

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Biomedicina (B11.56.1)

**REGULACIÓN DE LOS ENHANCERS DE LOS GENES DE  
LAS CADENAS  $\gamma$  y  $\delta$  DEL TCR DURANTE EL  
DESARROLLO DE LOS TIMOCITOS.**

**ALONSO RODRÍGUEZ CAPARRÓS**

INSTITUTO DE PARASITOLOGÍA Y BIOMEDICINA “LÓPEZ-NEYRA”  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

UNIVERSIDAD DE GRANADA

IPBLN, CSIC

GRANADA, 2020



UNIVERSIDAD  
DE GRANADA



Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Alonso Rodríguez Caparrós  
ISBN: 978-84-1306-614-1  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/63647>



**Esta tesis ha sido financiada por los proyectos del Plan Nacional de I+D+i del  
Ministerio de Economía y Competitividad BFU2013-44660-R y BFU2016-79699-P**

<b>RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
1. Organización de la cromatina. ....	20
1.1. Niveles de compactación. ....	20
1.2. Epigenética. ....	23
1.3. Complejos remodeladores de la cromatina. ....	25
2. Elementos reguladores de la transcripción génica. ....	25
2.1. Enhancers. ....	25
2.2. Promotores. ....	27
3. Desarrollo de los linfocitos T. ....	27
3.1. Etapas de diferenciación desde progenitores a linfocitos T. ....	27
3.1.1. Etapa pre-tímica. ....	27
3.1.2. Etapa tímica: generación de los linfocitos T. ....	30
4. Señalizaciones para el desarrollo de los linfocitos T en el timo. ....	33
4.1. Señalización mediada por Notch. ....	33
4.1.1. Estructura de los receptores Notch y sus ligandos. ....	33
4.1.2. Vía de señalización de Notch. ....	36
4.1.3. Papel de la señalización de Notch 1 en la determinación del linaje T. ....	37
4.1.4. Señalización de Notch en la diferenciación de linfocitos T $\alpha\beta$ versus T $\gamma\delta$ . ....	38
4.2. Señalización mediada por IL-7. ....	39
4.3. Señalización de Wnt. ....	41
4.4. Selección- $\beta$ . ....	42
4.4.1. Señalización mediada por el pre-TCR. ....	42
4.4.2. Señalización mediada por NOTCH1 durante la selección- $\beta$ . ....	45
4.4.3. Señalización mediada por IL-7 durante la selección- $\beta$ . ....	45
4.5. Selección positiva. ....	46
5. Factores de transcripción relevantes para la diferenciación de los timocitos. ....	46
5.1. Factores de transcripción constitutivos en la etapa pre-tímica. ....	46
5.1.1. MYB. ....	46
5.1.2. RUNX y CBF $\beta$ . ....	48
5.1.3. Proteínas E, E2A y HEB e inhibidores ID. ....	50
5.1.4. IKAROS. ....	50
5.1.5. GFI1. ....	52
5.2. Factores de transcripción implicados en la determinación del linaje T mediada por NOTCH1. ....	53

5.2.1. HES1.....	53
5.2.2. TCF1.....	55
5.2.3. GATA3.....	56
5.2.4. BCL11B.....	57
5.2.5. HEBAIt.....	58
5.2.6. PU.1.....	58
5.2.7. C/EBF $\alpha$ .....	59
5.3. Factores de transcripción activados por la señalización de IL-7.....	60
5.3.1. STAT5.....	60
5.4. Factores de transcripción inducidos por la señalización del pre-TCR.....	61
5.4.1. NFAT.....	62
5.4.2. EGR.....	63
5.4.3. ID3.....	64
5.4.4. ROR $\gamma$ t.....	65
5.4.5. AP1.....	65
5.4.6. NF $\kappa$ B.....	66
5.4.7. ETS1.....	67
6. Receptores de antígeno de linfocitos T, TCR.....	67
6.1. Estructura del TCR.....	67
6.2. Organización genómica de los loci del TCR.....	69
6.2.1. Loci de los genes <i>Tcra</i> y <i>Tcrd</i> , <i>Tcra/Tcrd</i> .....	69
6.2.2. Locus <i>Tcrg</i> .....	70
6.2.3. Locus <i>Tcrb</i> .....	70
7. Recombinación V(D)J.....	71
7.1. Iniciación, corte y ensamblaje de segmentos .. génicos codificantes.....	71
7.2. Control de la recombinación V(D)J.....	74
7.3. Regulación de la accesibilidad a las proteínas RAG1 y RAG2...	74
7.4. Transcripción germinal y recombinación V(D)J.....	75
8. Regulación temporal de la expresión de TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$ durante el desarrollo de los timocitos .....	76
8.1. Regulación de la transcripción y la recombinación V(D)J del locus <i>Tcra/Tcrd</i> durante el desarrollo.....	77
8.2. Regulación de la transcripción y recombinación V $\gamma$ J $\gamma$ del locus <i>Tcrg</i> durante el desarrollo .....	82
8.3. Regulación de la transcripción y recombinación V $\beta$ D $\beta$ J $\beta$ del locus <i>Tcrb</i> durante el desarrollo.....	82
9. <i>Enhancers</i> responsables de la transcripción y recombinación de los genes del TCR.....	83
9.1. <i>Enhancer</i> del gen <i>Tcrd</i> (E $\delta$ ).....	85
9.2. <i>Enhancers</i> del gen <i>Tcrg</i> (E $\gamma$ ).....	87
9.3. <i>Enhancer</i> del gen <i>Tcra</i> (E $\alpha$ ).....	87

9.4. <i>Enhancer</i> del gen <i>Tcrb</i> (E $\beta$ ).....	90
10. Leucemias Linfoblásticas Agudas de linfocitos T (T-ALL).....	90
10.1. Función oncogénica de NOTCH1 en T-ALL.....	91
10.2. Implicación de la ruta de IL-7 en T-ALL.....	92
10.3. Implicación de la señalización del pre-TCR en T-ALL.....	94
10.4. Implicación de la recombinación V(D)J en T-ALL.....	94
10.5. Circuito regulador central de T-ALL.....	96
10.6. Implicaciones terapéuticas.....	97
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>99</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>101</b>
1. Ratones.....	102
2. Extracción de órganos linfoides primarios.....	102
3. Cultivo de líneas celulares leucémicas murinas y humanas y de células primarias de ratón.....	103
4. Tratamiento de las células con activadores e inhibidores de señalizaciones celulares.....	104
5. Inducción de la diferenciación de timocitos DN3 a DP in vivo en ratones <i>Rag2</i> <sup>-/-</sup> .....	104
6. Transducciones virales.....	105
7. Cuantificación de los transcritos celulares: PCR cuantitativa mediada por transcripción inversa (RT-qPCR) .....	107
8. Inmunoprecipitación de cromatina cuantitativa (qChIP).....	108
9. Construcción de plásmidos reporteros.....	110
10. Ensayos de actividad de luciferasa.....	111
11. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética.....	112
12. Análisis y separación de poblaciones celulares mediante citometría de flujo.....	114
13. Análisis estadístico.....	115
14. Tabla con las secuencias de oligonucleótidos.....	115

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>118</b>
1. La transcripción de los genes <i>Tcrd</i> y <i>Terg</i> depende del reclutamiento de RUNX1 Y MYB a E $\delta$ y E $\gamma$ durante el desarrollo de los timocitos.....	119
2. La señalización mediada por el pre-TCR controla el grado de reclutamiento de RUNX1 y MYB a E $\delta$ y E $\gamma$ en timocitos DN3a y DP.....	124
3. La regulación mutua entre la expresión de RUNX1 y MYB controla la transcripción de los genes <i>Tcrd</i> y <i>Terg</i> .....	128
4. La señalización mediada por la ruta de Notch induce la transcripción del gen <i>Runx1</i> en paralelo con la transcripción de los genes <i>Tcrd</i> y <i>Terg</i> durante la diferenciación de los timocitos.....	130
5. La señalización mediada por NOTCH1 activa E $\delta$ y E $\gamma$ .....	135
6. El reclutamiento de RUNX1 y de MYB a E $\delta$ y E $\gamma$ es dependiente de la señalización de Notch.....	143
7. El tratamiento con IL-7 induce la transcripción germinal del gen <i>Tcrd</i> .....	144
8. La señalización mediada por IL-7 activa E $\delta$ .....	145
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>151</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>154</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>162</b>
<b>PUBLICACIONES.....</b>	<b>200</b>





## Resumen

Durante el desarrollo de las células T, los progenitores de células T progresan a través de diferentes poblaciones de timocitos que se distinguen en base a la expresión de los marcadores de superficie CD4 y CD8: timocitos CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (DN), simples positivos inmaduros (ISP) CD8<sup>+</sup> en ratón y CD4<sup>+</sup> en humanos, timocitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> dobles positivos (DP) y CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> simples positivos (SP). Los timocitos están expuestos a diferentes señales que hacen posible su desarrollo hacia células T maduras. Los timocitos DN van progresando a través de distintos estadios, DN1 a DN4. Durante las primeras etapas de la maduración de los timocitos, la señalización de Notch promueve el desarrollo de los timocitos DN1 a timocitos DN3a, comprometiendo a estos progenitores hacia el linaje de células T, mientras que la señalización de la interleuquina 7 (IL-7) es esencial para la supervivencia y la protección celular frente a la apoptosis de los timocitos DN2 y DN3a. La generación de los linfocitos T αβ y T γδ depende de la recombinación de los segmentos génicos V, (D) y J presentes en los genes *Tcra*, *Tcrb*, *Tcrg* y *Tcrd* durante el desarrollo de los timocitos, hecho que da lugar a la expresión de receptores de antígenos funcionales, TCRαβ o TCRγδ, en la membrana celular. La recombinación V(D)J de los genes *Tcrg* y *Tcrd* se completa en los timocitos DN2 y DN3a, del gen *Tcrb* en los timocitos DN3a y del gen *Tcra* en los timocitos DP. Los reordenamientos correctos de los genes *Tcrg* y *Tcrd* permiten la expresión de un TCRγδ que induce a la diferenciación de los timocitos DN3a hacia linfocitos T γδ, en un proceso conocido como selección-γδ. Si tienen lugar reordenamientos exitosos en el gen *Tcrb* en timocitos DN3a, tiene lugar la expresión de un pre-TCR formado por el ensamblaje de una cadena TCRβ con una cadena invariable denominada pre-Tα. La señalización transducida por el pre-TCR junto a las captadas por los receptores de Notch e IL-7, activan la diferenciación de DN3a a DP, pasando por los estadios DN4 y ISP, en un proceso conocido como selección-β. Los reordenamientos exitosos en el gen *Tcra* en timocitos DP tienen como consecuencia la expresión de una cadena TCRα que se asocia con la TCRβ previamente expresada para formar un receptor de antígeno TCRαβ. La expresión de un TCRαβ en timocitos DP posibilita los eventos de selección positiva y negativa que permiten la supervivencia de unos pocos timocitos DP que diferenciarán hacia timocitos SP CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> para que migren a la periferia como linfocitos Tαβ maduros.

Los genes *Tcrd* y *Tcrg* muestran programas de desarrollo idénticos que dependen de la actividad de los potenciadores transcripcionales (*enhancers*) Eδ y Eγ, que están “activados” en timocitos DN2-3a para activar la transcripción y la recombinación V(D)J de los genes no reordenados y “inactivados” en timocitos DP para evitar la transcripción y expresión

de las cadenas TCR $\delta$  y TCR $\gamma$  en linfocitos T  $\alpha\beta$ . La actividad de E $\delta$  y E $\gamma$  depende de la unión de factores de transcripción (FT) a sitios de unión para factores de las familias Runx y Myb, que ocurre de forma paralela a la de la señalización de Notch. Durante la realización de esta tesis se hemos realizado experimentos de ganancia y pérdida de función de Notch y hemos identificado que la señalización de Notch activa la transcripción no codificante (o transcripción germinal) de los genes *Tcrd* y *Tcrg* al favorecer el reclutamiento de RUNX1 y MYB a sus *enhancers* en timocitos DN3a, antes de sufrir la selección- $\beta$ . Estos resultados indican que la disociación de RUNX1 y MYB de E $\delta$  y E $\gamma$  en timocitos DP resulta en la inactivación de estos *enhancers* y ocurre como consecuencia del descenso de la señalización de Notch desencadenada por la señalización del pre-TCR durante la selección- $\beta$ . Por tanto, nuestros datos revelan el mecanismo molecular del silenciamiento de los genes *Tcrd* y *Tcrg* mediado por la selección- $\beta$ . Además, estos resultados revelan un nuevo mecanismo molecular para la regulación génica a través de la señalización de Notch mediado a través del reclutamiento de RUNX1 y MYB a la cromatina de los *enhancers* que puede ser utilizado en el control transcripcional de otros genes regulados negativamente durante la transición de los timocitos DN3a a DP a través de la selección- $\beta$ .

La señalización del receptor de IL-7 (IL-7R) está mediada por el FT STAT5 y desempeña un papel clave en procesos tan importantes como la supervivencia de los timocitos en sus etapas más tempranas del desarrollo durante los estadios DN y la diferenciación de las células T  $\gamma\delta$ . Este último efecto ocurre a través de la activación de los transcritos germinales y la recombinación V $\gamma$ J $\gamma$  del gen *Tcrg*. En relación a esta señalización, nuestros datos indican que además de ser importante para la regulación del gen *Tcrg*, tiene una influencia positiva en la actividad de E $\delta$  y en consecuencia en la transcripción del gen *Tcrd*.

En resumen, el trabajo desarrollado en esta tesis doctoral, muestra una regulación común para E $\delta$  y E $\gamma$ , dependiente de las señalizaciones mediadas por Notch e IL-7R, a través del reclutamiento de los FT RUNX1, MYB y STAT5 en timocitos DN2 y DN3a, siendo ambos *enhancers* inhibidos durante la selección- $\beta$  debido a una drástica bajada de estas señalizaciones, lo que conlleva a la disociación de dichos FT. Estos resultados han revelado el mecanismo molecular para el silenciamiento de los genes *Tcrg* y *Tcrd* durante la selección- $\beta$  y aportan una nueva vía para el control transcripcional mediada por la señalización de Notch a través de la regulación del reclutamiento de estos RUNX1 y MYB a *enhancers* durante el desarrollo de los timocitos.



## **Abreviaturas**

2-ME, 2-mercaptoetanol.

3C, *chromosome conformation capture*, captura de la conformación cromosomal.

4C, *circular chromosome conformation capture*, captura circular de la conformación. cromosomal.

Ab, *Antibody*, anticuerpo.

ADAM, *A Disintegrin And Metalloproteinase*, familia de metaloproteinasas.

ADN, ácido desoxirribonucleico.

ALL, *Acute Lymphoblastic leukemia*, leucemia linfoblástica aguda.

ANK, *ANKirin*, anquirina.

APC, *Allophycocyanin*, alofococianina.

AP-1, *Activation Protein 1*, familia de FT.

APH-1, *Anterior PHarynx defective-1*, subunidad reguladora de  $\gamma$ -secretasa .

ARN, ácido ribonucleico.

ATP, adenosina trifosfato.

EB, Elementos Barrera.

bHLH, *basic Helix-Loop-helix*, básica hélice-lazo-hélice (estructura de DBD).

$\beta$ tg, transgén TCR $\beta$ .

bZIP, cremallera de leucinas.

C $\alpha$ , region constante del gen *Tcra*.

C $\beta$ , region constante del gen *Tcrb*.

cbEGF, Ca<sup>2+</sup> binding EGF, EGF que une Ca<sup>2+</sup> .

CBP, *CREB Binding Protein*, acetilasa de histonas.

CCL, *Chemokine C-C Ligand*, quimioquinas C-C.

CCR, *Chemokine C-C Receptor*, receptor de quimioquinas C-C.

C $\delta$ , region constante del gen *Tcrd*.

CDK8, *Cyclin Dependent Kinase 8*, quinasa implicada en la degradación de ICN.

cDNA, *complementary DNA*, ADN complementario.

CDR, *Complementary Determinant Region*, región variable de las cadenas de receptor de antígeno.

C $\gamma$ , region constante del gen *Tcrg*.

ChIP, *Chromatin Immunoprecipitation*, inmunoprecipitación de cromatina.

CK1, Casein Kinase 1, quinasa implicada en la degradación de  $\beta$ -catenina.

CIR, *CBF1 Interacting Repressor*, represor reclutado por RBPJ $\kappa$ .

CLP, *Common Lymphoid Progenitors*, progenitores comunes linfoides.

CMP, *Common Myeloid Progenitors*, progenitores comunes mieloides.

cpm, cuentas por minuto.

CRC, circuito regulador central.

CSL (CBF1, Suppressor of Hairless, LAG-1), RBPJ $\kappa$ .

CtBP, *C terminal Binding Protein*, represor reclutado por RBPJ $\kappa$ .

CTCF, CCCTC binding Factor, FT implicado en la formación de lazos de cromatina.

ESC, *Embryonic Stem Cells*, células madre embrionarias.

ETP, *Early Thymic Progenitors*, progenitores tímicos tempranos.

D, Diversidad, segmento génico de los genes de receptor de antígeno.

DAG, *DiAcyl Glycerol*, diacilglicerol, molécula de señalización del TCR.

DBD, *DNA Binding Domain*, dominio de unión a ADN.

DEPC, dietilpirocarbonato.

DL, *Delta-Like*, familia de ligandos de NOTCH.

DMT, *DNA Methyl Transferases*, metil-transferasas de ADN.

DN, dobles negativos.

DNAPK, *DNA-dependent Protein Kinase*, quinasa dependiente de ADN involucrada en la reparación de ADN y la recombinación V(D)J.

DNMAML1, *Dominant Negative MAML1*, dominante negativo de MAML1.

dNTPs, 2'-desoxinucleótidos-trifosfato.

DP, dobles positivos.

DSL, Delta Serrate Lag2, dominio extracelular de los ligandos de NOTCH.

DTT, ditionitritol.

E, día embrionario n<sup>o</sup>.

eDP, *early DP*, DP tempranos.

E $\alpha$ , *Enhancer* del gen *Tcra*.



E $\beta$ , *Enhancer* del gen *Tcrb*.

E $\delta$ , *Enhancer* del gen *Tcrd*.

E $\gamma$ , *Enhancer* del gen *Tcrg*.

EGF, *Epidermal Growth Factor*, factor de crecimiento epidérmico.

EGR, *Early Growth Response factors*, familia de FT.

EMSA, *Electrophoretic Mobility Shift Assay*, ensayo de retardo de la movilidad electroforética.

ERK, *Extracellular signal regulated protein Kinase*, quinasas implicada en la señalización por receptores de membrana.

ETS1, *E26 Transformation Specific 1*, miembro de la familia de TFs ETS.

FBS, *Fetal Bovine Serum*, suero fetal bovino.

FITC, *Fluorescein Isothiocyanate*, isotiocianato de fluoresceína.

FLT3L, *Fms-Like Tyrosine-kinase Ligand*, Ligando de la tirosina quinasa similar a Fms.

FT, factor de transcripción.

$\gamma$ c, gamma common, cadena  $\gamma$  común de receptores de la familia de IL-2.

GFP, *Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente.

GMP, *Granulocytic Myeloid Progenitors*, progenitores granulocíticos y mieloides.

GSI, *Gamma Secretase Inhibitors*, inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa.

GSK-3 $\beta$ , *Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$* , quinasa implicada en la degradación de  $\beta$ -catenina.

H3K4me3, trimetilación de la lisina 4 de la histone H3.

HAT, *Histone Acetyl Transferases*, acetilasas de histonas.

HBSS, *Hank's Balanced Salt Solution*, solución tampon de Hank.

HD, *HomeoDomain*, homeodominio.

HDAC, *Histone DeAcetylases*, desacetilasas de histonas.

HDM, *Histone DeMethylases*, demetilasas de histonas.

HiC, captura de la conformación de la cromatina a nivel global.

HMG, *High Mobility Group*, familia de proteínas de alta movilidad invocadas en cambios de la conformación de la doble hélice del ADN.

HSC, *Hematopoietic Stem Cells*, células madre hematopoyéticas.

HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*, cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

HMT, *Histone Methyl Transferases*, metil-tranferasas de histonas.

HS, *Hypersensitivity Site*, sitio de hipersensibilidad a la digestión por ADNasaI.

HSA, *HyperSensitive A*, enhancer presente en el locus *Tcrg*.

ICAM-I, *InterCellular Adhesion Molecule 1*, ligando de integrinas.

ICN, *IntraCellular NOTCH*, NOTCH intracelular.

Ig, inmunoglobulinas.

IKK,  $\text{I}\kappa\text{B}$  Kinase, quinasa implicada en la señalización mediada por  $\text{NF}\kappa\text{B}$ .

IL-7, interleuquina 7.

IL-7R, *IL-7 Receptor*, receptor de IL-7.

IL-7R $\alpha$ , cadena  $\alpha$  del IL-7R.

iNKT, *invariant Natural Killer T cells*, células NK-T invariables.

IP3, *Inositol Phosphate 3*, inositol 1,4,5-trifosfato, molécula de señalización del TCR.

ISP, *Immature Simple Positives*, simples positivos inmaduros.

ITAM, *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Domain*, dominio implicado en la señalización mediada por CD3.

J, *Joining*, segmento génico de los genes de receptor de antígeno.

J $\alpha$ 49p, promotor del segmento J $\alpha$ 49.

JAK, *Janus kinases*, familia de quinasas implicada en la señalización de IL-7.

JNK, *Jun N-terminus kinase*, quinasas implicadas en la señalización mediada por AP-1.

Kb, kilobase.

LAT, *Linker for Activation of T cells*, proteína adaptadora implicada en la señalización por el TCR.

LCR, *Locus Control Region*, región controladora de un locus.

LCK, *Lymphoid Cell Kinase*, quinasa implicada en la señalización del TCR.

LMPP, *LymphoMyeloid Progenitors*, progenitores linfomiéloides.

IDP, *late DP*, DP tardíos.

LEF, *Lymphoid Enhancer binding Factor*, familia de FT.

LNR, *Lin12 Notch Region*.

MAML, *MAsterMind Like*, familia de coactivadores del complejo RBPJ $\kappa$  e ICN.

MAPK, *Mitogen Activated Protein Kinasa*, familia de quinasas asociada a activación de receptores.

Mb, megabases.

MBD, *Methyl Binding Domain*, dominio de unión a grupos metilo.

MEP, *Myeloid Erythroid Progenitors*, progenitores mieloides y eritroides.

MHC, *Major Histocompatibility Complex*, complejo principal de histocompatibilidad.

MINT, *MSX2 Interacting Nuclear Target*, correpresor transcripcional.

MPP, *MultiPotent Progenitors*, progenitores multipotentes.

NCoR, *Nuclear receptor CoRepressor*, represor reclutado por RBPJ $\kappa$ .

NEXT, NOTCH EXtracellullar Truncation, NOTCH anclada a la membrana sin la parte extracelular.

NFAT, *Nuclear Factor of Activated T cells*, familia de FT.

NF $\kappa$ B, *Nuclear Factor potentiator of Ig kappa chain in activated B cells*, FT.

NK, *Natural Killer*, asesinas naturales.

NK-T, *Natural Killer T*, asesinas naturales T.

NLS, *Nuclear Localization Sequence*, secuencia de localización nuclear.

NP-40, Nonidet P-40.

NRARP, *NOTCH Regulated Ankyrin Repeat Protein*, inhibidor de la ruta de Notch.

NRR, *Negative Regulatory Region*, región reguladora negativa.

NS, no estimuladas o no tratadas.

pb, pares de bases.

PBS, *Phosphate Buffered Saline*, Tampón fosfato salino.

PCAF, *P300 and CBP Associated Factor*, acetilasa de histonas.

PCR, *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.

PK1, *3'Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*, quinasa implicada en la señalización del TCR.

PE, *Phycoerithrin*, ficoeritrina.

PEN-2, *Presenilin ENhancer-2*, subunidad reguladora de  $\gamma$ -secretasa.

PEST, dominio rico en prolina, ácido glutámico, serina y treonina, relevante en degradación.

PIP2, *PhosphoInositol Phosphate 2*, fosfatidil inositol 4,5 bifosfato, molécula de señalización por el TCR.

PKC, *Protein Kinase C*, quinasa implicada en la señalización del TCR.

PLC $\gamma$ , 3'PhosphoLipase  $\gamma$ , fosfolipasa implicada en la señalización del TCR.

PMA, *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*, miristato acetato de forbol - agente activador de la PKC.

PMA+I, PMA + ionomicina.

PMSF, PhenylMethylSulfonyl Fluoride, fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PSGL-1, *P-Selectine Glycoprotein Ligand-1*, ligando de P-selectina-1.

qChIP, *quantitative* ChIP, ChIP cuantitativo.

qPCR, *quantitative* PCR, PCR cuantitativa.

RAG, *Recombination Activating Gene*, endonucleasa de la recombinación V(D)J.

RAM, *RBPJ $\kappa$  Association Module*, módulo de ICN1 de reconocimiento de RBPJ $\kappa$ .

RBPJ $\kappa$ , *immunoglobulin J $\kappa$  gene segment Recombination Protein*, FT clave en la ruta de Notch.

RHD, *Runt Homology Domain*, dominio que incluye el DBD y la región de reclutamiento de CBF $\beta$  en los FT RUNX .

ROR $\gamma$ t, *Retinoic acid-related Orphan Receptor  $\gamma$  of T cells*, FT implicado en selección-b.

RNApol2, *RNA polymerase 2*, ARN polimerasa 2.

rpm, revoluciones por minuto.

RT-qPCR, *Retro-Transcriptase-mediated qPCR*, qPCR mediada por transcriptasa reversa.

SDS, *Sodium Dodecyl Sulfate*, dodecil sulfato sódico.

SE, *superenhancer*.

shRNA, small hairpin RNA, pequeños ARN de doble cadena en forma de horquilla.

SKIP, *SKi Interacting Protein*, represor reclutado por RBPJ $\kappa$ .

SLP-76, *SH2-domain containing Leukocyte Protein of 76 KDa*, proteína adaptadora implicada en la señalización del TCR.

SMRT, *Silencing Mediator of Retinoic Acid*, represor reclutado por RBPJ $\kappa$ .

SP, *Simple Positive*, simples positivos.

RSS, *Recombination Signal Sequence*, secuencia señal de recombinación V(D)J.

STAT, *Signal Transducer and Activator of Transcription*, transductoras de señal y activadoras de transcripción.

SYK, *Spleen Tyrosin Kinase*, quinasa implicada en la señalización del TCR.

TAD, *Topologically Associated Domain*, dominio de asociación topológico.

TD, *Transactivation Domain*, dominio de transactivación.

TCF, *T Cell Factor*, familia de FTs.

TCR, *T Cell Receptor*, receptor de linfocitos T.

TdT, *Terminal dinucleotide Transferase*, transferasa terminal de dinucleótidos, enzima involucrada en la recombinación V(D)J.

TEA, *T Early  $\alpha$  promoter exon*, exon situado 5' de los segmentos J $\alpha$ .

TEAp, *T Early  $\alpha$  promoter*, promotor situado 5' de los segmentos J $\alpha$ .

TEC, *Thymic Epithelial Cells*, células epiteliales del timo.

TK, *Thymidine Kinase*, timidina quinasa.

Th, *T helper*, células T ayudadoras.

TLE, *Transducing-Like Enhancer*, correpresor transcripcional.

Treg, células T reguladora.

TSP, *Thymus Settling Progenitors*, progenitores colonizadores del timo.

V, Variable, segmento génico de los genes de receptor de antígeno.

VCAM-1, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*, ligando de integrinas.

## **Introducción**

## 1. Organización de la cromatina

### 1.1. Niveles de compactación

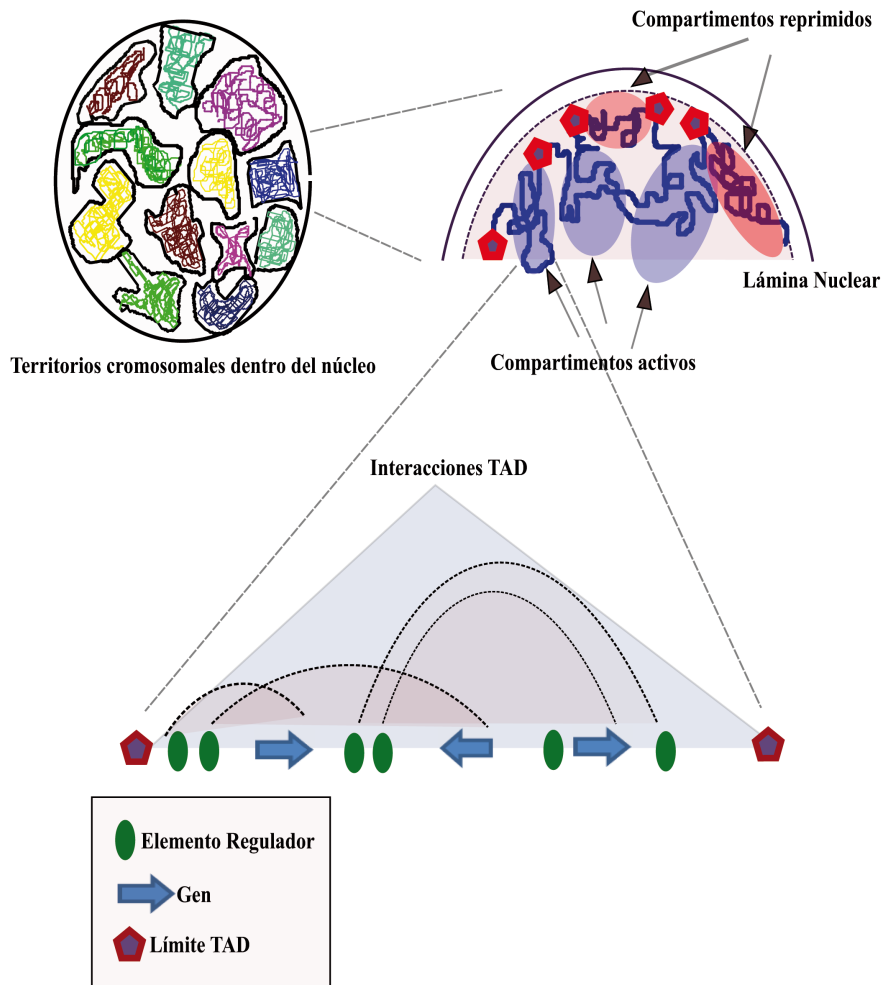
Los genomas eucariotas están empaquetados para solucionar el problema de espacio que supone almacenar 2 metros de ADN dentro del núcleo celular y permitir de forma simultánea la transcripción y la replicación<sup>1</sup>. La cromatina puede adquirir dos configuraciones distintas, denominadas eucromatina y heterocromatina, según puede visualizarse por microscopía electrónica<sup>2,3,4</sup>. La eucromatina tiene una arquitectura laxa o menos compactada formando grandes lazos, que se corresponde con regiones del ADN transcripcionalmente activas, por estar expuestas a la acción de la maquinaria de transcripción. Dentro de la eucromatina se distingue la denominada eucromatina constitutiva, la cual contiene los genes más importantes para el mantenimiento celular. La heterocromatina corresponde a la cromatina más condensada, que constituye alrededor del 10-20 % del total e incluye a los genes que no se expresan. Dentro de la heterocromatina se distinguen la heterocromatina facultativa, que se caracteriza por incluir a genes silenciados que pueden transcribirse tras una remodelación, y la heterocromatina constitutiva, que se ubica en la periferia nuclear asociada a la lámina nuclear y contiene genes permanentemente silenciados. La asociación de la cromatina con la membrana nuclear tiene efectos represivos sobre la transcripción<sup>5</sup>. Dicha asociación está regulada a través de unos dominios de ADN de asociación a la lámina nuclear (*Lamin-Associated Domains*, LAD)<sup>6</sup>, los cuales tienen una regulación dinámica durante la diferenciación celular<sup>7,8</sup>.

