by TCR-alpha during TCR assembly prevents surface coexpression of pre-TCR and alpha beta TCR.* J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5566-72.
 210. Tremblay, M., et al., *Regulation of pT alpha gene expression by a dosage of E2A, HEB, and SCL.* J Biol Chem, 2003. **278**(15): p. 12680-7.
 211. Croxford, A.L., et al., *MHC-restricted T cell receptor signaling is required for alpha beta TCR replacement of the pre T cell receptor.* Eur J Immunol, 2008. **38**(2): p. 391-9.
 212. Gomez-Martin, D., et al., *Early growth response transcription factors and the modulation of immune response: implications towards autoimmunity.* Autoimmun Rev, 2010. **9**(6): p. 454-8.
 213. Seder, R.A., et al., *The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice.* J Exp Med, 1992. **176**(4): p. 1091-8.
 214. Jackson, A., et al., *Regulation of T cell receptor beta allelic exclusion at a level beyond accessibility.* Nat Immunol, 2005. **6**(2): p. 189-97.
 215. Jackson, A.M. and M.S. Krangel, *A role for MAPK in feedback inhibition of Tcrb recombination.* J Immunol, 2006. **176**(11): p. 6824-30.
 216. Schneider, R., et al., *Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes.* Nat Cell Biol, 2004. **6**(1): p. 73-7.
 217. Shinkai, Y., et al., *Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes.* Science, 1993. **259**(5096): p. 822-5.
 218. Tsai, E.Y., et al., *A lipopolysaccharide-specific enhancer complex involving Ets, Elk-1, Sp1, and CREB binding protein and p300 is recruited to the tumor necrosis factor alpha promoter in vivo.* Mol Cell Biol, 2000. **20**(16): p. 6084-94.
 219. Panne, D., *The enhanceosome.* Curr Opin Struct Biol, 2008. **18**(2): p. 236-42.
 220. Giese, K., J. Cox, and R. Grosschedl, *The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures.* Cell, 1992. **69**(1): p. 185-95.

221. Grosschedl, R., K. Giese, and J. Pagel, *HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures*. Trends Genet, 1994. **10**(3): p. 94-100.
222. Spicuglia, S., et al., *Promoter activation by enhancer-dependent and -independent loading of activator and coactivator complexes*. Mol Cell, 2002. **10**(6): p. 1479-87.
223. Chen, M.L. and C.L. Kuo, *A conserved sequence block in the murine and human T cell receptor Jalpha loci interacts with developmentally regulated nucleoprotein complexes in vitro and associates with GATA-3 and octamer-binding factors in vivo*. Eur J Immunol, 2001. **31**(6): p. 1696-705.
224. Bernard, M., et al., *Helix-loop-helix (E2-5, HEB, TAL1 and Id1) protein interaction with the TCRalpha enhancers*. Int Immunol, 1998. **10**(10): p. 1539-49.
225. Engel, I., et al., *Early thymocyte development is regulated by modulation of E2A protein activity*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 733-45.
226. Carleton, M., et al., *Signals transduced by CD3epsilon, but not by surface pre-TCR complexes, are able to induce maturation of an early thymic lymphoma in vitro*. J Immunol, 1999. **163**(5): p. 2576-85.
227. Blobel, G.A., *CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription*. Blood, 2000. **95**(3): p. 745-55.
228. Eyquem, S., et al., *The Ets-1 transcription factor is required for complete pre-T cell receptor function and allelic exclusion at the T cell receptor beta locus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(44): p. 15712-7.
229. Egawa, T., et al., *The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1945-57.
230. Wong, W.F., et al., *Interplay of transcription factors in T-cell differentiation and function: the role of Runx*. Immunology, 2011. **132**(2): p. 157-64.
231. Rabault, B. and J. Ghysdael, *Calcium-induced phosphorylation of ETS1 inhibits its specific DNA binding activity*. J Biol Chem, 1994. **269**(45): p. 28143-51.
232. Erman, B., et al., *Early TCRalpha expression generates TCRalphagamma complexes that signal the DN-to-DP transition and impair development*. Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 564-9.
233. Tsytsykova, A.V., et al., *Activation-dependent intrachromosomal interactions formed by the TNF gene promoter and two distal enhancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 16850-5.
234. Chavanas, S., et al., *Long-range enhancer associated with chromatin looping allows AP-1 regulation of the peptidylarginine deiminase 3 gene in differentiated keratinocyte*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3408.
235. Yun, K., et al., *Lymphoid enhancer binding factor 1 regulates transcription through gene looping*. J Immunol, 2009. **183**(8): p. 5129-37.
236. Erman, B., T.I. Guinter, and A. Singer, *Defined alphabeta T cell receptors with distinct ligand specificities do not require those ligands to signal double negative thymocyte differentiation*. J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1719-24.
237. Kearse, K.P., J.L. Roberts, and A. Singer, *TCR alpha-CD3 delta epsilon association is the initial step in alpha beta dimer formation in murine T cells and is limiting in immature CD4+ CD8+ thymocytes*. Immunity, 1995. **2**(4): p. 391-9.
238. Kearse, K.P., et al., *Developmental regulation of alpha beta T cell antigen receptor assembly in immature CD4+CD8+ thymocytes*. Bioessays, 1995. **17**(12): p. 1049-54.

239. Schodin, B.A., T.J. Tsomides, and D.M. Kranz, *Correlation between the number of T cell receptors required for T cell activation and TCR-ligand affinity*. *Immunity*, 1996. **5**(2): p. 137-46.
240. Wells, A.D., *New insights into the molecular basis of T cell anergy: anergy factors, avoidance sensors, and epigenetic imprinting*. *J Immunol*, 2009. **182**(12): p. 7331-41.
241. Webb, S., C. Morris, and J. Sprent, *Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity*. *Cell*, 1990. **63**(6): p. 1249-56.
242. McCormack, J.E., et al., *Profound deletion of mature T cells in vivo by chronic exposure to exogenous superantigen*. *J Immunol*, 1993. **150**(9): p. 3785-92.
243. Wahl, C., et al., *Clonal deletion as direct consequence of an in vivo T cell response to bacterial superantigen*. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(5): p. 1197-200.
244. Roose, J.P., et al., *T cell receptor-independent basal signaling via Erk and Abl kinases suppresses RAG gene expression*. *PLoS Biol*, 2003. **1**(2): p. E53.