El ADN correspondiente a los distintos cromosomas se encuentra organizado en regiones nucleares denominados territorios cromosómicos, de forma que cada cromosoma ocupa una posición estereotipada dentro el núcleo<sup>4,9</sup> (Figura 1). Este ADN tiene un empaquetamiento adicional dando lugar a los llamados compartimentos A y B, los cuales comprenden desde decenas de kilobases (Kb) a pocas megabases (Mb) y están formados por cromatina activa e inactiva, respectivamente, y están definidos por estados epigenéticos similares. Los compartimentos A y B pueden establecer contactos intra- e inter-cromosómicos con otros compartimentos del mismo tipo.

Mediante tecnologías derivadas de la captura de conformación cromosomal (*Chromosome Conformation Capture*, 3C), en las cuales las interacciones del ADN que ocurren *in vivo* entre secuencias conocidas, en el caso de 3C, o desconocidas, en el caso de 4C o HiC, son atrapadas mediante entrecruzamientos químicos con formaldehído, se ha observado que

el genoma se encuentra compartimentalizado en dominios de alrededor de 1 Mb llamados dominios de asociación topológica (*Topological Association Domains*, TAD)<sup>10,4,11,12,13,14</sup> (Figura 1). Un TAD se caracteriza porque las regiones dentro del mismo interactúan físicamente entre sí con más frecuencia que con regiones fuera del TAD. Estructuralmente los TAD están delimitados por regiones enriquecidas en genes constitutivos (*housekeeping*) o tRNA, pero más frecuentemente por sitios para el factor de unión a la secuencia CCCTC (*CCCTC binding Factor*, CTCF). CTCF es un factor ubicuo muy conservado con múltiples funciones, incluyendo activación y represión transcripcionales, y la capacidad de aislar a un promotor de la influencia de un potenciador transcripcional (*enhancer*)<sup>15</sup>. Los límites o bordes de los TAD permanecen invariables entre distintos tipos celulares y muestran una gran conservación evolutiva entre distintas especies. Las evidencias experimentales indican que los TAD regulan la probabilidad de contacto entre *enhancers* y promotores transcripcionales dentro un mismo TAD, ya que al delecionar el límite entre dos TAD se generan contactos entre regiones previamente aisladas dando lugar a una expresión génica aberrante que deriva en enfermedades como cáncer y problemas en el desarrollo<sup>4</sup>. Aunque la mayoría de los TAD exhiben una estructura fija, se ha observado en muchos de ellos un fenómeno que se conoce como extrusión consistente en que la cromatina presente entre los dos límites de un TAD (o elementos barrera, EB) se desliza permitiendo el escaneo de las interacciones entre las secuencias presentes en dicho lazo. Este efecto ocurre a través de la acción de un factor de extrusión, que normalmente consiste en un anillo de complejos de cohesina y condensina reclutados a los EB a través de su unión a CTCF<sup>16</sup>. El proceso de extrusión permite el contacto físico de las regiones delimitadas por los dos EB, mientras que al mismo tiempo se restringen las interacciones más allá de estos puntos. Así los complejos de cohesina y condensina están implicados en la cohesión de las cromátidas durante la división celular mediante la formación de un anillo alrededor de las dos hebras de ADN recién replicadas<sup>17</sup>, mientras que en la interfase, estos complejos participan en la organización del genoma mediante su reclutamiento a CTCF en aproximadamente el 70% de los sitios donde CTCF se encuentra unido al ADN, siendo necesarios para la formación de los lazos de cromatina y el aislamiento funcional de regiones génicas<sup>18,19,20,21,22</sup>.





**Figura 1. Organización del ADN en los cromosomas.** El ADN se organiza a mayor escala en territorios cromosomales (arriba a la izquierda). Dentro de estos territorios cromosomales, en un nivel mayor de empaquetamiento mayor, se detecta una organización en compartimentos A y B (arriba a la derecha). Estos compartimentos están caracterizados por su estado epigenético, existiendo compartimentos de cromatina activa (círculos azules) e inactiva (círculos rojos). Los EB (pentágonos rojos) limitan unos compartimentos de otros. En una escala más resolutive se encuentran los TAD (triángulo gris), donde tienen lugar interacciones (arcos) entre genes (flechas azules) y elementos reguladores (círculos verdes). Estos TAD se encuentran bien delimitados por genes constitutivos, tRNA o sitios de unión para CTCF formando los EB (pentágonos rojos).

Por último, la compactación del ADN en la escala de menor tamaño consiste en la organización del genoma en nucleosomas, los cuales constituyen la subunidad básica de la cromatina<sup>23</sup>. La estructura de los nucleosomas está muy conservada en la evolución y consiste en un segmento de ADN de 146 pares de bases (bp) y dos copias de cada uno de los cuatro tipos de histonas H2A, H2B, H3 y H4 (Figura 2). También se considera parte de esta estructura al pequeño fragmento de ADN de 40-80 pb que separa un nucleosoma de otro, que dota a la cromatina de una mayor flexibilidad, y al que se le une la histona H1, favoreciendo la unión entre nucleosomas próximos, contribuyendo a una mayor compactación de la cromatina.

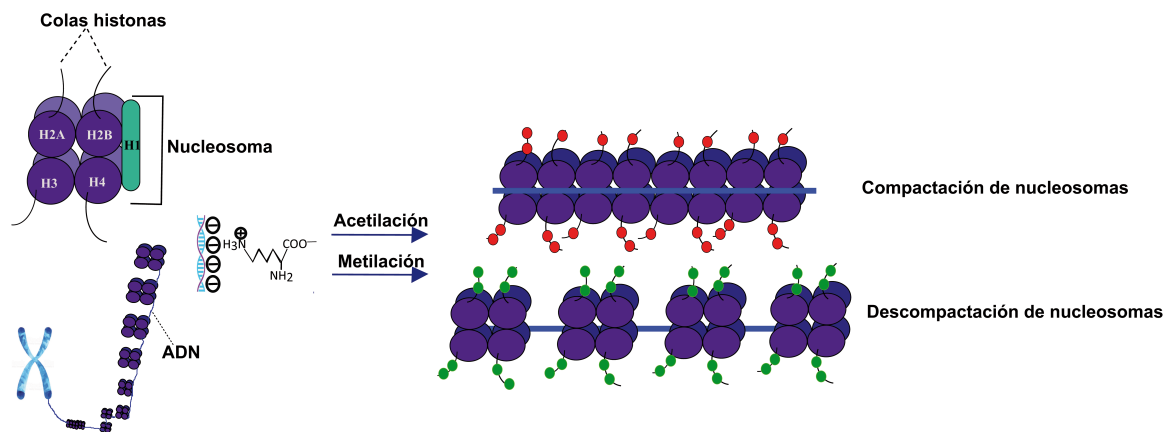
## 1.2. Epigenética

El término epigenética se refiere a las alteraciones heredables de la estructura de la cromatina que determinan la expresión génica de las células, más allá de la secuencia del genoma. Este término fue acuñado por Conrad Waddington en 1942<sup>24</sup>. Entre los mecanismos epigenéticos más relevantes para la regulación génica destacan la metilación de las citosinas y las modificaciones covalentes de las histonas<sup>25,23,26</sup>. Estas modificaciones son las que permiten la diferenciación de las células de un organismo desde una célula madre embrionaria (*Embryonic Stem Cell*, ESC) para dar lugar a los distintos tejidos y órganos, teniendo todas ellas la misma secuencia en su ADN, y también están relacionadas con transformaciones celulares que resultan en cáncer.

Un alto nivel de metilación se asocia con el silenciamiento génico<sup>26</sup>. En general, este proceso ocurre en las llamadas islas CpG, regiones con alta concentración de citosinas y guaninas, que se encuentran en algunos promotores. Este proceso ocurre por acción de las ADN metil-transferasas (*DNA Methyl Transferases*, DMT), las cuales se encargan de mantener los patrones de metilación específicos de las células. En mamíferos, aproximadamente un 70% de las CpG están metiladas. Este proceso se correlaciona generalmente con el silenciamiento génico. La metilación del ADN afecta a la capacidad de unión de los factores de transcripción (FT) a regiones reguladoras y a la estabilidad de los nucleosomas. El silenciamiento inducido por la metilación de CpG ocurre por la inhibición directa de la unión de los FT al ADN o el reclutamiento de proteínas represoras que contienen un dominio de unión a grupos metilo (*Methyl Binding Domain*, MBD). El silenciamiento génico de determinados genes supresores de tumores por este mecanismo está asociado con cáncer.

Los nucleosomas constituyen elementos dinámicos de compactación y descompactación de la cromatina al estar expuestos a una serie de modificaciones covalentes de las histonas mediados por determinados enzimas reclutados a la cromatina<sup>25,23</sup>. Estos cambios ocurren en residuos de lisina, arginina y serina de los extremos amino-terminales de las histonas, e incluyen metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación y sumoilación, dando lugar a lo que se conoce como “código de las histonas”<sup>27</sup> (Figura 2). Dentro de estas modificaciones se han descrito mono-, bi- y tri-metilación de lisinas, acetilación de lisinas, fosforilación de serinas, metilación de argininas y ubiquitinación de lisinas, siendo las más estudiadas la metilación y la acetilación.

El estado de acetilación de las histonas en los nucleosomas es muy dinámico y está regulado por dos grupos de enzimas que funcionan de forma opuesta: las acetiltransferasas de histonas (*Histone Acetyl Transferases*, HAT) que se encargan de acetilar a las histonas y las deacetilasas de histonas (*Histone DeAcetylases*, HDAC) que causan su desacetilación. De la misma forma, el estado de metilación de las histonas está regulado por dos familias de enzimas: las metiltransferasas de histonas (*Histone Methyl Transferases*, HMT) y las demetilasas de histonas (*Histone DeMethylases*, HDM)<sup>28,29</sup>. La acetilación de histonas actúa mediante la neutralización de la carga positiva de las histonas en el nucleosoma, disminuyendo la unión entre éstas y el ADN cargado negativamente, dando lugar a que la molécula de ADN quede más libre, favoreciendo procesos como su transcripción génica o replicación<sup>27</sup>. Las funciones de la metilación de histonas en la estructura de la cromatina y en la transcripción génica son diversas. Las HMT catalizan la transferencia de uno, dos o tres grupos metilo a los residuos de arginina o lisina y, de forma contraria, las demetilasas eliminan los grupos metilo<sup>28</sup>. La metilación de histonas contribuye a la regulación de la estructura de los nucleosomas actuando junto a otros remodeladores de cromatina. A diferencia de la acetilación de histonas, la metilación no cambia el estado eléctrico de las histonas, y por tanto, no altera la unión histonas-ADN, pero interfiere en la interacción entre la cromatina y los FT<sup>30,31</sup>.



**Figura 2. Nucleosomas y marcas de histonas.** Los nucleosomas constituyen la unidad básica de la cromatina y constan de un fragmento de ADN de 146 pb y dos copias de cada uno de los tipos de histonas H2A, H2B, H3 y H4. También se considera parte de la estructura del nucleosoma al segmento de ADN de 40-80 pb que separa un nucleosoma de otro donde se une la histona H1 (ilustración de la izquierda). Las histonas están expuestas a modificaciones en sus extremos amino-terminales o “colas” (ilustración de la derecha). Entre las posibles modificaciones, la metilación y la acetilación son las más frecuentes. Normalmente la acetilación de residuos de las histonas (indicada en verde) está relacionada con una descompactación de los nucleosomas y una transcripción activa, mientras que la metilación (indicada en rojo) actuará de forma diferente dependiendo de los residuos implicados dando lugar a una cromatina más o menos compacta.

Las regiones de heterocromatina son inaccesibles a la maquinaria de transcripción y están caracterizadas por bajos niveles de acetilación y altos niveles de metilación en algunos residuos como en las lisina 9 y 27 de la histona H3 (H3K9 y H3K27) y la lisina 20 de la histona H4 (H4K20). Por el contrario, la eucromatina activa transcripcionalmente destaca por una alta hiperacetilación y por la trimetilación de las lisinas 4, 36 y 79 de la histona H3, (H3K4me3, H3K36me3 y H3K79me3).

### **1.3. Complejos remodeladores de la cromatina**

El proceso de remodelación de la cromatina implica la modificación dinámica de la arquitectura de la cromatina para permitir el acceso de la maquinaria de transcripción a través del ADN genómico para el control de la expresión génica<sup>32,33</sup>. A diferencia de las modificaciones de histonas, las cuales no requieren energía, la remodelación de la cromatina es un proceso dependiente de energía, en el cual los complejos remodeladores necesitan energía para cambiar la estructura del nucleosoma<sup>34</sup>. Los complejos remodeladores de la cromatina pueden cambiar la compactación del ADN genómico incorporando nuevas histonas al nucleosoma o eliminando histonas ya presentes en los nucleosomas, siendo capaces de mover, eliminar o reestructurar los nucleosomas. Estos complejos tienen una actividad ATPasa que requiere el consumo de ATP, captando una energía que permite el reposicionamiento de los nucleosomas a lo largo del ADN, mediante la eliminación de histonas o facilitando el intercambio de diferentes tipos de histonas. De esta manera se induce la aparición de regiones libres de nucleosomas que facilitan la activación génica. En células eucariotas existen al menos cinco complejos capaces de remodelar la cromatina: SWI/SNF, ISWI, NuRD/Mi-2/CDH, INO80 y SWR1, siendo los dos primeros los mejor estudiados. Estos complejos son importantes durante la reparación, replicación y transcripción génicas.

## **2. Elementos reguladores de la transcripción génica**

### **2.1. *Enhancers***

Los *enhancers* son elementos reguladores constituidos por cortas secuencias de ADN que actúan en *cis*, incrementando la transcripción génica<sup>35,36</sup>. Estas secuencias actúan como una plataforma para el ensamblaje cooperativo de determinados FT, dando lugar a una estructura denominada “*enhanceosoma*”. Pueden llevar a cabo su función de manera independiente de su orientación y de la distancia al promotor (o promotores) que regula(n). La actividad de los *enhancers* suele estar restringida a un tejido o tipo celular, un momento deter-

minado o a ciertas condiciones fisiológicas, patológicas o ambientales. La identificación de los *enhancers* es un desafío debido a que suelen estar localizados a grandes distancias del gen que regula, en la zona 3', 5' o dentro de intrones<sup>35</sup>. De hecho, en ocasiones, se encuentran a varios cientos de Kb o incluso Mb de distancia de su promotor específico. Otra razón que complica su identificación es que tienen unas secuencias muy variables, lo que dificulta su búsqueda computacional. Se han desarrollado varias técnicas para identificar y evaluar la actividad de elementos reguladores dentro de su contexto endógeno, derivadas de las ya conocidas técnicas de hipersensibilidad a la digestión por enzimas, como la DNaseI, e inmunoprecipitación de cromatina (*Chromatin ImmunoPrecipitation*, ChIP), que pueden asociarse a la secuenciación de última generación (seq) dando lugar a DNase-seq o ChIP-seq, permitiendo mapear la presencia de los *enhancers* en el genoma global. Además se han sumado otras técnicas como ATAC-seq, que permite identificar regiones abiertas de la cromatina, y técnicas derivadas de 3C, que permiten visualizar las interacciones físicas entre regiones distantes. La evaluación de la funcionalidad *in vitro* de los *enhancers* se suele realizar mediante transfecciones de construcciones con genes reporteros como el gen de la luciferasa de luciérnaga (LUC), mientras que la evaluación *in vivo* se realiza por mutación o delección de la secuencia del genoma o la expresión de genes reporteros como *lacZ* de *Escherichia coli* con actividad  $\beta$ -galactosidasa<sup>36</sup>.

Los complejos remodeladores de cromatina y las enzimas modificadoras actúan modulando la estructura de la cromatina de la región de influencia de un *enhancer*. De esta forma, los primeros se encargan de eliminar o cambiar de lugar nucleosomas creando regiones libres para el reclutamiento de FT, mientras que las enzimas modificadoras de histonas se encargan de establecer el patrón epigenético de un gen en un tipo celular y momento determinados<sup>37,38,39</sup>. Los mapas del estado de la cromatina obtenidos en estudios epigenéticos, han permitido establecer una clasificación de los estados funcionales diferentes de los *enhancer*<sup>40,41</sup>: los *enhancers* activos suelen tener elevados niveles de H3K27ac, mientras que los inactivos están generalmente enriquecidos en H3K27me3. También se ha definido un estado de activación preparado, “poised” o “primed”, a aquellos *enhancers* con un enriquecimiento simultáneo de la marca represiva H3K27me3 y de la activa H3K4me1 y suelen estar asociados con genes regulados durante el desarrollo que se expresan poco en ESC, pero están listos para su rápida activación cuando reciban las correspondientes señales de diferenciación<sup>42</sup>.

## 2.2. Promotores

Los promotores transcripcionales son secuencias de 100-1.000 pb en posición 5' del sitio de inicio de la transcripción que reclutan a la ARN polimerasa II (*RNA Polymerase 2*, RNAPol2) y determinan qué cadena de ADN va a ser transcrita (es decir, qué cadena es la cadena sentido) y en qué dirección se producirá la transcripción<sup>43,44</sup>. Además de la RNAPol2, los promotores reclutan una serie de factores de la iniciación y elongación de la transcripción, además de FT, que permiten el movimiento de la polimerasa a lo largo del gen y la iniciación del proceso de transcripción<sup>44</sup>. El llamado promotor mínimo consiste en el sitio de iniciación de la transcripción (*Transcription Start Site*, TSS) y unos pocos sitios situados 5' del mismo, entre los cuales destaca la denominada “caja TATA” situada alrededor de 30 pb 5' del TSS, donde se recluta la proteína de unión a TATA (*TATA-Binding Protein*, TBP). TBP constituye una subunidad del complejo general de transcripción llamado TFIID, el cual es el primer complejo reclutado al promotor durante la iniciación de la transcripción, ayudando a la RNAPol2 a localizar el TSS. Sin embargo, solo aproximadamente el 10-20% de los promotores humanos tienen caja TATA, por lo que otros factores y secuencias están también implicados en esta función. La unión de TFIID inicia el reclutamiento de otros complejos generales necesarios para comenzar la transcripción, tales como TFIIA, TFIIB y TFIIF, todos ellos formados por varias subunidades.

Para que un *enhancer* lleve a cabo su función, los FT unidos reclutan complejos remodeladores de cromatina y enzimas modificadoras de histonas, además de un complejo denominado “Mediador”, formado por la propia RNAPol2 y múltiples subunidades, que pone en contacto físico al *enhancer* con su promotor correspondiente<sup>45</sup>. La asociación entre *enhancers* y promotores a través del Mediador parece ser establecido a través del fenómeno universal de formación de fases líquido-líquido a través de la condensación de FT y coactivadores<sup>46</sup>.

## 3. Desarrollo de los linfocitos T

### 3.1. Etapas de diferenciación desde progenitores a linfocitos T

#### 3.1.1. Etapa pre-tímica

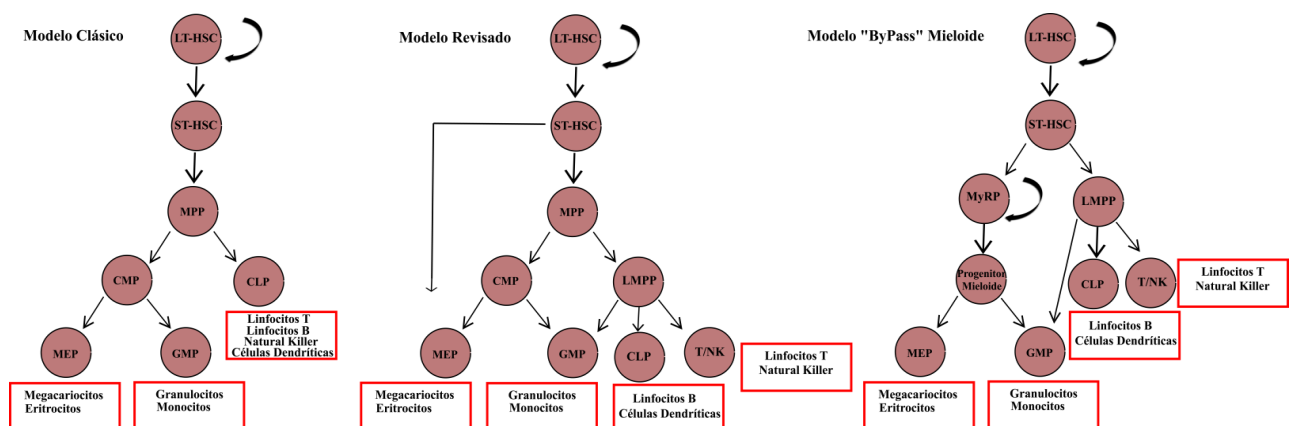
El mantenimiento de la producción de células sanguíneas a lo largo de la vida de un individuo es responsabilidad de unas células ubicadas en la médula ósea, denominadas células madre hematopoyéticas (*Hematopoietic Stem Cells*, HSC)<sup>47</sup>. Estas células tienen diversas

características propias, pero son dos las propiedades más reseñables. En primer lugar estas células son capaces de generar más HSC, en un proceso denominado auto-renovación. En segundo lugar, las HSC tienen el potencial para diferenciarse a varias células progenitoras que, a su vez, darán lugar a otros tipos celulares en función de determinadas rutas específicas. El resultado de esta capacidad de diferenciación es la producción continua de un suficiente, pero no excesivo, número de células de todos los linajes hematopoyéticos. Estas cualidades hacen que el trasplante de médula ósea sea un procedimiento de enorme utilidad clínica para la restitución de todos estos linajes.

En vertebrados la producción y diferenciación de las HSC o hematopoyesis ocurre en una variedad de localizaciones que van cambiando durante el desarrollo<sup>48</sup>. Durante la fase embrionaria de mamíferos, los sitios u órganos donde tiene lugar la hematopoyesis incluyen el saco vitelino, un área que rodea la aorta dorsal denominada región mesonefrosa aortagonadal, el hígado fetal y la médula ósea. Hace unos años también se reconoció la placenta como un órgano adicional para la hematopoyesis. En los individuos adultos, la hematopoyesis ocurre exclusivamente en la médula ósea. Las propiedades de las HSC presentes en cada localización difieren, es decir dependiendo del nicho donde se encuentren van a tener unas características intrínsecas distintas. Por ejemplo, las HSC presentes en el hígado fetal están constantemente diferenciándose, mientras que las HSC residentes en la médula ósea se encuentran en un estado quiescente<sup>49</sup>.

Así pues, las HSC son células multipotentes que reponen continuamente todos los tipos de células sanguíneas a través de una serie de pasos restringidos a cada linaje que conducen a células cada vez más diferenciadas y con un potencial más limitado. Las decisiones que toman las HSC para diferenciar a un tipo celular u otro dependen de la activación o inhibición de determinados FT pioneros que son específicos de cada linaje<sup>50</sup>. Los FT pioneros y restringidos de cada linaje se expresan en bajos niveles en las HSC y los progenitores multipotenciales (*MultiPotent Progenitors*, MPP), sugiriendo que los genes de dichos factores están preparados para la rápida inducción de su expresión durante la diferenciación. Además, un número significativo de HSC (30-60%) coexpresan FT asociados con linajes diferentes, sugiriendo que estas células están preparadas para poder activar distintos programas de diferenciación. Una característica de los FT pioneros es su capacidad de poder unirse a la cromatina condensada de *enhancers* empaquetados en nucleosomas, reclutando a otros FT y enzimas modificadoras de la cromatina.

A lo largo de los años se han establecido distintos modelos para entender la diferenciación de las HSC hacia los distintos linajes de células sanguíneas<sup>50</sup> (Figura 3). Los primeros estudios establecieron el denominado “modelo clásico”, en el cual las HSC dan lugar a los MPP, también conocidos como HSC de corto plazo, capaces de diferenciar hacia progenitores comunes mieloides (*Common Myeloid Progenitors*, CMP) y progenitores comunes linfoides (*Common Lymphoid Progenitors*, CLP), que a su vez pueden originar otros tipos celulares más específicos. En esta clasificación clásica, los CLP dan lugar a los linfocitos B y T, mientras que los CMP pueden diferenciar hacia dos ramas, originando progenitores mieloides y eritroides (*Myeloid Eritroid Progenitors*, MEP) y progenitores granulocíticos y monocíticos (*Granulocytic Monocytic Progenitors*, GMP). En los últimos años se ha comprobado que las poblaciones HSC y MPP son más heterogéneas de lo que se pensaba en un principio, estableciéndose que los MPP pueden dar lugar a progenitores de carácter linfomieloide (*LymphoMyeloid Progenitors*, LMPP), que han perdido el potencial para diferenciar hacia el linaje megacariocítico/eritroide, por lo que se ha revisado el modelo clásico. Este modelo revisado también establece que el linaje megacariocítico/eritroide, además de derivar de los MPP, puede también derivar directamente de las HSC. Más recientemente se ha establecido un nuevo modelo, denominado “modelo bypass-mieloide”, que apoya que los progenitores de los linajes mieloide y megacariocítico tienen capacidad de autorenovación y derivación hacia el linaje mieloide. Este modelo, a diferencia de los anteriores, apoya que la capacidad de multipotencialidad y la autorenovación deben ir acoplados.



**Figura 3. Modelos de desarrollo de células hematopoyéticas.** A la izquierda se representa el modelo clásico, en el cual las HSC dan lugar a MPP capaces de diferenciar hacia CMP (que originan progenitores mieloides, eritroides, granulocíticos y monocitos) y CLP (que originan linfocitos B y T, células asesinas naturales o *Natural Killer* (NK) y células dendríticas). En el centro se representa el modelo revisado, en el que aparece una nueva población, LMPP, incapaces de diferenciar hacia el linaje megacariocítico/eritroide y que tienen la capacidad de derivar a progenitores GMP, CLP y células T y NK). A la derecha se representa el modelo “bypass mieloide” con la novedad de que los linajes mieloide y megacariocítico tienen capacidad de autorenovación y



derivación hacia el linaje mieloide. HSC: célula madre hematopoyética; MPP: progenitores multipotentes; CMP: progenitor mieloide común; CLP: progenitor linfoide común; MEP: progenitores eritroides mieloides; GMP: progenitores monocíticos granulocíticos; LMPP: progenitores linfomieloide; MyRP: progenitores reproductores restringidos a mieloide. Ilustración modificada de Laurenti E. y Göttgens B. (2018).

### 3.1.2. Etapa tímica: generación de los linfocitos T

La producción de linfocitos T en el individuo adulto tiene lugar en el timo tras la emigración de progenitores derivados de la médula ósea en ondas reguladas temporalmente, dependiendo de la disponibilidad de espacio<sup>51</sup>. Esta importación celular al timo tiene lugar de forma continua mediante dos pasos: en primer lugar, los progenitores son movilizados desde la médula ósea a la sangre y, después, los progenitores se establecen en el timo. Tras su asentamiento en el timo, los progenitores van diferenciándose hacia distintos tipos celulares con una mayor identidad del linaje de linfocitos T y, por tanto, van perdiendo la capacidad para diferenciar a otros linajes alternativos. Para lograr el compromiso al linaje T, los progenitores han de estar bajo el control de la señalización mediada por el receptor Notch en conjunción con numerosos FT constitutivos.

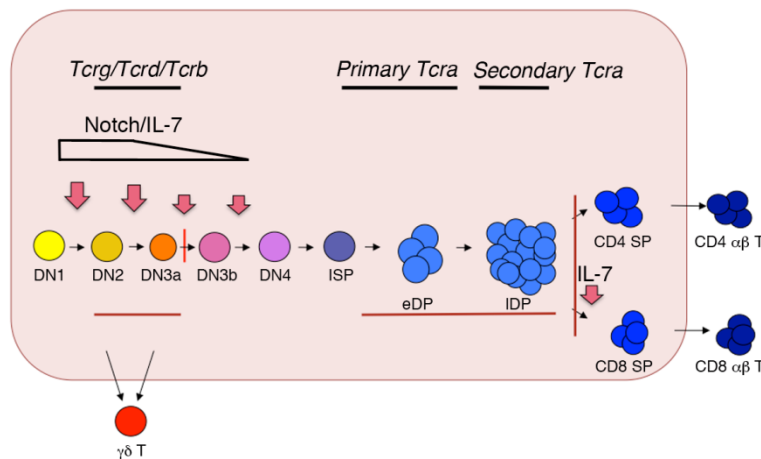
El concepto de “potencial de linaje T” es algo ambiguo, ya que los CLP, aunque tienen una fuerte identidad linfoide, pueden dar lugar *in vivo* bajo ciertas condiciones a células mieloides, mientras que los progenitores comprometidos a células dendríticas pueden ser reprogramados hacia el linaje T mediante transferencia intratímica<sup>52</sup>. La identificación de los progenitores que van a colonizar el timo (*Thymus Settling Progenitors*, TSP) ha sido un gran reto, debido a que estas células son escasas y difíciles de encontrar en médula ósea o en sangre. Estas células tienen un fenotipo Linaje<sup>-</sup> (definido por la ausencia en membrana de determinados marcadores que caracterizan a otros linajes hematopoyéticos) KIT<sup>+</sup> FLT3<sup>+</sup> CD24<sup>-/lo</sup> PSGL1<sup>+</sup> CCR9<sup>+</sup> y que deben cumplir tres criterios: 1) potencial de diferenciación hacia el linaje T, 2) capacidad de abandonar la médula ósea e incorporarse a la circulación, y 3) capacidad de entrar al timo. Aunque otros progenitores, como MPP, LMPP y CLP, también tienen la capacidad de colonizar el timo y dar lugar a células T si son FLT3<sup>+</sup>, solo pueden hacerlo si son inyectadas dentro del timo<sup>53</sup>. Más recientemente, se ha propuesto que el timo fetal de ratón es colonizado en dos oleadas por progenitores diferentes: entre los días embrionarios (E) E12 a E15 el timo es colonizado por CLP, pero a partir de E16 el timo es colonizado por LMPP<sup>54</sup>, siendo los CLP más eficientes colonizadores del timo que los LMPP<sup>55</sup>. Los progenitores que consiguen establecerse en el timo son denominados progenitores tímicos tempranos (*Early Thymic Progenitor*, ETP). Aunque los ETP poseen un fuerte potencial de linaje T, poseen potencial para diferenciar a otros linajes alternativos como lin-

focitos B, células asesinas naturales (*Natural Killer*, NK), células dendríticas y células mieloides. El hecho que los ETP posean potencial mieloide va en contra de la noción que el progenitor del que parten los TSP sea de carácter exclusivamente linfoide.

La entrada en el timo de los TSP ocurre a través de la unión córtico-medular, para lo cual estas células abandonan el torrente sanguíneo a través del endotelio vascular<sup>56</sup>. Para ello, los TSP se adhieren al endotelio vascular tímico mediante la interacción entre P-selectina y el ligando PSGL-1 (*P-Selectine Glycoprotein Ligand-1*). Esta adhesión puede también ser mediada a través de la integrina  $\alpha 4\beta 1$  y su ligando VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*). En una segunda etapa de colonización del timo, se produce una activación celular donde quimioquinas, tales como CCL25 y CCL19 (*Chemokine C-C Ligand 25 y 19*), secretadas por las células epiteliales tímicas (*Thymic Epithelial Cells*, TEC), se unen a sus respectivos receptores, CCR9 y CCR7 (*Chemokine C-C Receptor 9 y 7*), presentes en los TSP. Este paso es muy importante ya que los progenitores *Ccr9*<sup>-/-</sup> o *Ccr7*<sup>-/-</sup> generan pocos ETP. Finalmente los TSP necesitan adherirse a la pared vascular más fuertemente antes de extravasarse de los vasos y entrar en el estroma tímico. Esta adhesión es mediada por unión de las integrinas  $\alpha L\beta 2$  y  $\alpha 4\beta 1$  a sus respectivos ligandos, ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule-1*) y VCAM-1.

Durante su desarrollo hacia el linaje T en el interior del estroma tímico, los ETP maduran progresivamente a través de diferentes poblaciones de timocitos que pueden ser distinguidas en base a la expresión de los marcadores de superficie CD4 y CD8<sup>57,58</sup> (Figura 4): timocitos dobles negativos CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN), timocitos inmaduros simples-positivos (*Immature Simple Positive*, ISP) CD8<sup>+</sup> en ratón y CD4<sup>+</sup> en humanos, timocitos dobles positivos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP) y timocitos simples positivos (SP) CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. Los timocitos DN, constituyen el 2-5% de los timocitos totales, siendo la población más inmadura. Estos timocitos también son conocidos como células pro-T y engloban cuatro subpoblaciones dependiendo de la expresión en membrana de CD25 y CD44: DN1 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), que corresponden a los ETP, DN2 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), DN3 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>), y DN4 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>). En la población DN2 se pueden distinguir dos subpoblaciones dependiendo de la expresión del marcador de superficie KIT: DN2a (con alta expresión de KIT, KIT<sup>high</sup>) y DN2b (con baja expresión de KIT, KIT<sup>low</sup>)<sup>59</sup>. El compromiso al linaje T ocurre en la transición de timocitos DN2a a DN2b<sup>57</sup>. Los timocitos DN3 también se dividen en dos subpoblaciones, basadas en la expresión de CD27: DN3a (con baja expresión de CD27, CD27<sup>low</sup>) y DN3b (con alta expresión de CD27, CD27<sup>high</sup>)<sup>59,60</sup>. Los timocitos DN3a son células pequeñas quiescentes mientras que

los timocitos DN3b son células grandes y activadas, listas para comenzar a proliferar. Durante la diferenciación de timocitos de DN3a a DP, las células llevan a cabo una intensa proliferación, de forma que los timocitos DP constituyen aproximadamente el 80% del total de los timocitos. Se pueden distinguir dos poblaciones DP en función de la expresión de CD71: timocitos DP tempranos (*early DP*, eDP) ( $CD71^+$ ) y timocitos DP tardíos (*late DP*, IDP) ( $CD71^-$ )<sup>61</sup>. Los timocitos eDP son células grandes que han diferenciado a timocitos DP recientemente desde células ISP y constituyen aproximadamente el 10% del total de timocitos DP, mientras que los timocitos IDP son pequeñas células en reposo y constituyen aproximadamente el 70-75% de los timocitos totales. Los timocitos IDP pueden diferenciar a timocitos SP  $CD4^+$  o  $CD8^+$ , los cuales constituyen aproximadamente el 15% del total de los timocitos.



**Figura 4. Etapas de diferenciación de los timocitos.** Esquema de maduración de los timocitos representando los estadios y los reordenamientos de los genes del TCR. El timo es representado como un rectángulo de color rosa. La selección-β, la selección-γδ y la selección positiva están indicadas y dependen de la expresión del pre-TCR, TCRγδ o TCRαβ, respectivamente. Las intensidades de la señalización de Notch e interleuquina 7 (IL-7) están indicadas. La maduración de los timocitos a linfocitos T αβ y γδ se representa por el cambio de amarillo a azul o rojo, respectivamente.

Existen dos linajes de linfocitos T, T αβ y T γδ, los cuales se diferencian por la expresión de receptores de antígeno (TCR, *T cell receptor*), constituidos por heterodímeros formados por las cadenas TCRα y TCRβ, o TCRγ y TCRδ, respectivamente<sup>58,62</sup>. Los timocitos tempranos DN1-DN3a son precursores de los dos linajes (Figura 4). Los linfocitos T γδ derivan directamente de timocitos DN2b y DN3a, mientras que los linfocitos T αβ derivan de los timocitos DP. Todos los timocitos DP expresan un TCRαβ, pero solo un pequeño porcentaje son seleccionados, en función de la afinidad de su receptor por antígenos propios expresados en el estroma tímico, diferenciando al estadio SP y migrando hacia la periferia

como linfocitos T  $\alpha\beta$ . Además un pequeño porcentaje de timocitos DP con un TCR $\alpha\beta$  poco diverso también diferencian hacia una población de linfocitos T con características de células NK, células NK-T (*Natural Killer T cells*)<sup>57</sup>.

#### **4. Señalizaciones para el desarrollo de los linfocitos T en el timo**

Las TEC residen en la corteza y en la médula del timo, lo que se llama estroma tímico, proporcionando el nicho adecuado para que los timocitos diferencien a linfocitos T<sup>57</sup>. Entre las señalizaciones más importantes recibidas por los timocitos más se encuentran las mediadas por los receptores Notch, Wnt, interleuquina 7 (IL-7), IL-7R, y los TCR<sup>63,64,65</sup>.

Durante las primeras etapas de maduración, la señalización de Notch promueve el desarrollo de timocitos DN1 a timocitos DN3a, comprometiendo a los precursores hacia el linaje de los linfocitos T, la señalización de Wnt es importante en la diferenciación de timocitos DN3a a etapas posteriores, mientras que la señalización mediada por IL-7R resulta esencial durante los estadios de DN2 a DN4, participando en la supervivencia y en la protección celular contra la apoptosis. La transición de los timocitos DN3a a DP, pasando por los estadios DN3b, DN4 e ISP, depende de la señalización mediada por un receptor transitorio expresado en timocitos DN3a denominado pre-TCR, que junto con las señalizaciones mediadas por Notch e IL-7R, da lugar a un proceso conocido como selección- $\beta$ <sup>57,58</sup>. La expresión de un TCR $\gamma\delta$  en timocitos DN2 o DN3a da lugar a una señalización que posibilita la diferenciación a linfocitos T  $\gamma\delta$  en un proceso denominado selección- $\gamma\delta$ , mientras que la expresión de un TCR $\alpha\beta$  en timocitos DP da lugar a una señalización que posibilita la diferenciación a linfocitos T  $\alpha\beta$  en un proceso denominado selección positiva.

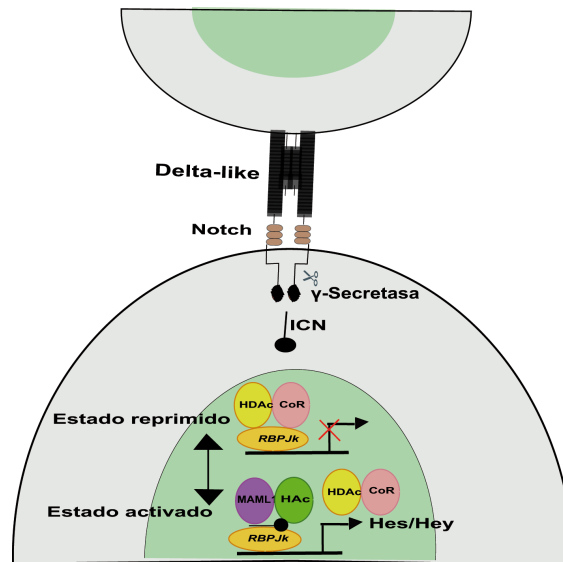
##### **4.1. Señalización mediada por Notch**

La ruta de señalización de Notch está evolutivamente muy conservada y presente en la mayoría de organismos multicelulares, desempeñando un papel de regulación en procesos tan importantes como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la supervivencia celulares<sup>66</sup>. Los componentes de esta ruta están implicados en la especificación de linajes en una gran variedad de tejidos, siendo esencial para el compromiso de los ETP al linaje T.

##### **4.1.1. Estructura de los receptores Notch y sus ligandos**

Notch constituye una familia de receptores transmembrana formada por cuatro miembros, NOTCH1-4, con funciones no redundantes<sup>67,68</sup>. Las células T expresan

NOTCH1, 2 y 3. Estos receptores se sintetizan como un precursor de 300 KDa que sufre un corte proteolítico en el aparato de Golgi en un sitio denominado S1, localizado cerca del dominio transmembrana. Esta escisión ocurre por acción de una proteasa del tipo Furina, originando un heterodímero que se mantiene unido por enlaces iónicos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>69,70</sup>. Los dos polipéptidos resultantes definen las dos subunidades que componen la forma madura del receptor de membrana. La subunidad extracelular se encuentra totalmente en el exterior, mientras que la otra subunidad tiene una pequeña parte extracelular de 70 aminoácidos, una porción transmembrana y un dominio intracelular. La subunidad extracelular tiene 29-36 dominios similares a los que se encuentran en el factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*, EGF) involucrado en las interacciones receptor-ligando<sup>71</sup>. A continuación se encuentra una región reguladora negativa (*Negative Regulatory Region*, NRR), compuesta por tres repeticiones ricas en cisteína (*Lin12 Notch Region*, LNR) y un homeodominio (*HomeoDomain*, HD), donde se enlazan los dos fragmentos resultantes de la escisión en el sitio S1<sup>72</sup>. La NRR es crucial para prevenir la activación de Notch en ausencia de interacción con ligando. Tras la interacción receptor-ligando, la NRR sufre cambios conformacionales que permiten la acción de proteasas de la familia de metaloproteasas ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) en el sitio de escisión denominado S2, ubicado en la región extracelular y que generalmente está enmascarado por la LNR<sup>73</sup>. Aunque varios miembros de la familia ADAM son capaces de activar la ruta de Notch, ADAM10 es el más relevante en este proceso<sup>74</sup>. La escisión en el sitio S2 resulta en una forma de Notch activada anclada a la membrana (*Notch Extra-Cellular Truncation*, NEXT), que carece de la parte extracelular. NEXT es entonces escindida por la proteasa multimérica  $\gamma$ -secretasa, formada por varias proteínas, de las cuales presenilina es la subunidad catalítica y nicastrina, APH-1 (*Anterior PHarynx defective-1*) y PEN-2 (*Presenilin ENhancer-2*) constituyen las subunidades reguladoras, mediante dos cortes. El primer corte ocurre en el sitio denominado S3 y el segundo corte en el sitio denominado S4, presentes ambos en el dominio transmembrana adyacente al dominio HD, quedando libre el dominio intracelular (*IntraCellular Notch*, ICN)<sup>75</sup>. Los cortes en los sitios S3 y S4 ocurren solo después de que se haya producido la escisión en el sitio S2, ya que es entonces cuando resultan accesibles los sitios S3 y S4 a la acción de la  $\gamma$ -secretasa<sup>76</sup>. La liberación de ICN permite que se inicie la señalización de Notch, translocándose al núcleo y actuando como un coactivador transcripcional de los genes diana de esta ruta (Figura 5).



**Figura 5. Ruta de señalización de Notch.** El ligando Delta-like se une al receptor Notch. Esta unión provoca la escisión de la porción intracelular de Notch (ICN) por acción de  $\gamma$ -secretasa. ICN se dirige al núcleo donde se asocia con el FT RBPJk que se encuentra unido a correpresores transcripcionales (CoR) y a HDAC que actúan inhibiendo transcripcionalmente la mayoría de los genes diana de Notch (estado reprimido). Al entrar al núcleo, ICN desplaza a CoR y HDAC de su unión a RBPJk y recluta coactivadores como MAML1 y HAT (HAc)(estado activado).

Los ligandos de los receptores de Notch pertenecen a las familias Delta-Like (DL) o Jagged, Serrate en *Drosophila*<sup>77</sup>. En mamíferos se conocen los ligandos DL1, DL2, DL3, JAGGED1 y JAGGED2<sup>78</sup>. Al igual que los receptores, estos ligandos también son proteínas transmembrana y su importancia funcional radica en el dominio extracelular. Este dominio incluye un motivo llamado Delta-Serrate-Lag2 (DSL) en el extremo amino-terminal, seguido de múltiples repeticiones de dominios EGF y un dominio rico en cisteína en la parte adyacente a la membrana. El dominio intracelular también es fundamental para que el ligando pueda ejercer su función. Los ligandos de Notch transmiten distintos grados de activación a los precursores de células T, afectando de forma distinta a su potencial de proliferación y/o diferenciación<sup>79,80</sup>. En concreto, los ligandos Jagged inducen una activación de Notch más débil que los ligandos DL, sugiriendo que la expresión de distintos ligandos de Notch en localizaciones concretas intratímicas son responsables de diferentes umbrales de activación de Notch a lo largo de la diferenciación de los timocitos<sup>81</sup>. DL4 es un ligando esencial y no redundante para NOTCH1 durante el compromiso de los precursores hacia el linaje T, de forma que DL4 y NOTCH1 son los elementos más relevantes de esta ruta de señalización durante las etapas de diferenciación y el desarrollo de las células T<sup>82</sup>. Este hecho determina que la regulación de los niveles de expresión de DL4 constituya una forma de controlar cuantitativamente la señalización de Notch dentro del timo<sup>83</sup>.

#### 4.1.2. Vía de señalización de Notch

ICN contiene varias regiones de interés<sup>84</sup>: 1) múltiples repeticiones de secuencias de reconocimiento del FT RBPJκ (*RBPJκ Association Module*, RAM), cuya principal función es facilitar la unión de ICN a RBPJκ (*immunoglobulin Jκ gene segment Recombination sequence Binding Protein*), también conocido como CSL (*CBF1, Suppressor of Hairless, LAG-1*), 2) repeticiones tipo anquirina (*ANKirin*, ANK), 3) dos secuencias de localización nuclear (*Nuclear Localization Sequences*, NLS), y 4) un dominio de transactivación que incluye en su extremo carboxilo-terminal una secuencia rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina (*Proline Glutamic acid Serine Treonine*, PEST), la cual es necesaria para la degradación proteica tras su ubiquitinación.

Las dos NLS dirigen a ICN al núcleo donde se asocia con RBPJκ, unido previamente al ADN a sitios de baja afinidad (RTGRGAR) o alta afinidad (YGTGRGAA). En ausencia de ICN, RBPJκ recluta a correpresores transcripcionales, incluyendo a complejos NCoR (*Nuclear Receptor Corepressor*)/SMRT (*Silencing Mediator of Retinoic Acid*), SKIP (*SKi Interacting Protein*), CIR (*CBF1 Interacting Repressor*), Hairless/CtBP (*Carboxil-terminal Binding Protein*), FHL1/KyoT2, Groucho/TLE (*Transducin-Like Enhancer protein*) y MINT (*MSX2 Interacting Nuclear Target*)/SHARP/SPEN, que actúan inhibiendo activamente la mayoría de los genes diana de Notch<sup>85,86</sup>. Dependiendo de los correpresores reclutados por RBPJκ, el grado de inhibición transcripcional es variable<sup>87</sup>. Aunque RBPJκ puede unirse al ADN en ausencia de ICN, esta unión es potenciada por ICN<sup>88</sup>, indicando que la unión de RBPJκ a los promotores diana es un proceso dinámico y regulado por esta señalización<sup>89</sup>. Además de la unión de diferentes correpresores a RBPJκ para el silenciamiento de los genes diana de Notch, también se reclutan HDAC y HDM<sup>90,91</sup>. Por tanto, las eliminaciones dinámicas de las marcas de trimetilación de la serina 4 de la histona H3 (H3K4me3) y desacetilación de las histonas H3 y H4 están implicadas en el silenciamiento de los genes diana de Notch a través de RBPJκ. Tras su traslocación al núcleo, ICN desplaza los correpresores unidos a RBPJκ y recluta a coactivadores de la familia Mastermind (*MAsterMind Like*, MAML), y HAT, como CBP (*CREB Binding Protein*), p300, PCAF (*P300 and CBP Associated Factor*) y GCN5, que activan la transcripción de los genes que responden a la señalización de Notch<sup>92,93</sup>. La activación transcripcional de los genes diana específicos de esta señalización concluye con la degradación de ICN a través de la acción de la ubiquitina, tras previa fosforilación por la quinasa dependiente de ciclina CDK8 (*Cyclin Dependent*

*Kinase 8*)<sup>92</sup>. Notch tiene entre sus principales dianas a los genes importantes en señalización, proliferación y diferenciación celulares, destacando los FT HES1, HEY, MYC, TCF1, MYC, GATA3, E2A y BCL11b, y los receptores de membrana pre-TCR e IL-7R<sup>94,95,57</sup>.

#### 4.1.3. Papel de la señalización de NOTCH1 en la determinación del linaje T

Mediante la generación de ratones *Notch1*<sup>-/-</sup> se demostró el papel crítico de esta señalización en la generación de células T<sup>96,97</sup>. Estos ratones tienen cinco veces menos cantidad de timocitos que los ratones normales y una arquitectura anormal del timo, tanto de la región cortical como de la región medular. Además del bloqueo total en la generación de las células T, estos ratones presentan un incremento de 200 veces en el número de células B en el timo. Un fenotipo similar también se observa en ratones *Rbpjk*<sup>-/-</sup>, hecho que confirma que la ruta de Notch ejerce su función a través de RBPJK<sup>98</sup>. La interrupción de las interacciones ligando-receptor, la inhibición de la transcripción de *Notch1* o el uso de inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa (*Gamma-Secretase Inhibitors*, GSI), que bloquean la escisión de Notch y la generación de ICN, también originan un desarrollo defectuoso de las células T<sup>99,100,101</sup>. También se ha logrado la inhibición de la ruta Notch mediante la sobre-expresión de una proteína dominante negativa del coactivador MAML1, DNAML1 (*Dominant Negative MAML1*), capaz de unirse al complejo formado por RBPJK e ICN, sustituyendo a los coactivadores MAML endógenos y bloqueando la transcripción dependiente de esta ruta<sup>102</sup>. También la sobre-expresión del inhibidor de la señalización de Notch NRARP (*NOTCH Regulated Ankyrin Repeat Protein*) en HSC da lugar a un profundo bloqueo de la progresión en las etapas tempranas de la maduración de timocitos DN1 a timocitos DN3a<sup>103</sup>. NRARP inhibe la ruta de Notch mediante la inducción de la degradación de ICN<sup>104</sup>. Este mecanismo de inhibición de Notch a través de NRARP constituye una auto-regulación de la propia señalización, ya que *Nrarp* es un gen diana de Notch. Por el contrario, los análisis de ganancia de función mediante la sobre-expresión de ICN1 en HSC desencadenan una activación del desarrollo de células T, sin necesidad del nicho que ofrece el timo, observándose una población de timocitos DP fuera del timo en ratones irradiados y una inhibición en la producción de linfocitos B<sup>105</sup>. Todos estos estudios concuerdan que la señalización mediada por NOTCH1 es esencial para la diferenciación de las HSC hacia el linaje T<sup>106</sup>. Los experimentos de ganancia de función en HSC humanas mediante la sobre-expresión de ICN1 o en activaciones dependientes de ligando en co-cultivos sobre células estromales (OP-9) que expresan el ligando DL1 (OP9-DL1) han confirmado los resultados obtenidos con ratones<sup>107,101</sup>.



Estos datos confirman que el papel de la señalización de NOTCH1 es favorecer la diferenciación de los precursores hacia el linaje T, inhibiendo la diferenciación hacia los otros linajes, tanto en humanos como en ratones. Sin embargo, esta señalización necesita simultáneamente de otras señales derivadas del estroma tímico para promover la completa diferenciación hacia el linaje T. De hecho, los ETP que sobreexpresan ICN1 son incapaces de progresar más allá de la etapa DN1 a menos que se cocultiven sobre una monocapa de células estromales OP9 y en presencia de IL-7<sup>108</sup>.

#### 4.1.4. Señalización de Notch en la diferenciación de linfocitos T $\alpha\beta$ versus T $\gamma\delta$

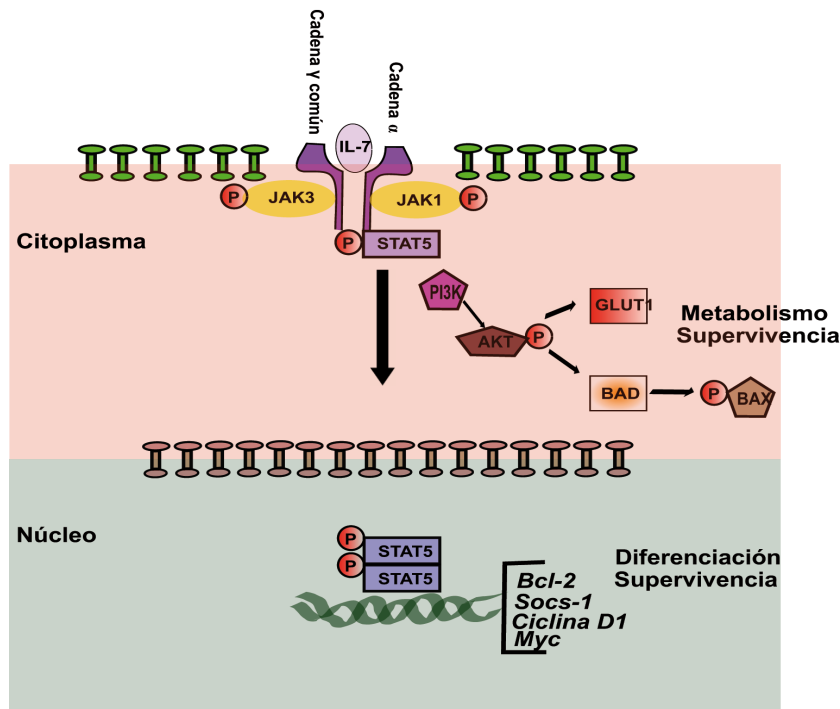
La bifurcación entre linfocitos T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  ocurre en la etapa DN3a<sup>109</sup>. La señalización de Notch parece tener efectos opuestos en la diferenciación de linfocitos T  $\alpha\beta/\gamma\delta$  en humanos y ratones<sup>110</sup>. En ratones, la delección condicional de *Notch1* en timocitos DN3a da lugar a una severa perturbación en el desarrollo de linfocitos T  $\alpha\beta$ , pero no de linfocitos T  $\gamma\delta$ <sup>111</sup>. De acuerdo con estos resultados, las HSC de ratón *Notch*<sup>+/-</sup> originan más células T  $\gamma\delta$  que T  $\alpha\beta$ , comparado con el resultado obtenido utilizando HSC *Notch*<sup>+/+</sup><sup>112</sup>. Estos datos indican que la señalización de Notch promueve la diferenciación de los timocitos de ratón hacia el linaje T  $\alpha\beta$ . Además, las células T  $\gamma\delta$  pueden sobrevivir y expandirse en ausencia de NOTCH1<sup>113</sup>. De igual forma, los ratones *Rbpjk*<sup>-/-</sup> también presentan un incremento de linfocitos T  $\gamma\delta$  y un descenso de linfocitos T  $\alpha\beta$ <sup>114</sup>. Los estudios *in vitro* utilizando el sistema de co-cultivos con células OP9 y OP9-DL1 han demostrado también que el desarrollo de los linfocitos T  $\gamma\delta$  es menos dependiente de la señalización de Notch que el desarrollo de los linfocitos T  $\alpha\beta$ , el cual depende de la interacción DL1-NOTCH para pasar la selección- $\beta$ <sup>113,115,102</sup>.

Los estudios de sobre-expresión de ICN1 en progenitores humanos han mostrado un papel de Notch opuesto al observado en progenitores de ratón: una señalización fuerte de Notch promueve el desarrollo de los progenitores al linaje T  $\gamma\delta$  a costa del linaje T  $\alpha\beta$ <sup>116,117</sup>. La señalización de Notch actúa de forma diferencial durante el desarrollo de los progenitores de linfocitos T, en función de la expresión de los ligandos y receptores de Notch<sup>81</sup>. De esta forma, dependiendo de la intensidad de la interacción Notch-ligando se favorece la diferenciación de un linaje T u otro<sup>81</sup>. Cambios moleculares distintos durante el desarrollo de los timocitos humanos y murinos parecen ser críticos para la respuesta diferencial a esta señalización observada entre los progenitores de estas dos especies.

## 4.2. Señalización mediada por IL-7

IL-7, también conocida como linfopoyetina 1 o factor celular pre-B, fue descubierta como un factor soluble capaz de promover el crecimiento de precursores de células B murinas en cultivo<sup>118</sup>. IL-7 es miembro de la superfamilia de interleuquinas IL-2, caracterizada por unirse a una familia de receptores que comparten una cadena denominada  $\gamma$  común ( $\gamma c$ ), que incluye a los receptores para IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21. Además de  $\gamma c$ , IL-7R posee una cadena específica, IL-7R $\alpha$  o CD127, perteneciente a la familia de receptores de citoquinas tipo I. IL-7R $\alpha$  se expresa en células hematopoyéticas del linaje linfóide, incluyendo CLP, precursores de células T y B, linfocitos T y macrófagos, además de otros tipos celulares, como células epiteliales del intestino, células endoteliales y células del estroma de la médula<sup>119</sup>.

La ruta de IL-7 está mediada principalmente a través del FT STAT5, miembro de la familia STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) (Figura 6). La activación de IL-7R induce las cascadas mediadas por las quinasas de la familia Janus (*Janus Kinase*, JAK) y fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (PhosphoInositol3-Kinase, PI3K)<sup>120</sup>. La unión de IL-7 a IL-7R $\alpha$  induce la inmediata asociación de la cadena  $\gamma c$ . A través de sus dominios intracelulares, la cadena IL-7R $\alpha$  aporta asociada a JAK1 al receptor, mientras que la cadena  $\gamma c$  aporta asociada a JAK3. JAK3 fosforila a la cadena IL-7R $\alpha$ , creando sitios para el reclutamiento de proteínas que contienen el dominio SH2 como son STAT5 y PI3K. JAK1 y JAK3 a su vez fosforilan a STAT5, induciendo su dimerización y translocación al núcleo, donde activa a sus genes diana como *Bcl2*, *Socs1*, *Ccnd1* y *Myc*<sup>121</sup>. La PI3K activada interactúa con IL-7R $\alpha$  y fosforila a AKT, que a su vez fosforila a la quinasa mTOR, dando lugar a la degradación de las proteínas pro-apoptóticas BAD y BAX, y a la regulación del metabolismo celular controlando la expresión de GLUT1<sup>122</sup>. IL-7 también induce la fosforilación de quinasas de la familia SRC, como FYN, la cual se encuentra unida a IL7R $\alpha$  y MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*), dando lugar a proliferación y diferenciación celulares<sup>123</sup>. La inducción del ciclo celular por esta ruta ocurre, en parte, a través de la degradación del inhibidor del ciclo celular p27Kip1 de una forma dependiente de un miembro de la familia PKC (Protein Kinase C), PKC $\theta$ .



**Figura 6. Ruta de señalización de IL-7.** IL-7 (círculo rosa) se une a la cadena IL-7R $\alpha$  induciendo inmediatamente la asociación de la cadena  $\gamma$ c. En sus dominios intracelulares, la cadena IL-7R $\alpha$  tiene asociada la quinaasa JAK1 (óvalo amarillo), mientras que la cadena  $\gamma$ c presenta asociada a JAK3 (óvalo amarillo). Esta última fosforila la cadena IL-7R $\alpha$  creando sitios para el reclutamiento de STAT5 (rectángulo morado) y PI3K (pentágono fucsia). JAK1 y JAK3 fosforilan a STAT5, induciendo su dimerización y translocación al núcleo, donde activa la transcripción de sus genes diana como *Bcl2*, *Socs1*, *Ccnd1* y *Myc*. Por otro lado, la PI3K activada interactúa con IL-7R $\alpha$  y fosforila AKT (pentágono marrón oscuro) que da lugar a la degradación de proteínas pro-apoptóticas como BAD (rectángulo naranja) y BAX (pentágono marrón claro), y a la regulación del metabolismo celular al controlar la expresión de GLUT1 (rectángulo rojo).

La expresión de IL-7R $\alpha$  ocurre en timocitos DN2, siendo esta señalización necesaria para la supervivencia y progresión de los timocitos hacia las siguientes etapas del desarrollo<sup>116,124,125</sup>. De hecho, la inyección de anticuerpos (*Antibody*, Ab) capaces de neutralizar la actividad de IL-7 en ratones provoca una drástica reducción del número total de timocitos (>99%) y un bloqueo en el desarrollo en la etapa DN3<sup>126,127</sup>. El mismo efecto se produce mediante la inyección de Ab para IL-7R $\alpha$ <sup>128</sup>. También los ratones *Il7*<sup>-/-</sup>, *Il7r*<sup>-/-</sup> o deficientes en algunas moléculas de señalización implicadas en esta ruta resultan en un defecto grave en la timopoyesis con un bloqueo en la etapa DN3. En estos ratones también se observa una absoluta ausencia de linfocitos T  $\gamma\delta$ , debido a que IL-7 activa la expresión de la cadena TCR $\gamma$  a través de STAT5<sup>129</sup>. Estudios con ratones *Il7r*<sup>-/-</sup> condicionales han demostrado que las células T derivan únicamente de precursores que expresen IL-7R $\alpha$ , sugiriendo que la señalización de IL-7 es crítica para la maduración de los linfocitos T<sup>130</sup>. Es relevante que la señalización de IL-7 es dependiente de la ruta de Notch, ya que la transcripción del gen *IL7R*

humano en líneas celulares depende de esta ruta<sup>95,117,131</sup>, siendo RBPJ $\kappa$  e ICN1 reclutados a su promotor<sup>132,133</sup>. Tanto la mutación del sitio de unión en este promotor, como la inhibición de la expresión de RBPJ $\kappa$ , inhiben su actividad, demostrando que NOTCH1 controla la expresión génica de *IL7R* a través de RBPJ $\kappa$ <sup>95</sup>. No se ha confirmado la regulación del gen *Il7r* de ratón por la ruta de Notch. La transcripción del gen *Il7r* de ratón depende de diferentes FT dependiendo del tipo celular: PU.1 en precursores linfoides tempranos, GF11 en timocitos SP CD8<sup>+</sup>, y RUNX1 y RUNX3 en linfocitos T<sup>134,135</sup>.

Aunque la señalización de IL-7R puede reemplazar a la mediada por NOTCH1 en la inducción de proliferación de los timocitos antes de llegar a la selección- $\beta$ , no puede sustituir a NOTCH1 en la inducción de diferenciación celular<sup>108</sup>. IL-7 se secreta por varios tipos celulares en distintos tejidos, incluyendo las células estromales del timo y médula ósea. Se cree que su mayor disponibilidad en el timo determina que IL-7 sea la interleuquina más relevante en el desarrollo y supervivencia de las células T<sup>136</sup>. Para maximizar la utilización de IL-7, la expresión de IL-7R $\alpha$  está regulada por un mecanismo de retro-alimentación negativa mediado por IL-7, con el fin de prevenir el derroche por células que ya están activadas y evitar la falta de disponibilidad para las células que dependen de ella<sup>135,137</sup>.

### 4.3. Señalización de Wnt

Las proteínas WNT son moléculas de señalización solubles que regulan las interacciones célula-célula en muchos tejidos durante la embriogénesis, siendo necesarias para la diferenciación de los timocitos y los linfocitos T<sup>138,139</sup>. Se trata de una señalización dependiente de dosis, capaz de interferir con otras señalizaciones, por lo que los experimentos de pérdida y ganancia de función han dado resultados contradictorios<sup>139</sup>. La ruta canónica de esta señalización está mediada por la vía de  $\beta$ -catenina y FT de la familia TCF (*T Cell Factor*)/LEF (*Lymphocyte Enhancer binding Factor*), siendo esencial para la proliferación y diferenciación de los timocitos. En esta ruta las proteínas WNT (se han identificado 19 proteínas WNT en humanos y ratones con patrones de expresión solapantes temporal y espacialmente) se unen a sus receptores, llamados Frizzled, lo cual previene la degradación del mediador de esta ruta,  $\beta$ -catenina, la cual se transloca al núcleo como coactivador transcripcional y siendo reclutada a los sitios diana de esta ruta a través de su unión a los FT de la familia TCF/LEF, desplazando a los correpresores Groucho/TLE y CtBP, y a HDAC. En timocitos, los miembros más abundantes de esta familia son TCF1, cuya expresión depende de la ruta de NOTCH1, y LEF1. En ausencia de ligando,  $\beta$ -catenina es secuestrada en el

citoplasma dentro de un complejo de degradación formado por la proteína *Adenomatous Polyposis Coli*, Axina y las quinasas de serina y treonina CK1 (*Casein Kinase 1*) y GSK-3 $\beta$  (*Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$* ), lo que conduce a su ubiquitinación y degradación por el proteosoma.

#### 4.4. Selección- $\beta$

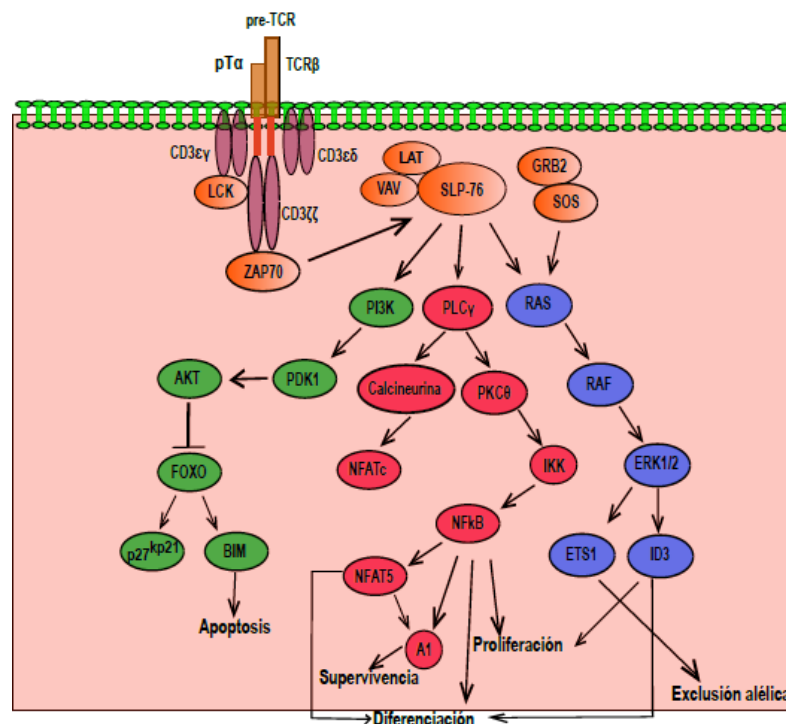
El paso de diferenciación de los timocitos DN3a a IDP, pasando a través de los estadios DN3b, DN4, ISp y eDP, se denomina selección- $\beta$  (Figura 4). El nombre se debe a que este proceso depende de la expresión de una cadena TCR $\beta$  funcional. Este paso constituye un punto de control fundamental durante el desarrollo de los linfocitos T  $\alpha\beta$ <sup>58</sup>. Para ello, los timocitos DN3a han de expresar una cadena TCR $\beta$  en la membrana celular mediante su ensamblaje con la cadena invariable denominada pre-T $\alpha$ , dando lugar a un pre-TCR. La expresión del pre-TCR induce una señalización que provoca una fuerte proliferación y diferenciación de los timocitos DN3a a IDP. Para que ocurra la selección- $\beta$ , además de la señalización mediada por el pre-TCR, se necesitan simultáneamente las señales mediadas por Notch e IL-7R<sup>115,65</sup>. También existe una relación entre la señalización del pre-TCR y la vía de Wnt, ya que las señales captadas por el pre-TCR estabilizan a la  $\beta$ -catenina en timocitos DN3 durante la selección- $\beta$ <sup>140</sup>.

##### 4.4.1. Señalización mediada por el pre-TCR

El pre-TCR, además de las cadenas TCR $\beta$  y pre-T $\alpha$ , incluye a varias moléculas de señalización de la familia CD3 (Figura 7). La señalización mediada por este receptor regula el rescate celular de la apoptosis, el reinicio del ciclo celular, la inducción de la expresión de los marcadores CD4 y CD8, la inhibición de la expresión de CD25 y la inducción de la expresión de la cadena TCR $\alpha$ <sup>141</sup>. Estas funciones únicas del pre-TCR controlan la selección- $\beta$ , asegurando que solo aquellos timocitos que expresan una cadena TCR $\beta$  consigan llegar a los procesos de selección positiva y negativa que permitirán la generación de linfocitos T  $\alpha\beta$ .

La señalización mediada por el pre-TCR es independiente de ligando, no requiriendo la presentación de antígenos presentados a través del complejo mayor de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) como ocurre con el TCR $\alpha\beta$  o antígenos no peptídicos como ocurre con el TCR $\gamma\delta$ , debido a que el pre-TCR se encuentra en microdominios altamente enriquecidos de glicolípidos en la membrana plasmática<sup>142</sup>. El pre-TCR pre-

senta niveles más bajos de expresión que el TCR $\alpha\beta$  debido a que su señalización constitutiva induce su rápida internalización y degradación en los lisosomas<sup>143</sup>. La capacidad de señalización del pre-TCR está mediada por los dominios extracelulares de sus cadenas, similar al de las inmunoglobulinas (Ig), y por sus colas citoplasmáticas encargadas de transducir la señal (Figura 7). En resumen, las señales del pre-TCR son transducidas a través de motivos de activación denominados ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Domain*) que se encuentran localizados en las colas citoplasmáticas de las cadenas CD3<sup>144</sup>. Estos motivos son fosforilados por las quinasas LCK (*Lymphoid Cell Kinase*) y FYN, lo cual permite el reclutamiento de nuevas quinasas, ZAP-70 y SYK (*Spleen Tyrosine Kinase*), que a su vez fosforilan a las proteínas adaptadoras LAT (*Linker for Activation of T cells*), SLP-76 (*SH2-domain containing Leukocyte Protein of 76 KDa*) y VAV, las cuales sirven de anclaje para otras proteínas responsables de iniciar tres rutas de señalización diferentes mediante la activación de PI3K, la fosfolipasa C $\gamma$  (*PhosphoLipase C $\gamma$ , PLC $\gamma$* ) y la GTPasa RAS<sup>145</sup>.



**Figura 7. Señalización del pre-TCR.** Las señales del pre-TCR son transducidas a través de motivos de activación denominados ITAM localizados en las colas citoplasmáticas de las cadenas CD3 (óvalos morados). Estos motivos son fosforilados por las quinasas ZAP-70 y SYK, que a su vez fosforilan a las proteínas adaptadoras LAT, SLP-76 y VAV que sirven de anclaje para otras proteínas responsables de iniciar tres cascadas de señalización diferentes mediante la activación de PI3K (óvalos verdes), PLC $\gamma$  (óvalos rojos) y RAS (óvalos azules), relacionadas con los procesos de apoptosis, diferenciación, proliferación y supervivencia, respectivamente. Cascada 1: PI3K fosforila 3-fosfoinositidos en la membrana permitiendo el reclutamiento a la membrana de las quinasas PDK1 y AKT. AKT inhibe los FT FOXO favoreciendo la supervivencia de las células DN3a. Cascada 2: La fosforilación de PLC $\gamma$  da como resultado la producción del diacilglicerol DAG e IP3

procedentes de la hidrólisis del PIP2. IP3 provoca un flujo de  $Ca^{2+}$  citosólico que causa la activación de la fosfatasa calcineurina. La calcineurina defosforila FT de la familia NFAT como NFATc1, el cual se transloca al núcleo para transactivar sus genes. DAG activa diferentes formas de la PKC, siendo PKC $\theta$  la principal isoforma, la cual actúa a través del FT NF $\kappa$ B activando la proteína de supervivencia BCL-2 junto a NFAT5. Cascada 3: Las quinasas MAPK1/2 y ERK1/2 controlan la activación de los FT ETS1 y EGR. EGR1 junto a NFATc1 inducen de forma sinérgica la expresión de ID3 promoviendo de esta forma la progresión de los timocitos DN3a a IDP. Ilustración modificada de López-Rodríguez C. et al. (2015).

La activación de la PI3K provoca la fosforilación de 3-fosfoinosítidos en la membrana, lo cual permite el reclutamiento a la membrana de las quinasas de serina y treonina PDK1 (*3'Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*) y AKT. La activación de AKT es de especial relevancia ya que se encarga del mantenimiento de la supervivencia de las células DN3a, inhibiendo los FT FOXO, los cuales promueven el arresto celular y la apoptosis<sup>147,148</sup>.

La fosforilación de PLC $\gamma$  da como resultado la producción del diacilglicerol (DiAcyl Glycerol, DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (Inositol Phosphate-3, IP3) procedentes de la hidrólisis del fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PhosphoInositol Phosphate 2, PIP2)<sup>149</sup>, que derivan en diferentes vías de señalización. IP3 provoca un flujo de  $Ca^{2+}$  citosólico proveniente del retículo endoplasmático que satura la proteína de unión de calcio calmodulina, lo cual es causa directa de la activación de la fosfatasa calcineurina. La calcineurina activada defosforila a FT de la familia NFAT (Nuclear Factor Activated T cells), como NFATc1, el cual se transloca al núcleo para transactivar sus genes diana y es esencial para esta señalización. La otra molécula procedente de la ruptura de PIP2, DAG, activa diferentes formas de la PKC, siendo PKC $\theta$  la principal isoforma en células T, la cual actúa a través del FT NF $\kappa$ B (Nuclear Factor potentiator of Ig kappa chain in activated B cells) activando la expresión la proteína de supervivencia BCL-2 junto con NFAT5<sup>150</sup>.

La cascada RAS-RAF-MAPK constituye otra de las ramas de la señalización mediada por el pre-TCR vital para la proliferación y diferenciación de los timocitos DN3a<sup>151</sup>. Las quinasas MEK, formadas por las quinasas MAPK1/2 y ERK (Extracellular signal Regulated protein Kinase) 1/2, controlan la activación de los FT ETS1 y EGR (Early Growth Response factors). El papel de ETS1 es mantener la supervivencia de los timocitos, mientras que EGR1, 2 y 3 ayudan al desarrollo de los timocitos incluso más allá de la selección- $\beta$ , con diferentes funciones durante el desarrollo de los timocitos. EGR1 actúa junto a NFATc1, induciendo de forma sinérgica la expresión de ID3 y promoviendo de esta forma la progresión de los timocitos DN3a a IDP<sup>152</sup>.

#### 4.4.2. Señalización mediada por NOTCH1 durante la selección-β

Tanto la transcripción de *Notch1* como la señalización mediada por NOTCH1 bajan bruscamente tras la selección-β en el paso de timocitos DN3a a DN3b<sup>60</sup>. A pesar de esa bajada, la señalización de NOTCH1 sigue siendo necesaria para la diferenciación de los timocitos DN3a a IDP<sup>153,114,102,115</sup>. La delección de *Notch1* o *Rbpjk*, o la inhibición de la señalización por sobre-expresión de DNMAML-1 bloquean el desarrollo de los timocitos en la etapa DN3a, no permitiendo que pasen a través de la selección-β<sup>153,114,102</sup>. Los timocitos DN3a de ratones *Notch1*<sup>-/-</sup> tienen reordenamientos VβDβJβ defectuosos en el gen *Tcrb*, lo cual junto con una deficiencia en la transcripción del gen *Ptcra* (gen que codifica por la cadena pre-Tα), da lugar a una expresión deficiente del pre-TCR, lo que explica la deficitaria selección-β observada en estos ratones<sup>153</sup>. Además del papel directo de NOTCH1 sobre la expresión del pre-TCR, la señalización de Notch tiene un papel proliferativo independiente de la expresión del pre-TCR a través de activación de AKT y la transcripción de *Myc* e *Il2ra*<sup>154,100,84,155,156</sup>.

#### 4.4.3 Señalización mediada por IL-7 durante la selección-β

La señalización de IL-7 durante la selección-β es crítica para la supervivencia y la proliferación de las células<sup>157</sup>. La sobreexpresión de moléculas anti-apoptóticas como BCL2 o la delección genética de factores pro-apoptóticos como BIM o BAX compensan parcialmente la ausencia de la señalización de IL-7, lo que sugiere que el principal papel de IL-7 es proporcionar señales de supervivencia<sup>158</sup>. La expresión de IL-7R comienza en DN2a y alcanza su pico de expresión en DN3a, siendo su expresión inhibida a partir del estadio DN4 y desapareciendo en timocitos DP<sup>159,160,65</sup>. El cese de la señalización de IL-7 en timocitos DP permite la expresión de los FT TCF1, LEF1 y RORγt (*Retinoic acid-related Orphan Receptor γ of T cells*), necesarios para la diferenciación y función de estas células<sup>160</sup>. La ausencia de señalización por IL-7 es la razón por la cual los timocitos DP son pequeños, metabólicamente inactivos y pre-programados para la apoptosis, como lo demuestra la baja expresión de BCL2 y del receptor de glucosa GLUT1<sup>159</sup>. De hecho, la adición de IL-7 a células DP que expresan un IL-7R de forma artificial es capaz de revertir este fenotipo<sup>161</sup>. Por tanto, la ausencia de señalización de IL-7 predispone a las células DP a sufrir una muerte celular programada, a menos que actúen otras señales de supervivencia. Así pues, esta señalización es importante para orquestar una correcta selección-β junto a las señalizaciones de Notch y del pre-TCR<sup>65</sup>.



## 4.5. Selección positiva

El paso de la diferenciación de los timocitos DP a linfocitos SP CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> se llama selección positiva (Figura 4). Esta señalización está basada en la afinidad intermedia del TCRαβ expresado en los timocitos DP por péptidos propios presentados en el contexto del MHC por las TEC. Los timocitos DP que expresen un TCRαβ con una afinidad demasiado alta por los péptidos así presentados morirán por apoptosis en un proceso denominado selección negativa, mientras que aquellos timocitos que expresen un TCRαβ con una afinidad demasiado baja por los péptidos así presentados morirán por apoptosis en un proceso denominado muerte por negligencia. Durante la selección positiva, los timocitos evitan la apoptosis mediante la inducción de BCL2 a través de la señalización del TCRαβ. La señalización de IL-7 es importante para la diferenciación hacia los linajes T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, ya que si persiste se impone el linaje T CD8<sup>+</sup> frente al linaje T CD4<sup>+</sup><sup>162</sup>. Los linfocitos T periféricos, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, dependen de la señalización mediada por IL-7 para su supervivencia, cuyo papel puede ser reemplazado por otras interleuquinas de la misma familia, como IL-2 o IL-15<sup>163</sup>.

## 5. FT relevantes para la diferenciación de los timocitos

Hay numerosos FT implicados durante la generación de los linfocitos T, que tienen además diferentes funciones en los distintos pasos de diferenciación de los timocitos. En esta Introducción, los FT están clasificados en función de su papel derivado de las distintas señalizaciones que ocurren a lo largo del desarrollo de los linfocitos T.

### 5.1. FT constitutivos en la etapa pre-tímica

Los FT constitutivos son aquellos cuya expresión se inicia en la etapa pre-tímica, tales como MYB, RUNX1, CBFβ, IKAROS, GFI1 y E2A, por lo que se los pueden considerar como “heredados”, manteniéndose presentes de forma más o menos estable a lo largo de la diferenciación de los timocitos<sup>57</sup>.

#### 5.1.1. MYB

La familia oncogenes *Myb* fue descubierta tras el hallazgo del gen *v-Myb* del virus de la mieloblastosis aviar<sup>164</sup>. Poco después se identificó *Myb* (*CMyb*), que codifica por MYB, como el gen de mamíferos homólogo de *v-Myb*, y la familia fue completada por el descubrimiento de *Myb11* (*Amyb*) y *Myb12* (*Bmyb*), que codifican para los FT A-MYB y B-MYB,

respectivamente, y comparten homología con MYB. Aunque A-MYB y B-MYB se expresan en diferentes tipos celulares, MYB es el miembro de esta familia implicado en procesos más relevantes, siendo crucial en hematopoyesis y eritropoyesis.

MYB tiene tres dominios funcionales: un DBD en el extremo amino-terminal, un dominio de transactivación en la parte central y un NRR en el extremo carboxilo-terminal<sup>165</sup>. El dominio NRR incluye un motivo de cremallera de leucinas (bZip)<sup>166</sup>. MYB se une a la secuencia YAACG/TG (siendo Y una pirimidina: G o T), activando la transcripción al interaccionar con HAT como CBP y p300. MYB tiene dos isoformas principales, P-89 y P-75, siendo P75 la responsable en la hematopoyesis en ratones<sup>167</sup>. Además de estas dos isoformas, experimentos de RNA-seq han revelado que existen al menos 29 transcritos distintos de *MYB* en células Jurkat<sup>168</sup>, aunque la función de estas isoformas no está clara en la actualidad.

La inhibición de la expresión de MYB en HSC con oligonucleótidos antisentido resultó en una disminución del tamaño y número de estas células<sup>169</sup>, mientras que los ratones *Myb*<sup>-/-</sup> mueren debido a la ausencia de eritropoyesis<sup>170</sup>. Las HSC *Myb*<sup>-/-</sup> son capaces de generar ETP en el timo de ratones quiméricos pero su desarrollo se bloquea antes de la diferenciación al linaje T<sup>171</sup>. Por tanto, MYB juega un papel esencial en la proliferación y diferenciación celulares de HSC, teniendo además un papel regulador en células madre de otros tejidos<sup>172,173</sup>.

La expresión de MYB está muy restringida a células progenitoras experimentando una gran bajada cuando las células diferencian hacia un linaje determinado. Esta disminución es importante ya que si, por el contrario, se sobreexpresa no tiene lugar la diferenciación hacia los linajes eritroide y mieloide<sup>174,175</sup>. Durante el desarrollo de los linfocitos T, *Myb* se expresa abundantemente en los timocitos DN y DP, disminuyendo esta expresión cuando diferencian a timocitos SP. MYB controla la expresión y función de una amplia variedad de genes fundamentales para este linaje, tales como *Kit*, *Myc*, *Ada* y *Cd4* entre otros, muchos de los cuales son esenciales en distintas etapas durante el desarrollo de las células T<sup>171</sup>. De hecho, experimentos realizados con ratones *Myb*<sup>-/-</sup> condicionales revelaron un bloqueo en el estadio DN3a, indicando que MYB es necesario para que los timocitos pasen la selección-β de forma correcta<sup>176</sup>. Aunque algunos timocitos DN3a *Myb*<sup>-/-</sup> consiguieron diferenciarse a timocitos DP, estas células mostraron una apoptosis exacerbada asociada con un descenso en la expresión de BCL2. Mediante experimentos realizados con ratones *Myb*<sup>-/-</sup>

condicionales también se observó un bloqueo en la diferenciación hacia timocitos SP CD4<sup>+</sup>, adjudicando a MYB un posible papel en las rutas de señalización que son activadas durante la selección de los timocitos SP CD4<sup>+</sup> a través de la inducción del FT GATA3<sup>177,178</sup>. Además, MYB favorece la diferenciación de los timocitos DP a células NK-T invariables (*invariant Natural Killer-T cells*, iNKT)<sup>179</sup>. En linfocitos T maduros, la expresión de MYB se induce rápidamente durante la proliferación celular<sup>180</sup>.

### 5.1.2. RUNX y CBF $\beta$

La familia de FT RUNX, RUNX1-3, está implicada en la regulación de genes específicos relacionados con el desarrollo de distintos tipos celulares. RUNX1, RUNX2 y RUNX3 son también conocidos con otras nomenclaturas como PEBP2 $\alpha$ B, PEBP2 $\alpha$ A y PEBP2 $\alpha$ C, o CBFA2, CBFA1 y CBFA3, o AML1, AML3 y AML2, respectivamente<sup>181</sup>. RUNX1 es esencial para el establecimiento de la hematopoyesis definitiva y la generación de HSC en el embrión, mientras que RUNX2 es esencial para la osteogénesis y RUNX3 participa en neurogénesis y la diferenciación de timocitos DP a SP CD8<sup>+</sup><sup>182</sup>. Estos FT se unen a la secuencia YGYGTT formando un complejo con dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , constituyendo RUNX1-3 la subunidad  $\alpha$  y el coactivador CBF $\beta$  (*Core Binding Factor  $\beta$* ), la subunidad  $\beta$ .

RUNX1-3 contienen una región de 128 aminoácidos conservada denominada dominio de homología Runt (*Runt Homology Domain*, RHD) que es característica de los miembros de esta familia, un dominio de transactivación y un motivo carboxilo-terminal con cinco aminoácidos VWRPY que actúa como una señal de reclutamiento para los correpresores Groucho/TLE<sup>183</sup>. La región RHD contiene la región DBD, necesaria para su unión al ADN y para la heterodimerización con CBF $\beta$ , además de funcionar en la localización nuclear de estos factores. CBF $\beta$  no interactúa con el ADN, pero ayuda a incrementar la afinidad de la subunidad  $\alpha$  con el ADN y en la estabilidad del complejo. La parte carboxilo-terminal de CBF $\beta$  está menos conservada y contiene un dominio de transactivación, un dominio de inhibición, una región rica en prolinas y una señal de localización para la matriz nuclear. Los complejos RUNX-CBF $\beta$  no son, por sí solos, fuertes reguladores transcripcionales, precisando la colaboración con otros FT unidos al ADN en su proximidad, además de coactivadores<sup>181</sup>. Además, su actividad transcripcional puede estar modulada por interacciones con correpresores, enzimas remodeladoras de la cromatina, como la HAT MOZ, y miembros de los complejos SWI/SNF, tales como BRG1 e INI-1, o por modificaciones postraduccionales que afectan a su estabilidad, actividad o localización celulares. Por ejemplo, RUNX1 cola-

bora con ETS1 en la activación de los *enhancers* de los genes de las cadenas TCR $\beta$  y TCR $\alpha$  (*Tcrb* y *Tcra*), E $\beta$  y E $\alpha$ , de forma que su interacción física aumenta la afinidad de ambos<sup>184,185,186,187,188</sup>, y con MYB en la activación de los *enhancers* de los genes de las cadenas TCR $\gamma$  y TCR $\delta$  (*Tcrg* y *Tcrd*), E $\gamma$  y E $\delta$ <sup>189,190,191</sup>.

Los tres genes *Runx* de mamíferos se transcriben desde dos promotores distintos, un promotor distal denominado P1 y un promotor proximal denominado P2<sup>192</sup>. Ambos tienen sitios de unión a RUNX, de este modo la expresión de cualquier gen *Runx* puede ser regulada por su propio producto proteico o por los otros dos factores RUNX. RUNX1 es el miembro de esta familia con un papel determinante en la hematopoyesis temprana. El gen *Runx1* abarca un locus de 260 Kb compuesto de 12 exones, dando lugar a tres isoformas: RUNX1a, b y c. El promotor proximal P2 da lugar a las isoformas RUNX1a y RUNX1b, mientras que el promotor distal P1 origina la isoforma RUNX1c. Estas isoformas se expresan de forma secuencial durante las primeras etapas de la hematopoyesis, de forma que las isoformas derivadas del promotor proximal P2 aparecen antes que las derivadas del promotor distal P1<sup>193</sup>. Este hallazgo fue corroborado en estudios en embriones de ratón, de forma que los transcritos de *Runx1* aislados en E10,5 proceden de promotor proximal P2, mientras que en días posteriores los transcritos observados en el hígado fetal eran derivados del promotor distal P1<sup>194</sup>. En ratones adultos, la gran mayoría de los transcritos de *Runx1* presentes en células hematopoyéticas proceden del promotor distal P1 y el bloqueo de la expresión de estos transcritos provoca numerosos defectos similares a los encontrados en la deficiencia total de RUNX1<sup>195</sup>. A nivel funcional, tanto RUNX1b como RUNX1c rescatan el bloqueo de la producción de células sanguíneas observado en ratones *Runx1*<sup>-/-</sup>. Las deleciones de *Runx1* en etapas más tardías del desarrollo hematopoyético en ratón causan defectos más sutiles, lo que concuerda con la observación de que RUNX1 es, en parte, dispensable después de la aparición de las células sanguíneas, posiblemente por su redundancia con RUNX3. La inhibición de la expresión de RUNX1 en timocitos DN3a en ratones *Runx1*<sup>-/-</sup> condicionales provoca un bloqueo entre las etapas DN3-DN4, debido a una defectuosa expresión de la cadena pre-TCR $\beta$  y del pre-TCR<sup>196</sup>. Además, RUNX1 y RUNX3 tienen un papel importante en la diferenciación de los timocitos DP a SP CD8<sup>+</sup>, silenciando la expresión de CD4<sup>196</sup>. De hecho, la inactivación de *Runx1* en las etapas DP afecta más a la población de células SP CD4<sup>+</sup> que a las CD8<sup>+</sup>, debido a que la expresión RUNX3 puede compensar la pérdida de RUNX1 en esta última población<sup>197</sup>.

### 5.1.3. Proteínas E, E2A y HEB, e inhibidores ID

Los miembros de FT de la familia de las proteínas E tienen un DBD con una estructura básica hélice-lazo-hélice (*basic Helix-Loop-Helix*, bHLH) y dimerizan para unirse al ADN reconociendo la secuencia consenso CANNTG, conocida como “caja E”, controlando varios procesos del desarrollo en vertebrados<sup>198</sup>. Entre los distintos miembros de la familia, E2A y HEB son especialmente relevantes durante el desarrollo de las células T. Estos FT funcionan en las células del linaje T principalmente como heterodímeros E2A-HEB<sup>199</sup>. E2A es codificado por el gen *Tcf3*, con dos isoformas denominadas E47 y E12 sin diferencias funcionales distinguibles, y HEB es codificado por el gen *Tcf12*, con dos isoformas denominadas HEBAIt y HEBCan<sup>198</sup>. Los FT ID, ID1-4, son miembros de esta familia que carecen del dominio de unión al ADN y antagonizan con la función de las otras proteínas E al dimerizar con ellos e impedir ser reclutados a sus sitios de unión<sup>200</sup>.

Experimentos realizados con ratones *Tcf3*<sup>-/-</sup> y/o *Tcf12*<sup>-/-</sup> han revelado que la expresión de E2A y HEB es crucial durante el desarrollo de las células T, regulando la expresión de genes tan importantes para el compromiso del linaje T y la selección-β como son *Gata3*, *Notch1*, *Rag (Recombination activating gene)1*, *Rag2* y *Ptcr*<sup>198,201,202,203</sup>. De acuerdo con el crucial papel de las proteínas E en el desarrollo de las células T, los timocitos *Id1*<sup>-/-</sup> presentan un bloqueo severo en la etapa DN1<sup>204</sup>. Además, estos FT desempeñan un importante papel proliferativo de los timocitos durante el desarrollo, de forma que la falta de E2A o HEB induce una proliferación descontrolada de células DN3a<sup>205,206,207,208,198</sup>. Una vez que los timocitos alcanzan el estadio DP, E2A y HEB aumentan su expresión, bloqueando el desarrollo celular hasta que llega la señal derivada de la selección positiva a través del TCRαβ promoviendo la diferenciación de los timocitos SP CD4<sup>+209,198,210</sup>. La demostración de que las proteínas E son necesarias para el desarrollo de los timocitos SP CD4<sup>+</sup> se comprobó mediante la generación de ratones condicionales *Tcf3*<sup>-/-</sup> *Tcf12*<sup>-/-</sup> en timocitos DP<sup>210</sup>. De acuerdo con estos datos, los ratones *Id2*<sup>-/-</sup> *Id3*<sup>-/-</sup> tienen un bloqueo en la diferenciación de los timocitos SP CD8<sup>+210</sup>. Además, E2A es un FT crucial para el desarrollo de las células NK, de forma que la sobre-expresión experimental de ID3 promueve el desarrollo de estas células, de forma independiente al desarrollo de células T<sup>211,212,213</sup>.

### 5.1.4. IKAROS

Los FT de la familia IKAROS son necesarios para el desarrollo de las células T<sup>214,215</sup>. Esta familia consta de cinco miembros: IKAROS, HELIOS, AIOLOS, EOS y PEGASUS

(con mayor presencia de los tres primeros en tejido hematopoyético) y comparten dos dominios con varios dedos de zinc que son altamente homólogos entre los miembros de la familia. El dominio amino-terminal incluye el DBD, mientras que el dominio carboxilo-terminal media la dimerización. Cada miembro de la familia puede homodimerizar o heterodimerizar con algún otro miembro de la familia, siendo la dimerización necesaria para su unión al ADN con alta afinidad y para la actividad transcripcional<sup>216</sup>. Debido a la amplia dimerización que puede ocurrir entre los distintos miembros de la familia, se puede considerar a esta familia como un todo, de forma que un cambio en la expresión de uno de los miembros tiene el potencial de alterar la funcionalidad de la familia entera. Además, cada miembro de la familia tiene un extensivo procesamiento alternativo del ARN, que resulta en la delección de uno o dos dedos de zinc y puede cambiar, por tanto, la secuencia de reconocimiento en el ADN<sup>217</sup>. La delección de tres o más dedos de zinc en el motivo de unión al ADN da lugar a una variante inhibidora, capaz de dimerizar con otros miembros de la familia pero incapaz de unirse al DNA<sup>218</sup>. Recientemente se ha descubierto que los miembros de la familia IKAROS cambian sus niveles de ARN mensajero y proteína, alterando la funcionalidad del resto de la familia, de forma distinta en humanos y ratones. Es decir, existen diferencias notables en los patrones de expresión y procesamiento del ARN de los miembros de esta familia en las dos especies, con una clara redundancia entre los distintos miembros de la familia ya que diferentes patrones de expresión cumplen funciones similares<sup>219</sup>.

La importancia de esta familia en hematopoyesis se observó inicialmente en ratones que expresaban una isoforma dominante-negativa de IKAROS, lo cual inhibió la generación de células T, B y NK<sup>220</sup>. Aunque IKAROS es esencial para la especificación de todos los linajes linfoides durante la hematopoyesis fetal, en ratones adultos su función puede ser sustituida, en parte, por otros FT que colaboran con este factor<sup>221</sup>. Sin embargo, IKAROS es necesario para el desarrollo normal de las células T, ya que su ausencia altera el correcto ratio de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup><sup>222</sup>, teniendo además un papel de regulador de la proliferación celular durante la selección positiva mediante el control de la expresión de genes anti-apoptóticos como *Bcl2* y *Mcl1*<sup>222</sup>.

Un mecanismo interesante por el cual los dímeros de esta familia pueden regular el desarrollo de las células T es a través del control de la transcripción dependiente de Notch, ya que los miembros de la familia IKAROS y RBPJ $\kappa$  reconocen la misma secuencia consenso GGGAA, por lo que se ha propuesto que IKAROS puede actuar como un inhibidor de la transcripción dependiente de Notch compitiendo con la unión de RBPJ $\kappa$  al ADN<sup>223</sup>. En apo-

yo a este modelo, los timocitos de los ratones *Ikaros*<sup>-/-</sup> tienen una elevada expresión de los genes dependientes de la ruta Notch<sup>224</sup>. Además, el incremento de los niveles de AIOLOS en timocitos murinos se correlaciona con la etapa del desarrollo en la que las células reducen su capacidad para responder a la señalización de Notch<sup>225</sup>.

### 5.1.5. GFI1

GFI1 y su parólogo GFI1B, son TF que se unen a un sitio consenso TAAAT-CAC(A/T)GCA, con un requerimiento absoluto de AATC, y tienen un papel crucial en la hematopoyesis<sup>226</sup>. Estos TF tienen un pequeño dominio conservado SNAG (*SNAIL/Gfi1*) en el extremo amino-terminal, que también está presente en otros represores transcripcionales, capaz de reclutar enzimas modificadoras de las histonas. En el extremo carboxilo-terminal, ambas proteínas contienen seis dedos de zinc tipo C2H2, de los cuales los dedos 3-5 son esenciales para la unión al ADN. Entre los dominios SNAG y los dedos de zinc, hay un dominio intermedio que une proteínas implicadas en la regulación transcripcional y el procesamiento del ARN.

GFI1 está implicado en el desarrollo y la función de las HSC, células B y T, células dendríticas, granulocitos y macrófagos, mientras que GFI1B es esencial para el desarrollo de megacariocitos y eritrocitos<sup>226</sup>. GFI1B es capaz de rescatar gran parte del fenotipo hematopoyético observado en ratones *Gfi1*<sup>-/-</sup>, pero no la pérdida de audición observada indicando que en otros tejidos estas proteínas tienen funciones específicas<sup>226</sup>. En algunas poblaciones de células hematopoyéticas, la expresión de los genes *Gfi1* y *Gfi1b* está auto-regulada por las propias proteínas GFI1 y GFI1B, pudiendo GFI1 controlar la expresión del gen *Gfi1b* y viceversa. Un importante papel de GFI1 es preservar la quiescencia de las HSC para evitar que pierdan su funcionalidad, estando regulado a través de p53. También en etapas muy tempranas del desarrollo hematopoyético, las células requieren GFI1 para integrar de manera adecuada la señalización de Notch<sup>227</sup>, teniendo los LMPP y ETP de ratones *Gfi1*<sup>-/-</sup> dificultades para activar importantes genes del linaje linfóide, tales como *Il7r*, *Rag1*, *Flt3* y *Notch*. Por tanto, GFI1 es necesario para que se mantenga el programa de transcripción dependiente de Notch1 característico del linaje T. En etapas posteriores del desarrollo de los linfocitos T, GFI1 evita la adquisición prematura del programa específico de células SP en células DP<sup>228</sup>, ya que en timocitos *Gfi1*<sup>-/-</sup> se produce una inducción aberrante de la expresión de FOXO1, el cual conduce a la maduración y el desarrollo acelerado de los timocitos. En linfocitos T maduros, GFI1 es importante para el mantenimiento de las células CD8<sup>+</sup> vírgenes y la ex-

pansión celular de las CD4<sup>+</sup> T ayudadoras de tipo 2 (*T helper-2*, Th2)<sup>229</sup>. De hecho, GFI1 y GATA3 potencian la proliferación e inhiben la apoptosis a través de la inducción de la expresión de IL-4 en células Th2. Así, los altos niveles de expresión de GFI1 aseguran la aparición de la subpoblación Th2 al reprimir genes que controlan destinos celulares alternativos, mientras que la pérdida de GFI1 conduce a un aumento de la producción de la citoquina característica de las células Th17, IL-17 $\alpha$ , y la aparición de las células Th17.

## 5.2. FT implicados en la determinación del linaje T mediada por NOTCH1

Las interacciones NOTCH-ligando son esenciales durante las etapas esenciales de diferenciación desde los ETP a los timocitos DN3a, distinguiéndose dos fases: de ETP a timocitos DN2a y de timocitos DN2a a timocitos DN3a<sup>230,231,57</sup>. El compromiso de los ETP al linaje T ocurre en la transición de timocitos DN2a a DN2b<sup>232</sup>. Durante la primera fase, la señalización de Notch induce la expresión de HES1 y otros FT cruciales para la especificación del linaje T, como GATA3 y TCF1. GATA3 y TCF1, colaboran junto a los FT “heredados” para el compromiso del linaje T<sup>57</sup>. GATA3 y TCF1 reprimen genes específicos de los progenitores, induciendo la diferenciación celular hacia el linaje T mediante la activación de genes específicos de este linaje<sup>233,234</sup>. La segunda fase dependiente de Notch ocurre por acción de TCF1, RUNX1 y GATA3, que junto con la señalización de NOTCH1, activan la expresión del TF BCL11b, necesario para finalizar el proceso de exclusión de células sin identidad T<sup>235</sup>. La señalización NOTCH1-DL4 además de ser necesaria para la viabilidad y la inducción de FT específicos de células T, como TCF1, GATA3 y BCL11b, tiene un efecto antagonista de diferenciación de linajes alternativos mediante la supresión de FT característicos de genes de células no T, tales como PU.1 y C/EBP $\alpha$ , característicos de las células del linaje mieloide, e ID2, característico de las células NK<sup>236,106,212</sup>. Entre los genes regulados por Notch en timocitos destacan *Rag1*, *Rag2* y *Ptcra*, además de la expresión de la isoforma HEBAIt<sup>237,238</sup>.

### 5.2.1. HES1

HES1 forma parte de la extensa familia de proteínas con estructura bHLH y desempeña un papel crucial en el control y regulación del ciclo celular, proliferación, diferenciación celular, supervivencia y apoptosis en células progenitoras neuronales, endocrinas y de linfocitos<sup>239</sup>. Existen actualmente siete proteínas HES (HES1-7) y todas ellas comparten homología en el dominio bHLH. Estructuralmente hablando, la familia HES tiene un residuo de prolina común dentro de su motivo básico, y un dominio altamente conservado compues-



to por Trp-Arg-Pro-Trp (WRPW) en el extremo carboxilo-terminal. Además posee un dominio Orange compuesto aproximadamente de 35 aminoácidos, localizado próximo al extremo carboxilo-terminal del dominio bHLH que está implicado en interacciones proteína-proteína. Mediante el dominio bHLH, HES1 puede formar homodímeros o heterodímeros con otros miembros de la familia bHLH. HES1 se une a una secuencias denominadas “caja N” (CACNAG), o similares (CACGCG) presentes en los promotores de sus genes diana, regulando su expresión. Este FT tiene una función represora de la transcripción, siendo capaz de regular su propia expresión mediante un mecanismo de retroalimentación negativa, es decir, uniéndose a una caja N localizada en su promotor. Otro mecanismo de represión transcripcional mediado por HES1 ocurre a través de su motivo WRPW, que es capaz de reclutar a los correpresores TLE y HDAC a los promotores de sus genes diana.

*Hes1* es considerado como el gen más representativo de los regulados por la ruta de Notch, siendo fundamental para el desarrollo de las células T<sup>240,241,242</sup>. El 90% de los embriones de ratones *Hes1*<sup>-/-</sup> muestran una pérdida completa del timo, mientras que el resto presenta un timo más pequeño de lo normal ya que el desarrollo de los timocitos se encuentra bloqueado en las etapas DN. Además, las células progenitoras de médula ósea de los ratones *Hes1*<sup>-/-</sup> resultan en un 80% de reducción de la celularidad tímica<sup>242</sup>. Estos resultados son similares a los obtenidos en ratones *Notch1*<sup>-/-96</sup>, apoyando que la diferenciación y expansión celular tímica dependiente de NOTCH1 está mediada, en gran parte, a través de HES1<sup>243</sup>. La diferenciación de células HSC mediada por HES1 ocurre a través de la inhibición de la expresión del gen *Cdkn1b*, que codifica para el inhibidor del ciclo celular p27kip1<sup>244</sup>. La inducción de HES1 por la ruta de Notch es también necesaria para reprimir a la fosfatasa PTEN, la cual inhibe la vía PI3K/AKT, que, a su vez, facilita la diferenciación inducida por el pre-TCR, favoreciendo los procesos de supervivencia y diferenciación durante la selección- $\beta$ <sup>245</sup>. Además, HES1 favorece la diferenciación de los timocitos DP hacia células T CD8<sup>+</sup>, por la supresión selectiva de la expresión del receptor CD4<sup>246</sup>. También se ha propuesto un papel de HES1 en la producción de IL-17 importante para la generación de las células T  $\gamma\delta$  en el timo<sup>247</sup>. Otra función importante de HES1 es su capacidad para inhibir la diferenciación hacia el linaje mielóide por unión directa e inactivación del FT C/EBP- $\alpha$ , el cual es un regulador crítico del desarrollo de las células dendríticas y mieloides<sup>248</sup>.

### 5.2.2. TCF1

TCF1 (codificado en el gen *Tcf7*) junto con LEF1 pertenecen a una familia de proteínas que contienen un DBD denominado de alta movilidad (*High Mobility Group*, HMG) que les permite reconocer una secuencia de ADN TCAAAG, denominada “caja HMG”<sup>249,250</sup>. TCF1 y LEF1 tienen dominios HMG prácticamente idénticos y no muestran diferencias en su unión al ADN. Ambos son componentes de la ruta de señalización Wnt, que cuando está activa provoca la translocación del mediador  $\beta$ -catenina al núcleo, la cual se une a estos FT previamente unidos al ADN dando lugar a un complejo de transcripción activo. Se han identificado al menos ocho isoformas de TCF1 con diferentes capacidades para unirse a  $\beta$ -catenina, lo cual influye en la capacidad de la célula para responder a las señales Wnt. Las isoformas largas de TCF1 contienen el dominio de unión a  $\beta$ -catenina en el extremo amino-terminal, mientras que las isoformas más cortas carecen de este dominio y, por lo tanto, funcionan como unos represores de la ruta de Wnt.

TCF1 es esencial para el desarrollo de las células T. Los ratones *Tcf7*<sup>-/-</sup> tienen abundantes timocitos DN1 y una reducción drástica de timocitos DN2, DN3, DP y SP y células T en periferia, pero un incremento en timocitos ISP<sup>251</sup>, mientras que los ratones *Lef1*<sup>-/-</sup> no muestran alteraciones en el desarrollo de las células T<sup>252</sup>. Los timocitos DN1 *Tcf7*<sup>-/-</sup> muestran un incremento en apoptosis y tienen expresión reducida de los genes relacionados con procesos metabólicos del ADN, modificación de cromatina y respuesta a daño celular. El hecho que se encuentren timocitos en etapas más maduras del desarrollo en ausencia de TCF1, sugiere que LEF1 puede compensar la pérdida de TCF1<sup>253,250</sup>. De hecho los ratones *Tcf7*<sup>-/-</sup> *Lef1*<sup>-/-</sup> tienen un bloqueo total en el desarrollo de los linfocitos DN3a a DP<sup>254</sup>, colaborando juntos en la regulación de la transcripción del gen *Tcra*<sup>255</sup>.

TCF1 es una diana directa de la ruta de NOTCH1, siendo un mediador esencial para la generación del linaje T, junto con GATA3 y BCL11B. El mecanismo por el cual TCF1 controla el destino de las células T es a través de su capacidad para activar la cromatina silenciada y establecer la identidad epigenética de las células T<sup>256</sup>. Esta remodelación epigenómica hace que cientos de genes restringidos a células T, como por ejemplo *Ccr7*, *Bcl11b* y *Rorc*, se induzcan cuando se expresa TCF1. En etapas más tardías se ha hallado un importante papel de TCF1 en el desarrollo de los timocitos DP junto con HEB, de forma que estos dos FT se unen juntos en alrededor de 7.000 sitios de unión en todo el genoma, determinando la aparición de zonas accesibles en la cromatina<sup>257</sup>. TCF1 actúa inhibiendo la señaliza-

ción de Notch y protegiendo a HEB de la degradación proteosómica, estableciendo los perfiles epigenéticos y de transcripción de los timocitos DP. También se ha demostrado que TCF1 y LEF1 cooperan para reprimir genes relacionados con células T CD4<sup>+</sup> en células T CD8<sup>+</sup> a través de la actividad de HDAC<sup>258</sup>. Además se ha demostrado que TCF1 es necesario para el desarrollo de las células NK<sup>259</sup>.

### 5.2.3. GATA3

Los FT de la familia GATA están muy conservados, caracterizándose por tener uno o dos dedos de zinc tipo C2C2 en su DBD que reconoce la secuencia WGATAR (donde W puede ser A o T y R puede ser A o G)<sup>260</sup>. Los seis miembros esta familia, GATA1-6, tienen una estructura común con un dominio de transactivación en la región amino-terminal y un DBD en la región carboxilo-terminal. GATA3 es el miembro de la familia expresado en células del linaje T, en desarrollo y maduras, células NK y NK-T<sup>261,262</sup>. *Gata3* es uno de los primeros genes expresado por las células progenitoras durante su compromiso al linaje T, teniendo un papel esencial en la supervivencia, crecimiento y compromiso a este linaje<sup>260</sup>. Como la delección de *Gata3* provoca letalidad en el embrión, el análisis del papel de GATA3 en el desarrollo de las células T se realizó generando ratones quiméricos *Gata3*<sup>-/-</sup> *Rag2*<sup>-/-</sup>, mediante la inyección de ESC *Gata3*<sup>-/-</sup> en blastocistos de ratones *Rag2*<sup>-/-263,264</sup>. Estos ratones no generan linfocitos T, pero el desarrollo de las células B y NK es normal, por lo que GATA3 es necesario para el desarrollo de las células T. GATA3 es necesario para la expresión de proteínas importantes para este linaje, como BCL11b y CD3ε. Los efectos de GATA3 son dependientes de su dosis de forma que tanto si se expresa demasiado como si no se expresa, se inhibe el desarrollo de los linfocitos T<sup>265</sup>. En el primer caso se produce una diferenciación de los precursores de células del linaje T hacia mastocitos, mientras que su falta impide el desarrollo de los linfocitos T.

La expresión de GATA3 se incrementa gradualmente desde la etapa DN1 a DN3, disminuyendo en timocitos DN4 y subiendo otra vez en timocitos DP, mientras que tiene una expresión diferencial en timocitos SP CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, siendo alta en SP CD4<sup>+</sup> y baja en CD8<sup>+</sup> SP<sup>266</sup>. Mediante ratones *Gata3*<sup>-/-</sup> condicionales en timocitos DN3a se demostró que GATA3 es necesario para la selección-β, observándose una acumulación de timocitos DN3a y una reducción de timocitos DN4, DP y SP<sup>267</sup>. En ausencia de GATA3, las células DN3a no llevan a cabo de forma adecuada el incremento de tamaño que acompaña a la expresión del pre-TCR y la mayoría de las células DN4 no expresan la cadena TCRβ<sup>267</sup>. La expresión de

GATA3 aumenta con la señalización mediada por el TCR $\alpha\beta$  y regula la diferenciación de timocitos SP CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>268,177</sup>. GATA3 también tiene un papel fundamental en la diferenciación de los linfocitos Th2 y células NK<sup>269,262,267</sup>. El papel de GATA3 durante la selección positiva y la diferenciación de los linfocitos Th2 está mediado a través de MYB, el cual activa la expresión de GATA3, por lo que hay un circuito de regulación entre estos dos FT<sup>178,270,271</sup>.

#### 5.2.4. BCL11b

BCL11B pertenece a la familia de FT con dedos de zinc tipo C2H2 Kruppel, que es la familia más grande en eucariotas y se expresa en progenitores de linfocitos T y en células epiteliales, neuronales y cerebrales<sup>272</sup>. Se trata de un FT que es imprescindible para el desarrollo temprano de las células T<sup>273,274</sup>. Los ratones *Bcl11b*<sup>-/-</sup> presentan una proliferación incrementada y un bloqueo en la etapa DN2. Aunque no se expresa en timocitos DN1, BCL11B comienza a expresarse en la transición de timocitos DN1 a DN2, estando presente en las siguientes etapas del desarrollo. Tras recibir la señalización de Notch, los DN1 progresan a timocitos DN2a, donde se detecta por primera vez la activación de *Bcl11b*. En la transición de timocitos DN2a a DN2b hay un incremento en la expresión de BCL11B, perdiéndose el potencial para generar células NK y células dendríticas. Para la activación de la transcripción del gen *Bcl11b* y el compromiso hacia células T, además de la señalización de Notch, se necesita la participación de otros FT como RUNX1, TCF1 y GATA3<sup>275</sup>. GATA3 y TCF1 son dianas de la señalización de Notch, mientras que RUNX1 es un FT “heredado” pero que es también dependiente de Notch en HSC. GATA3 y TCF1 forman un circuito de retroalimentación positiva, controlando la entrada hacia un estado preparado para la activación transcripcional de *Bcl11b*, pero que son innecesarios para la expresión estable de BCL11B. De esta forma, NOTCH, GATA3 y TCF1 actúan para permitir la expresión de BCL11B, mientras que RUNX1 es responsable de determinar la magnitud de la expresión. De esta forma, estos FT colaboran de manera asincrónica para controlar la expresión de BCL11B.

Aunque los timocitos DP de ratones *Bcl11b*<sup>-/-</sup> no tienen defectos en la expresión del TCR $\alpha\beta$ , fallan al recibir la señalización necesaria para la iniciación de la selección positiva, con una función defectuosa de las ERK y un bajo flujo de Ca<sup>2+</sup> intracelular, por lo que tienen un incremento en la susceptibilidad a la apoptosis<sup>274,272</sup>. Por tanto, BCL11B juega un papel

importante en el establecimiento de la señalización del TCR $\alpha\beta$  en células DP necesaria para la producción de linfocitos T  $\alpha\beta$  y células iNK-T.

### 5.2.5. HEBAlt

Como se ha mencionado anteriormente, HEB es codificado por *Tcf12*, con dos isoformas denominadas HEBAlt y HEBCan<sup>198</sup>. A diferencia de HEBCan, cuya transcripción comienza en el exón 1, la transcripción de HEBAlt comienza en un promotor situado justo antes de un exón denominado *Alt*, localizado entre los exones 8 y 9, para dar lugar a una proteína que carece de los exones 1-8 y con un dominio distinto, ALT, en su extremo amino-terminal<sup>238</sup>. Así, este exon *Alt* reemplaza a los exones 1-8 en el transcrito de la isoforma HEBAlt, mientras que en el transcrito HEBCan, el dominio *Alt* no está presente. El DBD es idéntico en ambas isoformas.

HEBAlt se induce en precursores tempranos de timocitos, bajando su expresión en la transición de DN3a a DP, a diferencia de HEBCan cuyo pico de expresión se encuentra en timocitos DP<sup>238</sup>. La expresión de HEBAlt está regulada positivamente por la señalización Notch. La principal función de HEBAlt es la represión hacia linajes alternativos a las células T, promoviendo así la entrada hacia el linaje T de una forma altamente dependiente de señalización de Notch<sup>276</sup>. HEBAlt actúa como colaborador con la señalización de Notch en un bucle de retroalimentación positiva que mantiene la identidad del linaje T, suprimiendo el potencial mielóide antes del compromiso hacia célula T<sup>277</sup>. El efecto represor del linaje mielóide de HEBAlt está mediado por su capacidad de inhibir la función de E2A y de interactuar con NOTCH1, TCF1, GATA3, BCL11B y GFI1B para formar una red de interacciones que inician el programa de las células T. Así pues, HEBAlt y HEBCan desempeñan papeles distintos durante el desarrollo de los linfocitos T: HEBAlt es importante en etapas tempranas induciendo la expresión de genes de linaje T y suprimiendo la mielopoyesis dentro del timo, mientras que HEBCan parece implicado en las etapas de selección- $\beta$  y selección positiva, y en reprimir el linaje NK<sup>198</sup> (ver sección 3.1.3. de la Introducción). Por tanto, se puede concluir que HEBAlt y HEBCan son FT funcionalmente distintos, siendo HEB-Alt específicamente necesario para la eficiente generación de precursores tempranos de células T<sup>277</sup>.

### 5.2.6. PU.1

PU.1, codificado por el gen *Sp1*, es un FT de la familia ETS con múltiples funciones en la hematopoyesis<sup>278</sup>. Está expresado en HSC, MPP, células mieloides, células B y células

progenitoras de células T. Su acción es importante o indispensable para la generación de todos los precursores hematopoyéticos conocidos con potencial de desarrollo linfoide, y por tanto, para el desarrollo de células B, NK y T. PU.1 se une a motivos (A/G)AGGAAGTG, actuando como un FT pionero en el desplazamiento de nucleosomas para dejar sitios accesibles para la unión de otros FT.

PU.1 se expresa a altos niveles en células DN1 y su expresión comienza a bajar drásticamente en la transición de timocitos DN1 a DN2, siendo prácticamente indetectable en timocitos DN3a<sup>279,278</sup>. Aunque el mecanismo del silenciamiento de PU.1 durante el desarrollo de las células T no está muy claro, parece estar mediado por GATA3, TCF1, LEF1 y, especialmente, RUNX1. De todas formas, para que PU.1 ejerza su papel en la progresión desde MPP al linaje T se necesita la señalización de Notch, ya que en su ausencia las células adoptan un perfil mieloide o de célula dendrítica<sup>280</sup>. PU.1 regula la expresión de IL-7R y FLT3, los cuales están implicados en la proliferación y diferenciación de células T<sup>134,281</sup>. La regulación temporal de este PU.1 está conservada en humanos y ratones, y su desregulación está asociada con la aparición de leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (*T cell-Acute Lymphoblastic Leukemia*, T-ALL), como consecuencia de translocaciones que promueven la expresión anormal y elevada de este FT<sup>282</sup>.

### 5.2.7. C/EBP $\alpha$

C/EBP $\alpha$  forma parte de la familia C/EBP junto a otras cinco isoformas: C/EBP $\beta$ , C/EBP $\gamma$ , C/EBP $\delta$ , C/EBP $\epsilon$  y C/EBP $\zeta$  que reconocen la secuencia consenso CCAAT<sup>283,284</sup>. Estructuralmente consta de un DBD en su extremo carboxilo-terminal, la cual está conservada entre todos los miembros de la familia. Esta región se encuentra dentro de un dominio bZip, que es indispensable para la formación de homodímeros y heterodímeros con otros miembros de la familia y también está implicada en la interacción con otros FT, como PU.1, JUN, RUNX1 y ETS1. Por otro lado, en el extremo amino-terminal se encuentran tres dominios de transactivación capaces de interactuar con componentes de la maquinaria transcripcional, reguladores del ciclo celular y remodeladores de cromatina. La existencia de dos sitios de inicio de la traducción distintos da como resultado la expresión de una proteína larga de 42 kDa, p42, y una isoforma corta de 30 KDa, p30, que difieren en que p30 carece de dos dominios de transactivación, pero ambas dimerizan con otros miembros de la familia y regular la expresión de genes que gobiernan la diferenciación celular, el crecimiento, la supervivencia, el metabolismo y la inflamación.

En el sistema hematopoyético, C/EBP $\alpha$  es importante para la función de HSC, regulando la diferenciación de las células mieloides, siendo uno de los principales interruptores que debe ser silenciado por otros TF para que no tenga lugar el proceso de mielopoyesis<sup>285</sup>. C/EBP $\alpha$  ejerce sus funciones reguladoras génicas a través de su interacción con otros TF y reguladores epigenéticos, actuando como un factor pionero encargado de abrir la cromatina en regiones específicas mieloides en cooperación con PU.1 y RUNX1<sup>283,285,286</sup>. La interacción de C/EBP $\alpha$  con HAT, como CBP y p300, y el complejo remodelador de cromatina SWI/SNF es importante para su función<sup>283</sup>. Se ha establecido la existencia de un eje bien definido en el que la señalización de Notch regula positivamente la expresión de HES1, poco después de la entrada al timo y coincidiendo con la generación de ETP, que es responsable del silenciamiento del gen *Cebpa*, inhibiendo, por tanto, el desarrollo mieloides<sup>248</sup>. De esta manera, NOTCH1, HES1 y C/EBP $\alpha$  forman parte de una red de regulación genética que establece la identidad de las células T.

### **5.3. FT activados por la señalización de IL-7**

#### **5.3.1. STAT5**

STAT5 pertenece a la familia de proteínas transductoras de la señal y activadoras de la transcripción STAT, formada por un conjunto de FT conservados en la evolución, los cuales transducen la señal mediada por receptores de citoquinas y hormonas que reconocen la secuencia TTC(T/C)N(G/A)GAA<sup>287</sup>. STAT5 consiste en un dímero formado por proteínas, STAT5a y/o STAT5b, codificadas por dos genes muy próximos, *Stat5a* y *Statb*, que han derivado de un evento de duplicación relativamente reciente<sup>288</sup>. Estructuralmente las proteínas STAT5a y STAT5b son muy similares y constan de un dominio amino-terminal implicado en promover la dimerización, un DBD, un dominio SH2, un residuo de tirosina regulador y un dominio en carboxilo-terminal de transactivación. El dominio amino-terminal juega un importante papel a la hora de generar dímeros específicos de STAT5<sup>289,290,287</sup>. El DBD del dímero de STAT5 interactúa con secuencias del tipo TTCXXXGAA, aunque también puede unirse como un tetrámero en motivos consenso separados por 6 ó 7 bases, lo cual resulta en una unión menos específica<sup>291</sup>. Hasta la fecha los resultados obtenidos muestran que STAT5a y STAT5b se unen a motivos similares en el ADN, aunque hay sutiles diferencias en sus preferencias de unión al DNA. El dominio SH2 de STAT5 está implicado en la interacción inicial con los residuos de tirosina fosforilados de la cola citoplasmática del IL-7R. Esto permite a las quinasas JAK fosforilen el residuo de tirosina regulador de STAT5a

y/o STAT5b, lo cual resulta en la liberación de STAT5 del complejo activado del IL-7R y la formación de los dímeros del FT, los cuales pueden translocarse al núcleo para unirse a los promotores de sus genes diana. Los repertorios de los genes diana para STAT5a y STAT5b principalmente se solapan, lo cual implica redundancia, aunque existen sitios donde se encuentran diferencialmente unidos, lo cual implica especificidad<sup>292</sup>. De hecho, se han detectado mutaciones germinales en el gen *STAT5B* humano que causan ciertas anomalías clínicas, lo que indica que STAT5a no puede compensar totalmente la pérdida de función de STAT5b.

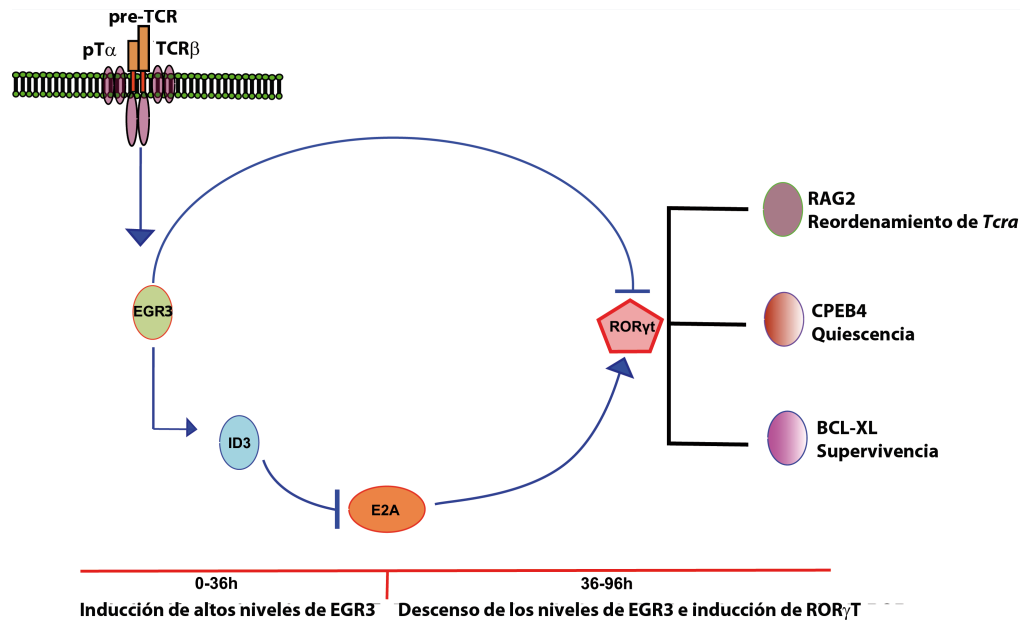
STAT5 se expresa en todos los linfocitos y juega un papel clave en múltiples aspectos de su desarrollo y su función<sup>293,290</sup>. STAT5 se activa por varias citoquinas, con receptores poseedores de cadena  $\gamma_c$ , como los de IL-2, IL-4, IL-7, IL-13 e IL-15, así como algunos con receptores independientes de  $\gamma_c$ , como el de linfopoyetina tímica estromal (*Thymic Lymphopoyetin Stromal Protein*, TLSP), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*Granulocyte and Macrophage-Colony Stimulating Factor*, GM-CSF) e IL-27. Este FT es crítico para el desarrollo de células T  $\gamma\delta$  al regular los reordenamientos del gen *Tcr $\gamma$* <sup>129,294,295,296</sup>, así como para la expansión de los timocitos DN4<sup>65</sup> a través de la señalización mediada por IL-7R. Por otro lado, la señalización IL-7R/STAT5 juega un importante papel en la generación de células T CD8<sup>+</sup> ya que un incremento de la señalización de STAT5 promueve dicha diferenciación al regular positivamente la expresión de RUNX3<sup>162</sup>.

#### **5.4. FT inducidos por la señalización del pre-TCR**

La señalización del pre-TCR puede resumirse en dos fases (Figura 8): una fase inicial que abarca desde el estadio DN3a al estadio ISP y una segunda fase que llega hasta el estadio IDP<sup>297</sup>. En la fase inicial, el fenómeno que se da por excelencia es la proliferación, acompañada por un perfil molecular característico donde se observa una gran abundancia del factor NFATc1 en el núcleo y un aumento de la expresión de EGR3 e ID3. En esta etapa hay también una bajada en la expresión de CD25 (cadena de IL-2R), se dejan de expresar la cadena pre-T $\alpha$  y las proteínas RAG1 y RAG2, y comienzan a aparecer los primeros transcritos germinales del gen *Tcra*. A diferencia de la fase inicial, durante la segunda fase hay muy poca expresión de EGR3 e ID3, hecho que facilita la unión de las proteínas E2A y HEB al ADN y la inducción de ROR $\gamma$ t, que junto a las proteínas E, activan la expresión de RAG1 y RAG2, lo cual promueve el inicio de los reordenamientos del gen *Tcra*, y la expresión de BCLxL, lo cual aumenta la supervivencia celular. Además en esta segunda fase, los timoci-



tos dejan de proliferar, entrando en un estado de quiescencia que inhibe la degradación de las proteínas RAG<sup>298</sup>. Además de estos FT, GATA3, MYB y RUNX1 tienen un papel fundamental durante la señalización mediada por el pre-TCR y la selección- $\beta$ <sup>196,176,267</sup>, así como los FT AP1 (Activation Protein-1), NF $\kappa$ B, EGR1 y ETS1 (*E26 Transformation Specific I*)<sup>299</sup>.



**Figura 8. Fases de la señalización del pre-TCR.** En la fase inicial que abarca las primeras 36 horas (h) se observa una gran abundancia del factor NFATc1 y un aumento de la expresión de EGR3 (círculo verde) e ID3 (círculo azul). También hay una bajada en la expresión de CD25, se deja de expresar la cadena pre-T $\alpha$  y las proteínas RAG1 y RAG2 y aparecen los primeros transcritos germinales del gen *Tcra*. En la segunda fase que va desde las 36 a las 96 h hay muy poca expresión de EGR3 e ID3, hecho que facilita la unión de las proteínas E2A (óvalo naranja) y HEB al ADN y la inducción del TF ROR $\gamma$ t (pentágono rosa), que junto a las proteínas E activan la expresión de RAG1 y RAG2 (círculo marrón), lo que promueve los reordenamientos del gen *Tcra* y la expresión de BCL-xL (círculo morado) aumentando la supervivencia y CPEB4 (círculo rojo) haciendo que los timocitos dejen de proliferar entrando en un estado de quiescencia que evita la degradación de las proteínas RAG.

#### 5.4.1. NFAT

La familia de FT NFAT está formada por cuatro miembros NFATc, NFATc1-4, y NFAT5 que se unen a la secuencia consenso GGAAA<sup>300</sup>. Los NFATc están regulados por los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólico y el sensor de Ca<sup>2+</sup> calmodulina. La actividad de estos FT depende de la desfosforilación de los mismos mediada por calcineurina, fosfatasa de serina y treonina dependiente de Ca<sup>2+</sup>. La calcineurina activada se une directamente a NFATc fosforilado en el citoplasma, desfosforilándolo e induciendo su translocación al núcleo que se unen al ADN para la expresión de sus genes diana.

Los FT NFATc llevan a cabo diferentes papeles en el desarrollo de los linfocitos T, siendo importantes en procesos como la diferenciación, proliferación y supervivencia<sup>300</sup>. Durante la primera fase o fase proliferativa de la señalización mediada por el pre-TCR, NFATc1 se acumula en el núcleo de los timocitos, debido a que la calcineurina es activada mediante las señalizaciones del pre-TCR<sup>300,301,302,297</sup>. La ausencia tanto de calcineurina, como de NFATc1 (también llamado NFAT2) o NFATc3 (también llamado NFAT4) causa defectos en el desarrollo temprano de los timocitos, a consecuencia de un bloqueo parcial en el estadio DN3a con una reducción significativa de timocitos DP, mientras que la expresión forzada de NFATc1 omite parcialmente la necesidad del pre-TCR durante la selección- $\beta$ <sup>303,304,305,306,307</sup>. Los FT NFATc son también activados por la señalización mediada por el TCR $\alpha\beta$  en timocitos DP, regulando la selección positiva a través de la regulación de la apoptosis mediada por BCL2<sup>308,306</sup>. El mecanismo de acción de NFATc1 parece ser la activación de la expresión de ID3 para inhibir la acción de E2A y HEB<sup>297</sup>.

NFAT5 es una proteína independiente de la calcineurina que inicialmente se describió como un FT de respuesta a ósmosis. Sin embargo, NFAT5 también regula procesos independientes al estrés osmótico, como es la respuesta transcripcional de los macrófagos al ser activados por patógenos a través de su receptor de tipo Toll<sup>309</sup>. En el timo, la expresión de NFAT5 está regulada por la señalización mediada por el pre-TCR, de forma independiente del estrés osmótico<sup>150</sup>. La delección de NFAT5 en timocitos tempranos demostró que este FT facilita la supervivencia de los timocitos y la exclusión alélica de la cadena TCR $\beta$  durante la señalización del pre-TCR, pero no se necesita para la selección positiva o negativa de los timocitos DP inducida por el TCR $\alpha\beta$ . El efecto de NFAT5 durante la selección- $\beta$  podría estar asociado a una expresión aumentada de BCL2 y p53/NOXA. Se ha identificado otra vía alternativa de activación de NFATc y NFAT5 mediada por IL-7R con un papel crítico en el desarrollo de los linfocitos<sup>310</sup>.

#### **5.4.2 EGR**

Los FT EGR constituyen una familia que comprende cuatro miembros, EGR1-4, que contienen un DBD compuesto por tres dedos de zinc y reconocen una secuencia de ADN rica en GC<sup>311,312</sup>. Estos FT se expresan en muchos tipos celulares y su expresión es rápidamente inducida en respuesta a mitógenos, diferenciación, señales de apoptosis y daño tisular. De los cuatro miembros de la familia, EGR1, EGR2 y EGR3 se expresan durante el desarrollo de los timocitos<sup>313</sup>. EGR1 y EGR3 se inducen por la señalización del pre-TCR y son im-

portantes para la transición de timocitos DN3a a DP. La transcripción de *Egr1* se induce durante la transición de timocitos DN3 a DN4 por la activación de la PKC, como consecuencia de la señalización del pre-TCR o por tratamiento con ésteres del forbol que activan esta quinasa (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*, PMA), mientras que la transcripción de *Egr2* y *Egr3* es dependiente de la señalización mediada por  $Ca^{2+}$ , con un pico de expresión también muy rápido<sup>313,314</sup>. La sobreexpresión de EGR1 o EGR3 en ratones deficientes en la señalización del pre-TCR induce la selección- $\beta$ , baja la expresión de *Rag1*, *Rag2* y *Ptcr* e induce la transcripción del locus *Tcra*, características muy similares a la señalización mediada por el pre-TCR<sup>313,315,316</sup>. Los ratones *Egr1*<sup>-/-</sup> o *Egr2*<sup>-/-</sup> tienen una selección- $\beta$  normal, pero un defecto en la selección positiva, mientras que los ratones *Egr3*<sup>-/-</sup> tienen un bloqueo parcial en la etapa DN3, que es en gran parte debido a un defecto en la proliferación de las células DN4<sup>317</sup>. Los ratones *Egr1*<sup>-/-</sup>*Egr3*<sup>-/-</sup> presentan una reducción severa del número de timocitos, con una reducción del ratio DN4/DN3<sup>318</sup>. Esta baja celularidad tímica es debida a la apoptosis masiva de los timocitos debida a un defecto en su supervivencia, la cual no se observa en los ratones *Egr1*<sup>-/-</sup> o *Egr3*<sup>-/-</sup>, sugiriendo que existe una función redundante entre EGR1 y EGR3. Al igual que EGR1 y EGR3, EGR2 también se induce por la señalización del pre-TCR en timocitos DN3a<sup>313</sup>. La sobre-expresión de EGR2 también induce una bajada en la expresión de los genes *Rag1* y *Rag2*, indicando una función redundante entre EGR1, EGR2 y EGR3. En ratones *Egr2*<sup>-/-</sup>, además de observarse un defecto similar a los observados en ratones *Egr1*<sup>-/-</sup> y *Egr3*<sup>-/-</sup>, se observa un aumento en la maduración de timocitos DP a SP, indicando un papel específico de EGR2 durante la selección positiva<sup>319</sup>.

Los FT EGR actúan conjuntamente con otros FT para mediar la transcripción de genes específicos de linfocitos. La cooperación entre EGR1 y NFATc1, inducidos a través de la ruta de las MAPK y  $Ca^{2+}$  respectivamente, favorece una eficiente progresión de los timocitos a través de la selección- $\beta$ , colaborando en la transactivación varios genes, tales como *Il2*, *Tnfa*, *Cd154* y *Fasl*<sup>152</sup>.

### 5.4.3. ID3

Como se ha comentado anteriormente, durante la primera fase o fase proliferativa de la señalización mediada por el pre-TCR, ID3 se induce suprimiendo así la actividad de las proteínas E transitoriamente, mientras que durante la segunda fase o fase quiescente de esta señalización se inhibe la expresión de ID3<sup>205,297</sup>. La inhibición de la función de E2A/HEB mediada por ID3 durante la primera fase de esta señalización causa la inhibición de la expre-

sión de NOTCH1, pre-T $\alpha$ , RAG1 y RAG2, mientras que la inhibición de la expresión de ID3 en la segunda fase, permite que E2A/HEB puedan ejercer su función, dando lugar a la inducción del ROR $\gamma$ t y a la re-expresión de RAG1 y RAG2, necesaria para la inducción de la recombinación del gen *Tcra*<sup>201,297</sup>.

#### 5.4.4. ROR $\gamma$ t

ROR $\gamma$ t y ROR $\gamma$  son dos isoformas codificadas por el gen *Rorc* que difieren solo en 21 aminoácidos del extremo amino-terminal con DBD idénticos<sup>320,321</sup>. Estos TF reconocen una secuencia denominada RORE (*ROR element*) cuyo consenso es AGGTCA, precedida por 5 pb ricas en A/T. ROR $\gamma$ t se expresa principalmente en timocitos y células Th17, mientras que ROR $\gamma$  se expresa en numerosos tejidos. La expresión de ROR $\gamma$ t se induce en la transición de DN a DP en el desarrollo de células T. Los ratones *Rorc*<sup>-/-</sup>, deficientes en ROR $\gamma$  y ROR $\gamma$ t, o con el dominio DBD mutado muestran una reducción del 60-80% de timocitos DP<sup>322</sup>. Esto es debido a un incremento significativo en la apoptosis de las células DP, debido a una drástica reducción en la expresión del factor anti-apoptótico BCLxL<sup>320,321</sup>. Debido a la disminución de duración de la vida de los timocitos DP, los ratones *Rorc*<sup>-/-</sup> presentan solo reordenamientos primarios del gen *Tcra*, afectando al repertorio de las células T  $\alpha\beta$  (ver sección 8.1 de la Introducción) y generación de las células iNK-T<sup>323,321</sup>. ROR $\gamma$ t es además un FT clave para el linaje de células Th17 y el desarrollo de células linfoides innatas residentes en el intestino y otros tejidos de barrera<sup>324,325</sup>.

#### 5.4.5. AP1

AP1 constituye una familia de FT formados por una variedad de dímeros de las familias FOS y JUN, caracterizados por tener motivos bZip que reconocen la secuencia TGA(G/C)TCA<sup>326</sup>. Las proteínas FOS: FOS, FOSB, FRA1 y FRA2 solo pueden heterodimerizar con miembros de la familia JUN: JUN, JUNB y JUND, mientras que las proteínas JUN pueden homodimerizar consigo mismas, para formar dímeros transcripcionalmente activos. Los distintos heterodímeros formados por diferentes combinaciones de JUN-JUN o JUN-FOS reconocen secuencias de ADN similares, pero con diferentes afinidades y actividades de transactivación. Las proteínas FOS y JUN se activan por fosforilación a través de las quinasas ERK y JNK (*Jun N-terminus Kinase*). La principal forma activa de AP1 ocurre a través de la fosforilación de JUN por JNK. La fosforilación de su dominio de transactivación hace que se incremente la transcripción de sus genes diana, siendo uno de los cuales el propio *Jun*. Se pueden observar cambios en la unión de AP1 al ADN debido a variaciones en

la expresión de los genes *Fos* o *Jun* provocadas por la diferente estabilización de los dímeros formados o por cambios en las quinasas y fosfatasa que actúan sobre ellos.

Los ratones *Jun*<sup>-/-</sup> presentan una elevada letalidad embrionaria<sup>327</sup>, por este motivo se generaron ratones quiméricos *Jun*<sup>-/-</sup>/*Rag2*<sup>-/-328</sup> o ratones *Jun*<sup>-/-</sup> condicionales<sup>329</sup>, demostrándose que el papel de AP1 sobre el desarrollo de las células T depende de JUN, mientras que en estudios previos, en los que se delecionaron los genes *Junb*, *Jund* o *Fos*, no se evidenciaron efectos sobre el desarrollo de las células T. El análisis de los ratones *Jun*<sup>-/-</sup> mostró un incremento en el número de linfocitos T  $\gamma\delta$ , mientras que los linfocitos T  $\alpha\beta$  no llegan a madurar debido a un bloqueo en la etapa DN3a. En etapas más tardías de maduración, concretamente en timocitos DP, hay una bajada en la expresión de AP1 que provoca un descenso en la producción de citoquinas, tales como IL-2, y, por consiguiente, una limitada proliferación celular<sup>330</sup>. AP1 colabora junto con otros FT de las familias NFAT y EGR, modulando la actividad de elementos reguladores como el *enhancer* del locus *Tcra*, *E $\alpha$* , el cual empieza a activarse tras la selección- $\beta$ <sup>314</sup>.

#### 5.4.6. NF $\kappa$ B

NF $\kappa$ B está formado por un heterodímero de las proteínas REL (REL, RELA y RELB) y p50 (NF $\kappa$ B1 y NF $\kappa$ B2), que en estado inactivo se encuentran formando un complejo con la proteína inhibitoria I $\kappa$ B en el citosol<sup>331</sup>. Las proteínas REL contienen el dominio de activación. La activación del pre-TCR o el TCR $\alpha\beta$ , TLR (Toll-Like Receptors) o receptores de linfoquinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*, TNF) o IL-1 $\beta$ , dan lugar a la activación de la quinasa de I $\kappa$ B (*I $\kappa$ B Kinase*, IKK). IKK fosforila a I $\kappa$ B y la dirige a su ubiquitinación y degradación por el proteosoma, dejando libre al NF $\kappa$ B activo, el cual entra en el núcleo para activar sus genes diana a través de su reclutamiento a sitios GGGRNYYCC. Este FT es de acción rápida ya que no necesita ser sintetizado *de novo*, tal como ocurre en el caso de los FT NFAT, EGR, AP1 o STAT5.

El papel de este FT durante el desarrollo de los linfocitos T no está del todo claro, pero participa en la regulación de la selección- $\beta$ , la selección positiva y en los procesos madurativos de los linfocitos CD4<sup>+</sup> a células Treg<sup>331</sup>. Los timocitos DN1 y DN2 expresan bajos niveles de NF $\kappa$ B, con un pico de expresión en timocitos DN3a y una bajada en timocitos DN4 y DP. La supervivencia y diferenciación de los timocitos DN3a depende de la activación de NF $\kappa$ B por la señalización del pre-TCR, posiblemente debido a la implicación de este

FT en la división celular de estas células. Durante la selección positiva, NFκB está implicado en la diferenciación de los timocitos DP a SP CD8<sup>+</sup>, mientras que no se necesita para la diferenciación a SP CD4<sup>+</sup>.

#### 5.4.7. ETS1

ETS1 (*Erythroblast Transformation-Specific 1*) juega un papel importante en la diferenciación de los linfocitos T αβ y las células NK<sup>332</sup>. ETS1 reconoce los sitios CGGAA(T/G) (sitio canónico de ETS1) y AGGAAG (sitio similar a PU.1). La expresión de ETS1 aumenta mucho en la transición de los timocitos DN3a a DP, de forma coincidente con la señalización por el pre-TCR. ETS1 es esencialmente un activador transcripcional que necesita unirse junto a otros FT para ejercer su función, asociándose preferentemente con RUNX1 en timocitos DN3a y con TCF1 en timocitos DP. Los ratones *Ets1*<sup>-/-</sup> tienen defectos en la selección-β y la selección positiva, la activación celular de los linfocitos T αβ, en la respuesta Th1 y la diferenciación de las células Th17. ETS1 contribuye a la diferenciación de los timocitos DP a SP CD8<sup>+</sup> debido a su implicación en la terminación de la expresión de CD4 a través de la inducción de RUNX3<sup>333</sup>. Además se trata de un oncogén, cuya translocación está relacionada con la generación de leucemias.

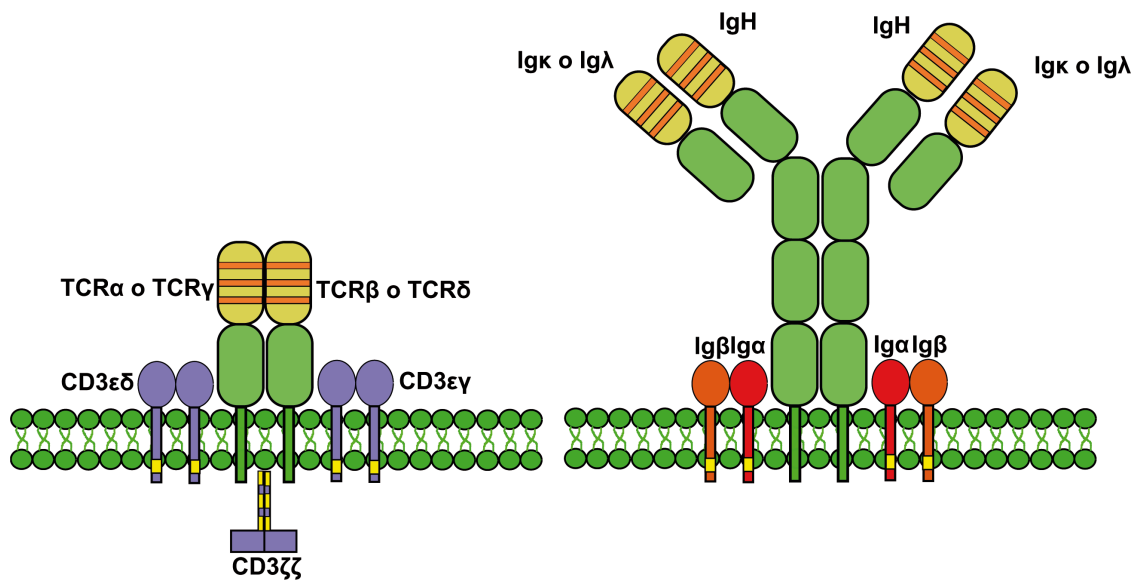
### 6. Receptores de antígeno linfocitos T, TCR

Desde hace años es conocido que la inmunidad adaptativa en vertebrados complejos es mediada por los receptores de antígeno, TCR en linfocitos T e Ig en linfocitos B, los cuales tienen una estructura característica con rasgos comunes entre ellos que les permite reconocer una gran variedad de moléculas no propias, denominadas antígenos (Figura 9).

#### 6.1. Estructura del TCR

Según el tipo de TCR que presente un linfocito T maduro, los linfocitos se clasifican en linfocitos T αβ y γδ. Estos receptores son únicos de cada linfocito T, es decir son clonotípicos, reconociendo antígenos específicos. Los TCRαβ reconocen péptidos antigénicos presentados por el MHC (de clase I o II) presente en la membrana de las llamadas células presentadoras de antígeno, mientras que los TCRγδ reconocen glicolípidos asociados a la molécula CD1<sup>334</sup>. Las células presentadoras de antígeno captan y procesan los antígenos, para presentarlos a los linfocitos T αβ en forma de péptidos asociados al MHC en la membrana celular.

Tanto el TCR $\alpha\beta$  como el TCR $\gamma\delta$  están formados por heterodímeros de cadenas peptídicas variables unidas por puentes disulfuro (Figura 9): TCR $\alpha$  y TCR $\beta$  en el caso del TCR $\alpha\beta$ , y TCR $\gamma$  y TCR $\delta$  en el caso del TCR $\gamma\delta$ <sup>334,335</sup>. Estas cadenas variables son responsables del reconocimiento antigénico y están asociadas a otras cadenas invariables del complejo CD3, que son imprescindibles para que el complejo se exprese en la membrana y para la transducción de las señales. Estas cadenas del CD3 incluyen CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  y CD3 $\zeta$ . Al igual que las cadenas variables, las cadenas CD3 se asocian formando dímeros unidos covalentemente: CD3 $\epsilon\delta$ , CD3 $\gamma\epsilon$  y CD3 $\zeta\zeta$ .



**Figura 9. Estructura de los receptores de antígeno.** Los TCR $\alpha\beta$  están constituidos por dos cadenas variables TCR $\alpha$  y TCR $\beta$  que se encuentran unidas covalentemente por puentes disulfuro asociadas a tres dímeros de cadenas CD3 invariables (CD3 $\delta\epsilon$ , CD3 $\gamma\delta$ , CD3 $\zeta\zeta$ ). Al igual que los TCR $\alpha\beta$ , las Igs están formadas por dos cadenas variables, pero en este caso formadas por una cadena pesada IgH y una cadena ligera Ig $\kappa$  o Ig $\lambda$ , unidas covalentemente por puentes disulfuro asociadas a dos dímeros de cadenas CD79 invariables (CD79 $\alpha\beta$  o Ig $\alpha\beta$ ). En amarillo se representan las regiones variables y en verde las regiones invariables de las cadenas de los TCR e Ig. En morado se representan las cadenas CD3 y en rojo y naranja se representan las cadenas CD79. Con franjas rojas se muestran las regiones hipervariables y en amarillo se representan los motivos ITAM dentro de las cadenas invariables. Ilustración modificada de García-Mariscal A. et al. (2013).

Estructuralmente, las cadenas del TCR están compuestas por dos regiones (Figura 9): una región variable localizada en el extremo amino-terminal y una región constante situada en el extremo carboxilo-terminal<sup>334,335</sup>. A su vez dentro de la región variable se encuentran dos o tres tramos de secuencias hipervariables que reciben el nombre de regiones determinantes de complementariedad (*Complementary Determinant Regions*, CDR), que provienen del reordenamiento de los segmentos génicos V (Variable), D (Diversidad) y J (*Joining* o unión) que forman los genes del TCR e Ig. Las CDR de cada cadena se combinan de forma

tridimensional con los CDR de la cadena complementaria para generar la región variable de reconocimiento antigénico de los receptores. Por otro lado, las regiones constantes de cada cadena TCR están formadas por una parte transmembrana hidrófoba y una corta parte citoplasmática. La función de la región citoplasmática es la de interaccionar física y funcionalmente con el subcomplejo CD3. Las proteínas CD3 poseen en sus dominios citosólicos motivos ITAM, formados por dos residuos de tirosina flanqueados por leucina o isoleucina y separados por aminoácidos aromáticos, que son responsables de transmitir la señal del TCR<sup>336</sup>. La señalización recibida por el TCR desencadena la fosforilación en los residuos de tirosina de los ITAM por quinasas de la familia SRC, lo que conduce a la activación de eventos intracelulares<sup>334,335</sup>, siendo similares para la señalización mediadas por el pre-TCR y el TCR (sección 2.3.1).

## 6.2. Organización genómica de los loci del TCR

### 6.2.1. Loci de los genes *Tcra* y *Tcrd*, *Tcra/Tcrd*

Los genes *Tcra* y *Tcrd* forman un único locus combinado<sup>337,58,338</sup> ([www.imtg.com](http://www.imtg.com)) (Figura 10). Esta organización es compartida en todos los vertebrados desde los peces teleósteos, indicando que estos genes han estado juntos desde hace más de 400 millones de años<sup>339</sup>. En mamíferos y aves, este locus presenta una estructura que impide la coexistencia de reordenamientos de los genes *Tcra* y *Tcrd* en el mismo cromosoma, ya que los reordenamientos del gen *Tcra* tienen como resultado la delección del gen *Tcrd* en un círculo extracromosómico<sup>340,341</sup>. Este locus se encuentra ubicado entre los genes de los receptores olfatorios y *Dad1* en el cromosoma 14, tanto en ratones como humanos<sup>337,58,338</sup>. En la región 5' del locus *Tcra/Tcrd* de ratón, que comprende 1,5-1,8 megabases (Mb) dependiendo de la cepa, se encuentran alrededor de 100 segmentos génicos V, algunos de los cuales algunos, denominados  $V\alpha$ , reordenan solo con los segmentos  $J\alpha$ , otros denominados  $V\delta$  solo lo hacen con los segmentos  $D\delta$ , y otros con ambos, participando en el repertorio de las cadenas  $TCR\alpha$  y  $TCR\delta$ . La región 5' del locus *TCRA/TCRD* humano ocupa 800 Kb y está formado por 46 segmentos  $V\alpha$ ,  $V\delta$  y  $V\alpha/\delta$  funcionales. En la región 3' del locus de ratón o humano, de aproximadamente 0.1 Mb, se encuentran el resto de secuencias necesarias para generar la cadena  $TCR\delta$ : dos segmentos  $D\delta$  en ratón y tres en humanos, dos segmentos  $J\delta$  en ratón y cuatro en humanos, la región que codifica por la región constante de la cadena  $TCR\delta$ ,  $C\delta$ , formada por cuatro exones, y un segmento  $V\delta$  en orientación inversa al resto de segmentos V. A continuación hacia 3' se encuentran las secuencias necesarias para generar la cadena



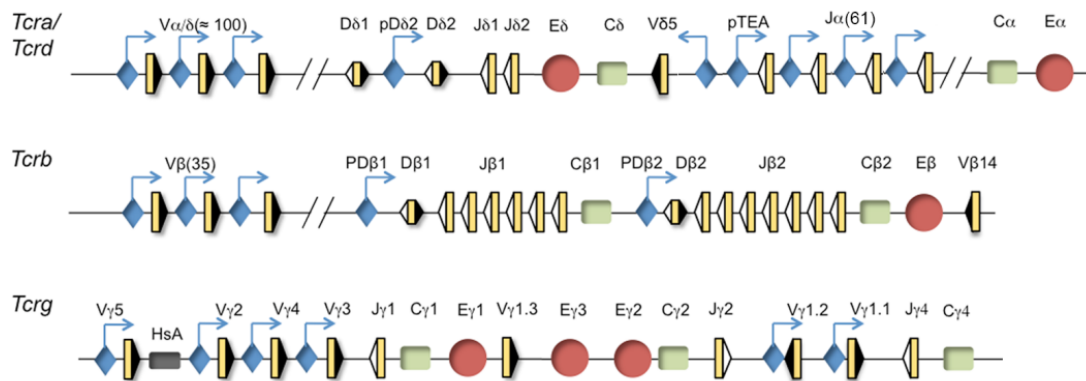
TCR $\alpha$ : 61 segmentos J $\alpha$  y la región constante de la cadena TCR $\alpha$ , C $\alpha$ , formada también por cuatro exones, tanto en ratones como en humanos. La transcripción y recombinación de estos genes están reguladas por promotores asociados a todos los segmentos génicos y dos *enhancers*, E $\alpha$ , asociado con la regulación del gen *Tcra*, y E $\delta$ , asociado con la regulación del gen *Tcrd*. E $\alpha$  se sitúa en el extremo 3' del locus, a continuación de C $\alpha$ , mientras que E $\delta$  se encuentra ubicado entre el segmento J $\delta$  situado más 3' y la región C $\delta$ <sup>337,58</sup>.

### 6.2.2. Locus TCR $\gamma$

El locus TCR $\gamma$  se sitúa en una región relativamente corta de ADN comparada con los otros loci del TCR, ocupando aproximadamente 200 Kb en el cromosoma 13 de ratón y el cromosoma 7 en humanos<sup>58</sup> ([www.imtg.com](http://www.imtg.com)) (Figura 10). El locus de ratón está formado por cuatro clusters de segmentos génicos:  $\gamma$ 1- $\gamma$ 4, conteniendo segmentos V $\gamma$  y J $\gamma$ , y una región constante, C $\gamma$ . En total el locus de ratón está compuesto por 7 segmentos V $\gamma$  funcionales y uno no funcional, y 3 J $\gamma$ -C $\gamma$  unidades funcionales y una no funcional. Como elementos reguladores hay un *enhancer*, E $\gamma$ , situado 3' de cada C $\gamma$  y otro, denominado HSA, en el cluster  $\gamma$ 1, además de promotores transcripcionales asociados a los segmentos génicos V $\gamma$  y J $\gamma$ <sup>342,337,58</sup>. El locus humano está formado por 6 segmentos V $\gamma$  funcionales en el extremo 5' y dos clusters de segmentos J $\gamma$ , cada uno de ellos asociado a un segmento C $\gamma$  y un solo *enhancer* E $\gamma$  situado 3' de la región C $\gamma$ 2.

### 6.2.3. Locus TCR $\beta$

El locus TCR $\beta$  abarca una zona de 670 Kb en el cromosoma 6 de ratón y 620 Kb en el cromosoma 7 humano<sup>58,343</sup> ([www.imtg.com](http://www.imtg.com)) (Figura 10). La región 5' de este locus de aproximadamente 300 Kb está compuesta por 35 segmentos V $\beta$ , 14 de los cuales son no funcionales en ratones y de 500 Kb compuesta por 47 segmentos V $\beta$  en humanos. En la región 3' del locus de ratón y humano existen dos clusters de segmentos D $\beta$ J $\beta$ , formados por 1 segmento D $\beta$  y 6 segmentos J $\beta$ . Los exones que codifican por la región constante del TCR $\beta$ , C $\beta$ , están posicionados 3' a continuación cada cluster D $\beta$ J $\beta$ , denominándose C $\beta$ 1 y C $\beta$ 2, seguidos por un único segmento génico, V $\beta$ 31. Cada segmento V $\beta$  tiene su propio promotor, así como los segmentos D $\beta$ 1 y D $\beta$ 2. Hay un único *enhancer* en este locus, E $\beta$ , situado a 3' de la región C $\beta$ 2.



**Figura 10. Estructura génica de los loci del TCR.** Se representa la estructura génica de los loci *Tcra/Tcrd*, *Tcrb* y *Tcrg*. Los segmentos génicos se representan por rectángulos amarillos y las secuencias señal de recombinación (RSS) con triángulos negros o blancos (según una secuencia espaciadora de 23 pb en negro o de 12 pb en blanco). Para que la recombinación entre dos segmentos génicos ocurra se necesita que las RSS tengan distintas espaciadoras: regla 12/23. Las regiones constantes se representan como rectángulos verdes. Los promotores están asociados a determinados segmentos génicos y se representan en azul. Los *enhancers* se representan como círculos rojos. Ilustración tomada de del Blanco B. et al. (2014).

## 7. Recombinación V(D)J

La recombinación de los segmentos génicos V, (D) y J en los genes *Tcra* y *Tcrb* o *Tcrg* y *Tcrd* durante el desarrollo de los timocitos permite la expresión de un TCR $\alpha\beta$  o TCR $\gamma\delta$ , respectivamente, mientras que la recombinación V, (D) y J de los genes *Igh* e *Igk* o *Igl* durante el desarrollo de los linfocitos B permite la expresión de las Ig<sup>58</sup>. Este proceso, denominado recombinación V(D)J, permite la obtención de un gran repertorio de receptores a partir de una mínima cantidad de material genético (Figura 11). Este proceso depende del reconocimiento de unas secuencias que flanquean los segmentos génicos V, D y J denominadas secuencias señal de recombinación (*Recombination Signal Sequences*, RSS), de forma que estos reordenamientos ocurren exclusivamente en el contexto de los genes de los TCR e Ig. Estos reordenamientos están restringidos a los progenitores de las células T y células B, y no ocurren en otros tipos celulares, por estar mediados por una endonucleasa específica de estas células formada por dos subunidades denominadas RAG1 y RAG2.

### 7.1. Iniciación, corte y ensamblaje de segmentos génicos codificantes

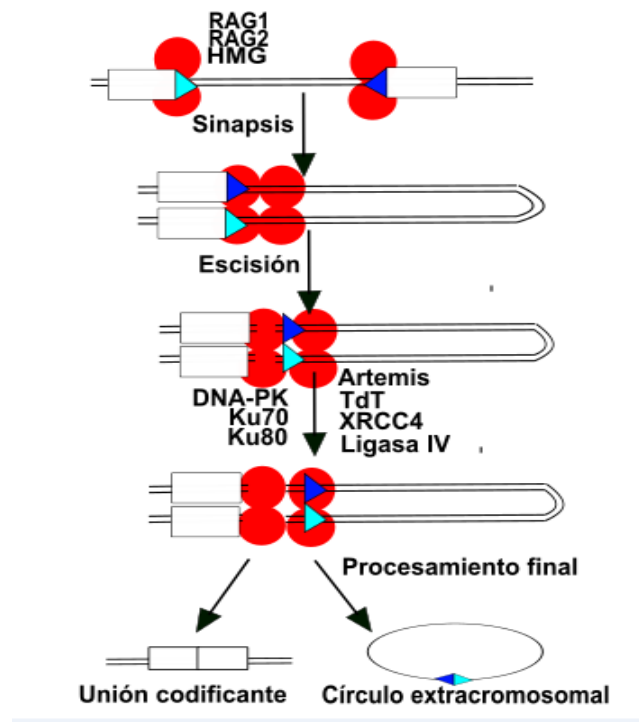
La recombinación V(D)J consiste en el ensamblaje de los segmentos génicos V, (D) y J para generar una nueva organización de un gen que codifica por una cadena de un recep-

tor de antígeno, lo que permite la expresión de una cadena funcional<sup>58</sup>. El ensamblaje de los segmentos V, (D) y J es el proceso responsable de la generación de la diversidad en los receptores de los antígenos en linfocitos T y B, y en torno a su expresión pivota todo el proceso de diferenciación de estas células (Figura 4). De forma resumida, un evento de recombinación V(D)J ocurre en los siguientes pasos: sinapsis entre dos RSS, corte en la doble cadena del ADN, procesamiento y unión de los extremos cortados (Figura 11). La sinapsis consiste en la aproximación de dos segmentos génicos a través de sus RSS, mediada a través de las proteínas RAG1 y RAG2, las cuales reconocen estas secuencias y actúan como una endonucleasa que corta la doble hebra del ADN de forma precisa entre cada segmento génico y la RSS correspondiente. Este proceso da lugar a que dos segmentos génicos tengan un extremo cortado en cada uno de ellos, denominados extremos codificantes, y un fragmento de ADN conteniendo las dos RSS cortadas, cuyos extremos se denominan extremos no codificantes. Los extremos codificantes son procesados mediante un proceso que involucra la pérdida y adición de nucleótidos, aumentando la diversidad de las secuencias en estas uniones, y ligados para restaurar la integridad génica, mientras que los dos extremos no codificantes se ligan entre sí de forma precisa, dando lugar a un círculo extracromosomal que permanecerá estable en el núcleo mientras la célula no se divida pero que se perderá por dilución en sucesivas divisiones celulares.

En función de la especificidad de su expresión se distinguen dos conjuntos distintos de proteínas que participan en la recombinación V(D)J (Figura 11): 1) proteínas específicas de progenitores linfoides: RAG1, RAG2 y la transferasa terminal de deoxinucleótidos (*Terminal dinucleotide Transferase*, TdT), responsable de la adición de nucleótidos en los extremos codificantes; 2) proteínas generales del proceso de reparación de extremos no homólogos: Ku70/80, la proteína quinasa dependiente de ADN (*DNA-dependent Protein Kinase*, DNA-PK), Artemis, ligasa IV y XRCC4, implicadas en la apertura de bucles y reparación de roturas en la doble hélice del ADN.

Para que ocurra la recombinación V(D)J es importante que RAG1 y RAG2 se unan juntas a las RSS de los segmentos que van a resultar recombinados. Una RSS consiste en una secuencia heptamérica y una secuencia nonamérica, ricas en AT y altamente conservadas, que están espaciadas por 12 o 23 pb. Las recombinaciones V(D)J siguen la “regla 12/23”, de manera que un segmento que contenga una RSS con un espaciador de 12 pb solo se recombina con otro que contenga una RSS con un espaciador de 23 pb. Por ejemplo, un segmento V que esté flanqueado por una RSS con una secuencia espaciadora de 23 pb se

puede recombinar con un segmento D que tenga una RSS de 12 pb, pero no con un segmento J que tenga una RSS de 23 pb.



**Figura 11. Mecanismo molecular de la recombinación V(D)J.** Inicialmente las proteínas RAG1, RAG2 y HMG (círculos rojos) se unen juntas a las RSS (triángulos azul claro y azul oscuro). En un segundo paso las proteínas RAG unidas a cada RSS, forman un tetrámero, aproximando los dos segmentos en un proceso conocido como sinapsis. En el siguiente paso, RAG1 y RAG2 cortan la doble hebra dando lugar a una horquilla en los extremos codificantes y a otra estructura con extremos romos no codificantes que contienen las RSS. La estructura con los extremos no codificantes, conteniendo las RSS, es reconocida por el heterodímero Ku70:Ku80 haciendo que se unan también la proteína Artemis, la quinasa DNA-PK y las ligasas IV y XRCC4 que finalmente ligan esta estructura formando un círculo. La estructura con los extremos codificantes dará lugar a la formación de una horquilla de ADN con los segmentos génicos, donde se unen Ku70:Ku80, Artemis que es fosforilada por DNA-PK y Tdt que añadirá nucleótidos nuevos. Finalmente las ligasas IV y XRCC4 ligarán dando lugar a una unión codificante. Ilustración tomada de de Little, A. (2015)

En la primera fase del proceso, RAG1 y RAG2 ayudadas por proteínas de la familia de proteínas de la familia HMG, HMGB1 y HMGB2, capaces de cambiar la conformación de la doble hélice del ADN, se unen juntas a las RSS de dos segmentos que van a recombinarse, interaccionando entre sí para formar un tetrámero capaz de aproximar a los dos segmentos génicos en un proceso llamado sinapsis. Tras la sinapsis, RAG1 y RAG2 cortan la doble hebra del ADN, dando lugar como productos resultantes a una horquilla en cada extremo codificante y dos extremos romos no codificantes conteniendo las RSS. La horquilla formada en cada extremo codificante es abierta por la nucleasa Artemis, la cual es activada mediante fosforilación mediada por DNA-PK, permitiendo que TdT añada nuevos nucleóti-

dos a los extremos abiertos. Los extremos codificantes y no codificantes son reconocidos por el heterodímero Ku70:Ku80, y ligados mediante la acción de la ligasa IV y XRCC4.

## 7.2. Control de la recombinación V(D)J

La recombinación V(D)J es una reacción específica de los genes que codifican para las cadenas de los receptores del antígeno, ya que éstos son los únicos genes del genoma formados por segmentos génicos flanqueados por RSS<sup>337,58</sup>. Por otro lado, la expresión de RAG1 y RAG2 es exclusiva de precursores de linfocitos, limitando la recombinación de los genes de los receptores de antígeno a estos tipos celulares. Pero además este proceso está regulado a otros cuatro niveles que regulan la accesibilidad de las RSS al reconocimiento por RAG1 y RAG2: 1) a nivel del linaje celular, de forma que los genes que codifican para las cadenas de las Ig reordenan exclusivamente en precursores de células B, mientras que los genes de las cadenas del TCR lo hacen solo en precursores de células T; 2) a nivel temporal, de forma que el reordenamiento de cada uno de estos genes ocurre en un determinado momento del desarrollo celular, así los genes *Tcrb*, *Tcrq* y *Tcrd* reordenan en timocitos DN2-DN3a mientras que el gen *Tcra* reordena en timocitos DP, y el gen *Igh*, que codifica para la cadena pesada de Ig, reordena en células pro-B mientras que los genes *Igl* e *Igk*, que codifican para las cadenas ligeras, lo hacen en células pre-B; 3) a nivel de orden de los segmentos génicos, de forma que los reordenamientos DJ ocurren antes que los VDJ en los genes *Tcrb* e *Igh*; y 4) a nivel alélico, de forma que solo uno de los dos alelos reordena productivamente en el caso de los genes *Tcrb*, *Igh*, *Igk* e *Igl*. Aunque el reordenamiento de los genes *Tcra*, *Tcrd* y *Tcrq* no está regulado a nivel alélico, existe un mecanismo de exclusión alélica a la hora de expresar el TCR relacionado con el grado de afinidad que presenten entre sí las cadenas a la hora de emparejarse para ser expresadas juntas en la membrana celular<sup>345,346</sup>.

## 7.3. Regulación de la accesibilidad de las RSS a las proteínas RAG1 y RAG2

El hecho de que las proteínas RAG1 y RAG2 se expresen tanto en los precursores de linfocitos T y como de linfocitos B planteó hace décadas un reto para explicar los cuatro niveles de control anteriormente mencionados, estableciéndose hace 35 años por Yancopoulos et al.<sup>347</sup> el llamado “Modelo de Accesibilidad”. Este modelo postulaba que la accesibilidad de las proteínas RAG1 y RAG2 a las RSS depende de la estructura de la cromatina presente en los distintos segmentos de los genes de las cadenas de receptor de antígeno. En la actualidad este modelo está completamente aceptado ya que ha sido validado experimentalmente<sup>348,349</sup>. Entre los experimentos pioneros que han demostrado este modelo destacan los

siguientes: 1) la verificación que las proteínas RAG1 y RAG2 son capaces de activar la recombinación V(D)J en construcciones exógenas transfectadas en células no inmunes, pero no de los genes endógenos, evidenciando que la cromatina supone un obstáculo para la recombinación<sup>350</sup>; 2) RAG1 y RAG2 solo son capaces de inducir la recombinación de los genes de Ig en núcleos de precursores de linfocitos B, mientras que inducen los reordenamientos de los genes del TCR exclusivamente en núcleos de precursores de linfocitos T<sup>351</sup>; 3) aunque RAG2 es reclutado a todas las regiones transcripcionalmente activas del genoma a través de un dominio PHD (*Plant HomeoDomain*) capaz de reconocer H3K4me3<sup>352,353</sup>, el reclutamiento de RAG1 es específico de las regiones donde está ocurriendo la recombinación V(D)J, llamadas “centros de recombinación”, pero ocurre de forma exclusiva en los genes de Ig en los precursores de linfocitos B y en los genes de los TCR en los precursores de los linfocitos T<sup>354</sup>; además esta accesibilidad está regulada por la actividad transcripcional y la función de los promotores y *enhancers* presentes en estos genes<sup>355</sup>. Estos resultados indican que el reconocimiento de las RSS por RAG1 y RAG2 depende de la accesibilidad de la cromatina en determinados segmentos génicos, la cual depende, a su vez, de la acción de complejos remodeladores de la cromatina reclutados por promotores y *enhancers*. En los genes que codifican para los TCR, H3K9me1 provoca una inhibición de la recombinación V(D)J, ya que estéricamente impide el acceso de RAG1 y RAG2 a las RSS, mientras que H3K4me2 y H3K4me3 y la acetilación de las histonas H3 y H4 mediadas por la activación de los *enhancers* están relacionadas con activación de la recombinación V(D)J<sup>356,357,358,58</sup>. Además, la recombinación V(D)J depende del estado de compactación de los nucleosomas, tanto *in vitro* a través de los complejos SWI/SNF e ISWI<sup>359,360</sup>, como *in vivo* a través de la ATPasa BRG1 del complejo SWI/SNF<sup>356,361,362</sup>.

#### **7.4. Transcripción germinal y recombinación V(D)J**

Antes de que tenga lugar el fenómeno de recombinación V(D)J en un gen determinado de una cadena de receptor de antígeno se detectan unos transcritos no codificantes, denominados transcritos germinales, que son derivados de los segmentos génicos no reordenados susceptibles de ser reordenados. Al igual que ocurre con la recombinación V(D)J, la transcripción germinal tiene los mismos niveles de regulación: linaje, temporal, de segmento génico y alélica. De hecho, la transcripción germinal ocurre prácticamente de forma simultánea a la recombinación V(D)J, siendo ambas consecuencia de la activación de promotores y *enhancers*<sup>347,58</sup>. Estos elementos reguladores reclutan FT que inician y ayudan a propagar los cambios en la estructura de cromatina que son esenciales para la accesibilidad de la

RNAPol2 y las proteínas RAG1 y RAG2. Aunque durante muchos años no estuvo claro si estos dos procesos, transcripción germinal y recombinación V(D)J, eran consecuencias de los cambios de la estructura de la cromatina o existía un efecto de causa-efecto entre ambos, este dilema se aclaró en un elegante y definitivo estudio mediante la introducción de una secuencia bloqueadora de la transcripción entre los segmentos J $\alpha$  del locus *Tcra* de ratón<sup>363</sup>. De esta forma se demostró de forma clara y definitiva que la transcripción germinal es necesaria para la recombinación V $\alpha$ J $\alpha$  en el locus *Tcra*. Se puede decir que para que ocurra la recombinación V(D)J se necesita que ocurra una elongación de la transcripción asociada con la alteración de la estructura de nucleosomas en la región donde se encuentran los segmentos génicos que van a ser recombinados y, consecuentemente, una descompactación de la cromatina, permitiendo que RAG1 y RAG2 puedan reconocer las RSS de los mismos<sup>364</sup>. Los hechos que RAG2 se una a H3K4me3 y que la presencia de esta marca de histonas se establezca por acción de la transcripción mediada por RNAPol2 proporcionan una explicación causal de la transcripción germinal en el proceso de recombinación V(D)J<sup>353,352</sup>. Sin embargo, en los casos en que una RSS se encuentre muy cercana a un promotor, como es el caso del segmento D $\beta$ 1 del locus *Tcrb* de ratón, se ha observado que no se necesita transcripción germinal activa para que esta secuencia quede expuesta al reconocimiento de RAG1 y RAG2<sup>365,366,367</sup>. Sin embargo, se han observado también otras situaciones en las que una transcripción activa o una cromatina accesible no es suficiente para que tenga lugar el reordenamiento V(D)J de un locus, lo que sugiere la existencia de otro nivel de regulación “más allá” de la accesibilidad que parece estar relacionado con la localización subnuclear de los loci durante los diferentes estadios del desarrollo, como se ha observado en el caso de la regulación de la exclusión alélica del locus *Tcrb*<sup>368</sup> (Sección 8.3). Recientemente se ha demostrado que las proteínas RAG realizan un proceso de escaneo de la cromatina en busca de las RSS a través de un proceso de extrusión de un lazo de cromatina<sup>369,370</sup>, similar al descrito en los TAD.

## **8. Regulación temporal de la expresión de TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$ durante el desarrollo de los timocitos**

La recombinación V(D)J y expresión de los genes del TCR están reguladas durante el desarrollo de los timocitos<sup>58,62,371</sup>. La recombinación de los segmentos génicos V, D y J en los genes que codifican por las cadenas TCR $\alpha$  y TCR $\beta$ , o TCR $\gamma$  y TCR $\delta$  permite la expresión de un TCR $\alpha\beta$  o TCR $\gamma\delta$ , respectivamente, en la membrana celular. La recombinación

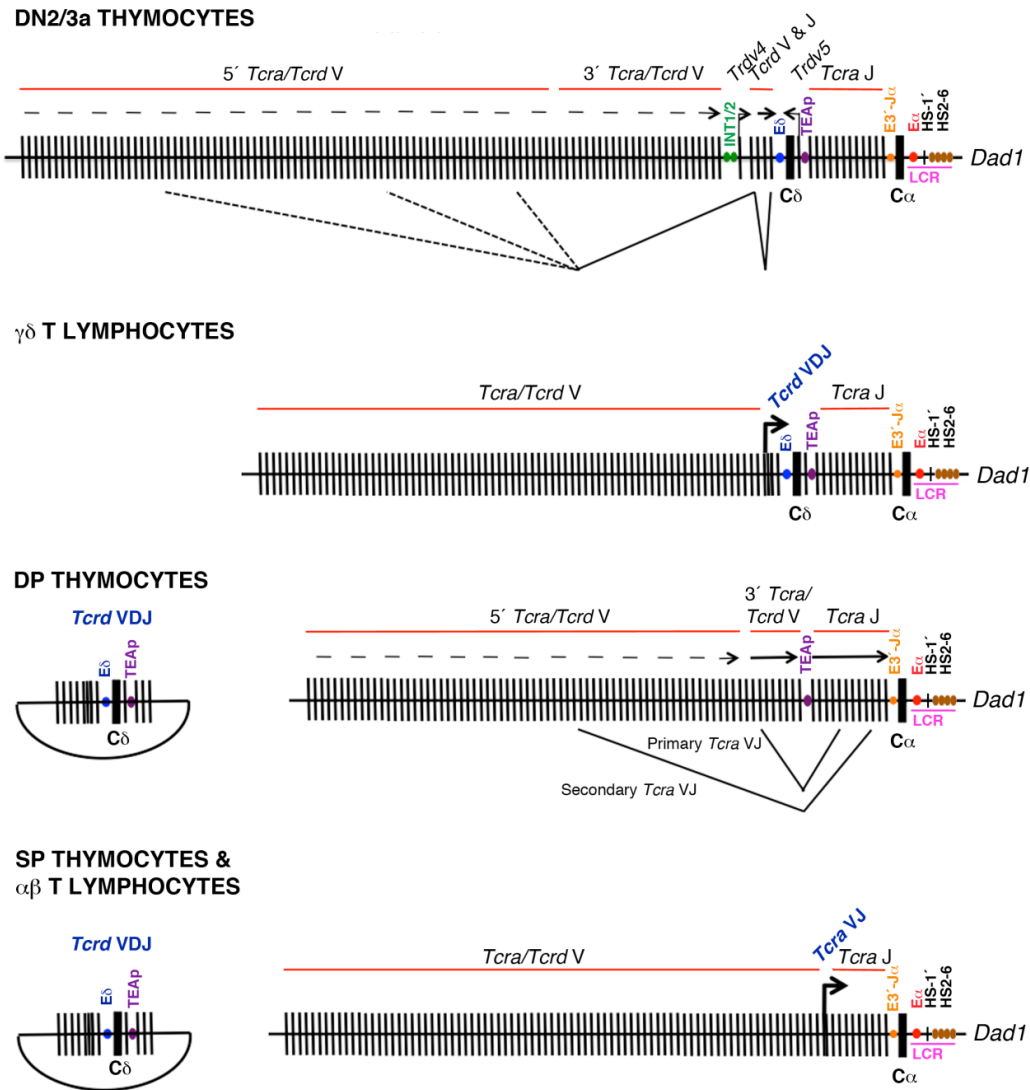
V(D)J en los genes *Tcrg* y *Tcrd* se completa en los estadios DN2 y DN3a, la del gen *Tcrb* en timocitos DN3a y la del gen *Tcra* en timocitos DP<sup>58,62</sup>. Si los reordenamientos V(D)J de los genes *Tcrg* y *Tcrd* tienen lugar de forma correcta, es decir ocurren en el correcto marco de lectura, se expresará un TCR $\gamma\delta$ , lo cual conduce a la diferenciación celular de estos timocitos hacia linfocitos T  $\gamma\delta$  en un proceso conocido como selección- $\gamma\delta$ . Un reordenamiento VDJ exitoso del gen *Tcrb* en timocitos DN3a permite la expresión de un pre-TCR, formado por el ensamblaje de una cadena TCR $\beta$  con la cadena pre-T $\alpha$ . Como se ha explicado anteriormente, la señalización mediada por el pre-TCR, junto con las transducidas por Notch e IL-7R, activan la diferenciación de timocitos DN3a a timocitos DP, pasando por los estadios DN3b, DN4 y ISP, en un proceso conocido como selección- $\beta$ . Los reordenamientos V $\alpha$ J $\alpha$  correctos del gen *Tcra* en timocitos DP da como resultado la expresión de una cadena TCR $\alpha$  que se asocia con la cadena TCR $\beta$  previamente expresada para formar un TCR $\alpha\beta$ . La expresión de un TCR $\alpha\beta$  en timocitos DP posibilita los procesos de selección positiva y negativa con la consecuente supervivencia de unos pocos timocitos DP que diferenciarán hacia timocitos SP CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, los cuales migrarán a la periferia como linfocitos T  $\alpha\beta$ .

### **8.1. Regulación de la transcripción y la recombinación V(D)J del locus *Tcra/Tcrd* durante el desarrollo**

La estructura génica y tridimensional del locus *Tcra/Tcrd* están organizadas de forma que se permita un complejo programa temporal para pasar del reordenamiento V $\delta$ D $\delta$ J $\delta$  del gen *Tcrd* en timocitos DN2 y DN3a al reordenamiento V $\alpha$ J $\alpha$  del gen *Tcra* en timocitos DP (Figura 12). Los *enhancers* de los genes *Tcra* y *Tcrd*, E $\alpha$  y E $\delta$ , respectivamente, son responsables de la transcripción germinal y la recombinación V(D)J de su correspondiente gen durante el desarrollo de los timocitos<sup>372,58,62,373,374,375</sup>, regulando la estructura de la cromatina en el área de influencia de cada uno de estos dos *enhancers*. Por otro lado, los promotores V $\alpha/\delta$ , D $\delta$ , J $\delta$  y J $\alpha$  regulan localmente la accesibilidad RAG1 y RAG2 en un segmento concreto o grupo de segmentos génicos, siendo necesaria la elongación transcripcional para abrir la cromatina de los segmentos génicos que están posicionados lejos de un promotor<sup>376,363,377,58</sup>. Para los reordenamientos V $\delta$ D $\delta$ J $\delta$  y la consecuente expresión de la cadena TCR $\delta$  en timocitos DN2 y DN3a, la transcripción germinal del gen *Tcrd* se inicia a partir de los promotores asociados a segmentos V $\delta$ , D $\delta$  y J $\delta$ , en un proceso dependiente de E $\delta$ <sup>374,372</sup>. Para los reordenamientos V $\alpha$ J $\alpha$  y la consecuente expresión de la cadena TCR $\alpha$  en timocitos DP, la transcripción germinal del gen *Tcra* se inicia a partir de promotores asocia-



dos a segmentos  $V\alpha$  y  $J\alpha$ , en un proceso dependiente de  $E\alpha$ <sup>373,372</sup>. La transcripción de los genes reordenados dependen de la activación de los promotores asociados a los segmentos  $V\alpha/\delta$  implicados en el reordenamiento.



**Figura 12. Reordenamientos en el locus *Tcrd/Tcra*.** Representación de la diferente estructura del locus *Tcra/Tcrd* durante el desarrollo de los linfocitos T. Los segmentos génicos V, D y J son representados como rectángulos negros finos. Las regiones  $C\delta$  y  $C\alpha$  son representadas por rectángulos negros anchos. La región 5' del locus de ratón de aproximadamente 1,6 Mb incluye los segmentos génicos *Trav/Trdv* ( $V\alpha/V\delta$ ) y la región 3' del locus de 0,1 Mb incluye los segmentos génicos *Trdd* y *Trdj* ( $D\delta$  y  $J\delta$ ), la región  $C\delta$ , el segmento génico *Trdv5* ( $V\delta5$ ), los segmentos génicos *Traj* ( $J\alpha$ ) y la región  $C\alpha$ . Las líneas rojas indican las áreas ocupadas por *Trav/Trdv*, *Trdd* y *Trdj* y los segmentos génicos *Traj*. La posición de los elementos reguladores funcionalmente relevantes está representada con el siguiente código: INT/2 como círculos verdes,  $E\delta$  como un círculo azul, TEAP como un círculo morado,  $E3'-J\alpha$  como un círculo naranja, la región controladora del locus (LCR) como una línea rosa,  $E\alpha$  como un círculo rojo, HS-1' como un rectángulo negro y HS2-6 como óvalos marrones. Las líneas discontinuas representan los posibles reordenamientos entre el cluster de segmentos *Trav/Trdv* y las líneas continuas representan la recombinación *Tcrd DJ* en timocitos DN2/3a y los reordenamientos primarios y secundarios *Tcra VJ* en timocitos DP. Las flechas representan regiones de transcripción germinal activa. Las flechas ancladas a segmentos V concretos representan los transcritos originados de promotores V específicos.

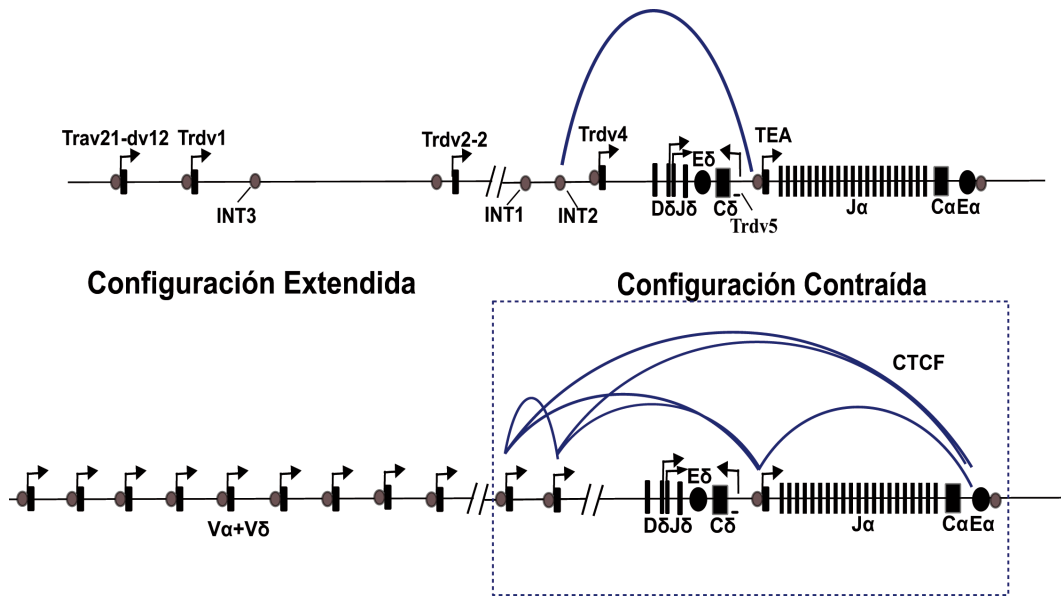
Los transcritos reordenados *Tcrd* VDJ y *Tcra* VJ están escritos en negrita y en azul. Una baja transcripción es representada por líneas discontinuas, mientras que las líneas anchas y continuas son proporcionales al nivel de transcripción (media o alto). El locus *Tcrd* deletado en timocitos DP y SP, y en linfocitos T  $\alpha\beta$ , se representa como un fragmento de ADN circular separado que contiene *Tcrd* reordenado y varios segmentos *Trav/Trdv* y *Traj* no reordenados producidos como consecuencia de la recombinación *Tcra* VJ. Ilustración tomada de Hernández-Munain C. et al. (2016).

Los reordenamientos V $\delta$ D $\delta$ J $\delta$  del gen *Tcrd* solo permiten un intento de recombinación en cada alelo, mientras que el gran número de segmentos V $\alpha$  y J $\alpha$  permite múltiples ciclos de recombinación V $\alpha$ J $\alpha$  en cada alelo del gen *Tcra* (Figura 12). Los reordenamientos V $\alpha$ J $\alpha$  iniciales, denominados reordenamientos primarios, ocurren en timocitos eDP e involucran a los segmentos V $\alpha$  posicionados más hacia 3' (o proximales, respecto a la posición de E $\alpha$ ) y a los segmentos J $\alpha$  posicionados más hacia 5' (o distales, respecto a la posición de E $\alpha$ ) del gen *Tcra*<sup>376,378,379</sup>. Los reordenamientos primarios derivan de la accesibilidad de las RSS de los segmentos V $\alpha$  proximales y J $\alpha$  distales a RAG1 y RAG2 mediada por los promotores asociados a dichos segmentos génicos de una forma dependiente de E $\alpha$ <sup>376,378,380,381</sup>. Los promotores más relevantes para la activación de los reordenamientos primarios de los segmentos J $\alpha$  son el promotor del exon situado 5' de los segmentos J $\alpha$ , denominado TEA (T early  $\alpha$ ), TEAp, y el promotor asociado al segmento J $\alpha$ 49, J $\alpha$ 49p<sup>376</sup> (Figuras 10 y 12). Los reordenamientos primarios tienen como consecuencia la delección del gen *Tcrd* del genoma en timocitos DP, el cual queda aislado en un círculo extra-cromosomal (Figura 12). Si los reordenamientos primarios no son productivos, se producen en timocitos IDP los llamados reordenamientos secundarios entre segmentos génicos V $\alpha$  situados progresivamente más hacia 5' (o distales respecto a la posición de E $\alpha$ ) con segmentos génicos J $\alpha$  situados progresivamente más hacia 3' (o proximales respecto a la posición de E $\alpha$ )<sup>382,379</sup>. Los reordenamientos secundarios dependen de los promotores de los segmentos V $\alpha$  que participan en la recombinación<sup>382</sup>. Esta estrategia de reordenamientos V $\alpha$ J $\alpha$  sucesivos permite múltiples reordenamientos del alelo *Tcra*, asegurándose la expresión de una cadena TCR $\alpha$  en todos timocitos DP, permitiendo que todos ellos puedan optar a ser seleccionados positivamente.

Los análisis de la conformación tridimensional del locus *Tcra/Tcrd* mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (*3-Dimensional-Fluorescence In Situ Hybridation*, 3D-FISH) y microscopía confocal revelaron que el locus está totalmente compactado y contraído en timocitos DN3a, cuando ocurren los reordenamientos V $\delta$ D $\delta$ J $\delta$  del gen *Tcrd*<sup>383</sup>. Sin embargo, en timocitos DP, cuando ocurren los reordenamientos V $\alpha$ J $\alpha$  del gen *Tcra*, el locus adopta una doble configuración: estirada en la región 5', donde se localizan los segmentos

V $\alpha$ , y contraída en la región 3' del locus, donde se localizan los segmentos J $\alpha$  y E $\alpha$ <sup>383</sup>. La conformación totalmente contraída del locus en timocitos DN3a permite que el gen *Tcrd*, cuya estructura solo permite un reordenamiento por alelo, pueda utilizar cualquier segmento V $\delta$  a lo largo de todo el cluster de segmentos V $\alpha/\delta$ . En cambio, en timocitos DP, el gen *Tcra* puede sufrir múltiples ciclos de reordenamientos, lo cual se ve favorecido por una conformación extendida en la región 5' del locus de alrededor de 1 Mb donde se localizan los segmentos V $\alpha$  distales y centrales, junto con una conformación contraída en la región 3' del locus de alrededor de 525 Kb donde se localizan los segmentos V $\alpha$  proximales, los segmentos J $\alpha$ , C $\alpha$  y E $\alpha$ . La región contraída de 525 Kb del locus en timocitos DP corresponde con el área de influencia de E $\alpha$ <sup>378</sup>. Es importante tener en cuenta que estos experimentos de 3D-FISH se realizaron en una configuración no reordenada del locus en ratones *Rag2*<sup>-/-</sup>, por tanto no se trata de la simple visualización del estado reordenado del locus.

Mediante experimentos de 3C y 4C se han estudiado las interacciones físicas y los lazos de cromatina que se establecen en el locus *Tcra/Tcrd* durante el desarrollo de los timocitos<sup>380,384,375</sup>. Se ha observado que E $\delta$  se encuentra recluído junto con estos segmentos dentro de un lazo de cromatina en timocitos DN2-DN3a<sup>384,349</sup>. Este lazo incluye a los segmentos D $\delta$  y J $\delta$ , E $\delta$ , la región C $\delta$  y el segmento V $\delta$ 5, lo cual explica la restricción de la actividad de E $\delta$  a los segmentos D $\delta$  y J $\delta$  (Figura 13). Este lazo se forma por interacciones físicas mediadas por el factor CTCF unido a dos sitios situados 5' de los segmentos D $\delta$ , denominados INT1 e INT2, orientados inversamente con un sitio CTCF asociado a TEAp<sup>384,385</sup>. La destrucción de este lazo mediante delección de los sitios INT1 e INT2 provoca que los segmentos D $\delta$  reordenen con un único segmento V situado inmediatamente hacia 5', reduciendo de forma drástica el repertorio de las cadenas TCR $\delta$ <sup>384</sup>. Además, debido a que los reordenamientos del gen *Tcrd* cambian la estructura del locus, debido a que los segmentos V $\delta$  se encuentran dispersos a lo largo de todo el cluster de segmentos V $\alpha/\delta$ , también se afecta el repertorio de las cadenas TCR $\alpha$ <sup>379</sup>. Por tanto, el hecho que la actividad de E $\delta$  se encuentre restringida dentro del lazo INT1/INT2-TEAp en timocitos DN2-DN3a es importante para poder generar los diversos repertorios de las cadenas TCR $\delta$  y TCR $\alpha$ <sup>384,349,379</sup>.



**Figura 13. Lazos de cromatina en el locus *Tera/Tcrd* en timocitos DN3a y DP identificados por experimentos de 3C y 4C.** Las flechas representan a los promotores, los óvalos grandes negros representan a los *enhancers*, los óvalos pequeños grises indican los sitios de unión a CTCF. **Arriba)** Lazo de cromatina detectado en el locus en timocitos DN3a. La alta frecuencia de interacciones entre INT2 y los sitios de unión a CTCF en TEA se indica por una línea azul continua. **Abajo)** Lazos de cromatina detectados en el locus en timocitos DP. La alta frecuencia de interacciones promovidas por Eα y CTCF está indicada por líneas azules continuas. Ilustración tomada de Carico Z. et al. (2015).

En timocitos DP, se activa Eα dando lugar a la expresión de la cadena TCRα, mientras se inactiva Eδ silenciándose la expresión de la cadena TCRδ<sup>372</sup>. La activación de Eα en timocitos DP desencadena nuevos lazos de cromatina en región de 525 Kb correspondiente con la región del locus *Tera/Tcrd* contraída observada en los experimentos de 3D-FISH<sup>383,380,375</sup>. En la formación de estos nuevos lazos participan los FT unidos a Eα y CTCF/cohesina unidos a dos sitios adyacentes al *enhancer* y a los promotores de los segmentos Vα proximales y Jα<sup>380,385,61,375,349</sup>, dando lugar a lo que se conoce como un “hub” o nodo de cromatina (Figura 13). Para que se pueda formarse el nodo de cromatina, los sitios CTCF presentes en los promotores Vα y Jα han de encontrarse en orientación opuesta a los asociados con Eα<sup>385</sup>. Este nodo favorece las sinapsis entre las RSS de los segmentos Vα proximales y los segmentos Jα distales dando lugar a los reordenamientos primarios del gen *Tera* y a la delección del gen *Tcrd* (Figura 12). A pesar de que Eα es fundamental para la formación del nodo de cromatina en timocitos DP, tanto Eα y Eδ, así como CTCF, son prescindibles para las contracciones del locus observadas mediante 3D-FISH<sup>380</sup>, siendo desconocido actualmente el mecanismo del control de las contracciones del locus observadas por microscopía confocal.

## 8.2. Regulación de la transcripción y recombinación V $\gamma$ J $\gamma$ del locus *Tcrg* durante el desarrollo

La señal mediada por IL-7R y STAT5 controlan la transcripción germinal y recombinación V $\gamma$ J $\gamma$  del locus *Tcrg*, siendo ambas bloqueadas en ratones *Il7ra*<sup>-/-</sup> o *Il7*<sup>-/-294,129,295,296</sup>. STAT5 es responsable de esta señalización, activando los promotores J $\gamma$  y los *enhancers* E $\gamma$  y HSA mediante el reclutamiento de las HAT CBP y p300 y la consecuente acetilación de las histonas de esas regiones<sup>386,387,388,389</sup>. Tanto los reordenamientos V $\gamma$ J $\gamma$ , como la transcripción germinal de los segmentos V $\gamma$ , están regulados durante el desarrollo de los ratones<sup>58</sup>: los segmentos V $\gamma$ 3 y V $\gamma$ 4 reordenan en la etapa fetal y dan lugar a los TCR $\gamma\delta$  de linfocitos intraepiteliales en la epidermis y del epitelio vaginal, mientras que en la etapa adulta los segmentos que reordenan son los más distales, V $\gamma$ 5, V $\gamma$ 2 y V $\gamma$ 1.1, contribuyendo al repertorio de TCR  $\gamma\delta$  de linfocitos circulantes y del epitelio intestinal.

De forma similar a cómo ocurre con la regulación de la transcripción del gen *Tcrd*<sup>372</sup>, la actividad de transcripcional del gen *Tcrg* es silenciada durante la selección- $\beta$ <sup>390,391</sup>. Por tanto, los genes *Tcrd* y *Tcrg* parecen tener regulación transcripcional común durante el desarrollo de los timocitos, cuyo mecanismo molecular es el objetivo de estudio principal en esta tesis<sup>392</sup>.

## 8.3. Regulación de la transcripción y recombinación V $\beta$ D $\beta$ J $\beta$ del locus *Tcrb* durante el desarrollo

La recombinación del locus *Tcrb* ocurre en dos pasos en timocitos DN2-DN3a: primero ocurren los reordenamientos D $\beta$ -J $\beta$ , seguidos de los reordenamientos V $\beta$ -D $\beta$ J $\beta$ <sup>58</sup>. Este último paso está muy regulado para que solo ocurra en uno de los dos alelos<sup>393</sup>. El locus *Tcrb* es el único de los loci del TCR que se localiza asociado a la membrana nuclear en timocitos DN3a mientras ocurre la recombinación, persistiendo dicha asociación en timocitos DP, cuando la recombinación ya ha concluido para mantener la exclusión alélica mientras se re-expresan RAG1 y RAG2 para activar los reordenamientos del gen *Tcra*<sup>368</sup>. La asociación del locus *Tcrb* con la lámina nuclear es alta y estocástica, lo cual reduce la eficiencia de la recombinación V $\beta$ -D $\beta$ J $\beta$  y disminuye la posibilidad de que los dos alelos puedan recombinarse al mismo tiempo<sup>394</sup>. La asociación forzada del locus a la lámina nuclear en timocitos DN3a mediante la introducción de un LAD inhibe la recombinación V $\beta$ -D $\beta$ J $\beta$ , indicando que esta asociación está directamente involucrada en la exclusión alélica de este gen<sup>394,395</sup>.

De forma contraria, la delección del LAD existente entre los segmentos V $\beta$  y los genes de tripsinógeno vecinos aumenta la tasa de transcripción y recombinación V $\beta$ -D $\beta$ J $\beta$  del locus, indicando que el LAD del gen *Tcrb* inhibe la actividad de E $\beta$ <sup>394,395</sup>.

### 9. *Enhancers* reponsables de la transcripción y recombinación de los genes del TCR

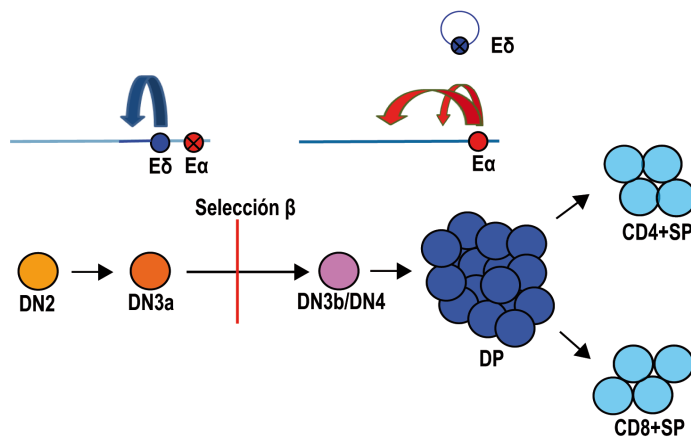
El control de la expresión de las cadenas del TCR es crítico para el correcto desarrollo de los linfocitos T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , por lo que los *enhancers* responsables de dicho control están estrictamente regulados<sup>58,62</sup>. En primer lugar, se activan los *enhancers* de las cadenas *Tcr $\gamma$* , *Tcr $\delta$*  y *Tcr $\beta$* , E $\gamma$ , E $\delta$  y E $\beta$ , en timocitos DN2 y DN3a para permitir la expresión de las cadenas TCR $\gamma$ , TCR $\delta$  y TCR $\beta$ , respectivamente, y el ensamblaje del TCR $\gamma\delta$  y el pre-TCR. Como se ha mencionado anteriormente, la expresión de un TCR $\gamma\delta$  dirige el desarrollo de los timocitos hacia linfocitos T  $\gamma\delta$ , mientras que la expresión del pre-TCR dispara la selección- $\beta$  y el desarrollo de los timocitos hacia linfocitos T  $\alpha\beta$  (Figura 4). En timocitos DP, E $\gamma$  y E $\delta$  se inactivan y E $\alpha$  se activa, lo que inhibe la expresión de las cadenas TCR $\gamma$  y TCR $\delta$ , y activa la expresión de la cadena TCR $\alpha$ , mientras que E $\beta$  permanece activo, manteniéndose estable la expresión de la cadena TCR $\beta$ .

El control estricto de la activación de estos *enhancers* durante el desarrollo es crítico para el normal desarrollo de los linfocitos T. Una activación temprana de E $\alpha$  provocaría una delección prematura del gen *Tcr $\delta$*  en timocitos, lo cual impediría el correcto desarrollo de las células T  $\gamma\delta$ . Además, una temprana expresión de la cadena TCR $\alpha$  en timocitos DN3a puede dar lugar a un TCR $\alpha\gamma$ , capaz de señalizar y permitir la diferenciación de los timocitos DN3a a DP, pero estas células no son viables por no poder ser seleccionadas ya que además el silenciamiento del gen *Tcr $\gamma$*  en timocitos DP impediría la propia expresión de dicho receptor<sup>396,390</sup>. Por otro lado, la expresión aberrante de las cadenas TCR $\delta$  y TCR $\gamma$  en timocitos DP también interferiría con el correcto ensamblaje del propio TCR $\alpha\beta$ .

Después de que un gen de una cadena del TCR o Ig ha sido reordenado productivamente, la transcripción del gen reordenado depende del *enhancer* correspondiente y del promotor asociado al segmento V reordenado. Sin embargo hay dos excepciones notables para esta afirmación relacionadas con la actividad de E $\alpha$  en linfocitos T<sup>62,371</sup>: 1) en linfocitos T  $\alpha\beta$ , la actividad de E $\alpha$  está fuertemente inhibida, por lo que se ha sugerido la posible existencia de otro *enhancer* para la expresión de la cadena TCR $\alpha$  en células maduras<sup>397</sup>, y 2) en

linfocitos T  $\gamma\delta$ , la expresión de la cadena TCR $\delta$  depende de E $\alpha$ , el cual se encuentra activo en estas células y sobrepasa la posible actividad de E $\delta$  en estas células<sup>373</sup>.

Así pues, excepto en el caso de las células T  $\gamma\delta$  que parece que ambos enhancers puedan estar activos, E $\delta$ /E $\gamma$  y E $\alpha$  nunca están activos simultáneamente durante el desarrollo de los timocitos DN2/DN3a a DP (Figura 14): en timocitos DN2-DN3a, E $\delta$  y E $\gamma$  están activos y E $\alpha$  inactivo, mientras que en timocitos DP, E $\delta$  y E $\gamma$  están inactivos y E $\alpha$  activo<sup>372,398,62</sup>. Por tanto, estos *enhancers* actúan como un interruptor funcional en timocitos DN2/DN3a y DP, supuestamente controlado por un mecanismo común durante la selección- $\beta$ . Se sabe que la activación de E $\alpha$  en timocitos DP está mediada por la inducción transitoria de FT inducibles por el pre-TCR, mientras que la inactivación de E $\gamma$ /E $\delta$  en estas células está mediada por la disociación de los FT previamente unidos<sup>372,314,398</sup> (Figura 15). Entender el mecanismo molecular responsable de la inactivación de E $\delta$  y E $\gamma$  en timocitos DP mediante la disociación de los FT unidos a estos *enhancers* es objeto de estudio de esta tesis<sup>392</sup>.



**Figura 14. Interruptor E $\delta$ /E $\alpha$ .** Regulación de la transcripción del locus *Tcrα/Tcrδ* por E $\delta$  y E $\alpha$  durante el la selección- $\beta$ . Diagrama esquemático del desarrollo de las células T indicando los diferentes estadios de maduración de los timocitos. E $\delta$  y E $\alpha$  son representados como óvalos azules y rojos, respectivamente. El locus *Tcrδ* se representa en rojo y los estadios tímicos en los que E $\delta$  está activado son representados en colores cálidos (amarillo, naranja y rosa), mientras que el locus *Tcrα* se representa en azul y los estadios con E $\alpha$  activado son representados colores fríos (morado y azul). Los estadios SP durante los cuales E $\delta$  está inactivo y E $\alpha$  inhibido son representados en azul claro. Los círculos tachados representan a *enhancers* inactivos o inhibidos. Un círculo azul vacío representa *Tcrδ* deletado. Las flechas curvas representan interacciones *enhancer*-promotor: flechas curvas rojas representan interacciones E $\alpha$ -promotor y las flechas curvas azules representan interacciones E $\delta$ -promotor. Ilustración modificada de Hernández-Munain C. (2015).

### 9.1. *Enhancer* del gen *Tcrd* (E $\delta$ )

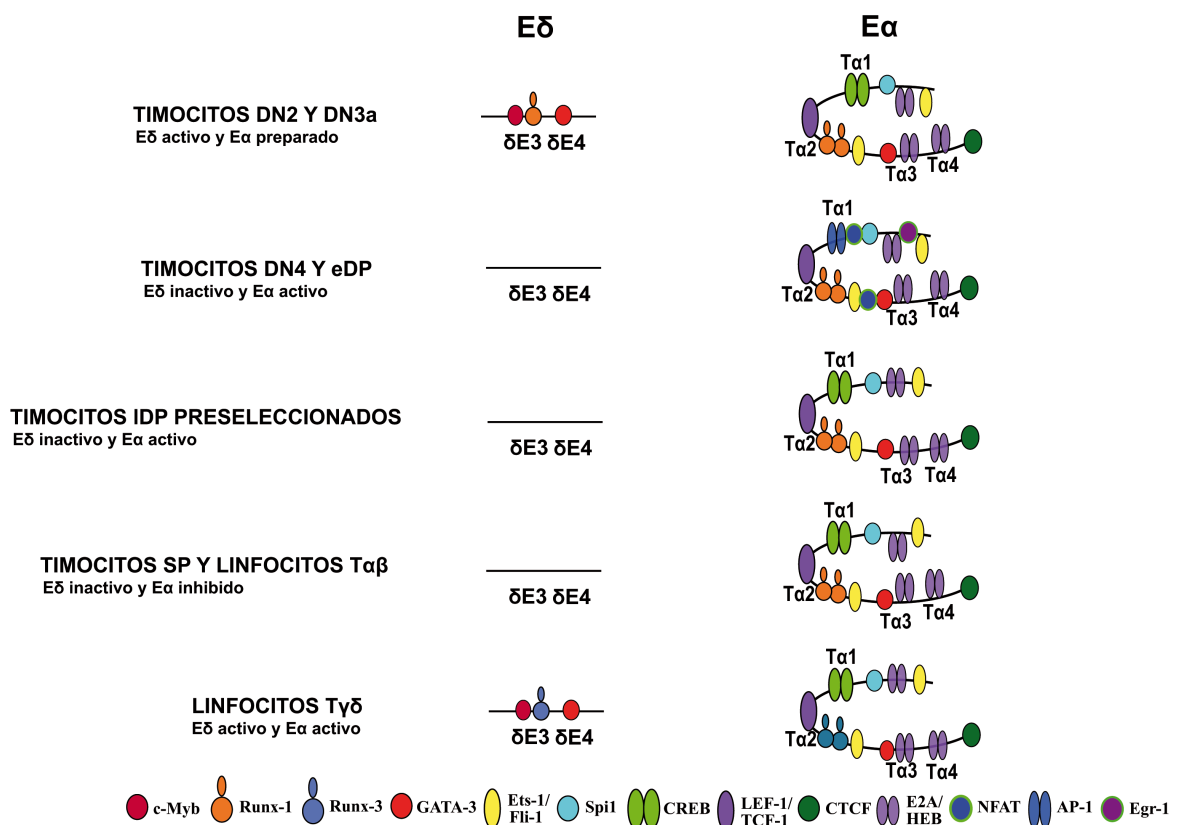
E $\delta$  está localizado entre el segmento J $\delta$ 3 y la región C $\delta$  en humanos<sup>399</sup> y entre el segmento J $\delta$ 2 y la región C $\delta$  en ratones<sup>58</sup> (www.imtg.com) (Figura 10). Como se ha mencionado anteriormente, este *enhancer* está activo en timocitos DN2-DN3a, siendo necesario para los reordenamientos del gen *Tcrd* y la generación de linfocitos T  $\gamma\delta$ <sup>372,374</sup>. Los estudios pioneros *in vivo* sobre la actividad de este *enhancer* se realizaron en el contexto de un minigen *TCRD* humano de 22 Kb en ratones transgénicos<sup>400</sup>. Este minilocus contiene los segmentos V $\delta$ 1, V $\delta$ 2, D $\delta$ 3, J $\delta$ 1, J $\delta$ 3 y la región C $\delta$  intacta, con E $\delta$  en su localización natural en un fragmento J $\delta$ 3-C $\delta$  de 10,5 Kb. El análisis de las recombinaciones V $\delta$ D $\delta$ J $\delta$  de este transgén en timocitos demostraron que los reordenamientos del gen *TCRD* se dan en dos pasos: primero ocurren los reordenamientos V $\delta$ D $\delta$  de forma independiente de E $\delta$ , ya que ocurren en ausencia del *enhancer*, y después ocurren los reordenamientos V $\delta$ D $\delta$ J $\delta$  de forma dependiente de E $\delta$ . Estos ratones también sirvieron para demostrar que E $\delta$  está activo en timocitos DN3a, siendo inactivado en timocitos DP durante la selección- $\beta$ <sup>401,372</sup>.

E $\delta$  está formado por siete elementos,  $\delta$ E1- $\delta$ E7, donde se unen FT *in vitro*<sup>399</sup>.  $\delta$ E3 contiene un sitio Runx y un sitio Myb, ambos adyacentes, y  $\delta$ E4 contiene un sitio GATA<sup>399,402</sup> (Figura 15). El elemento  $\delta$ E3 de 35 bp es necesario para la actividad del *enhancer*, constituyendo lo que se denomina “E $\delta$ -core”<sup>402</sup>. Los sitios Runx y Myb en  $\delta$ E3 son esenciales para la función de E $\delta$ , tanto en ensayos transcripcionales de genes reporteros en líneas de linfocitos T transfectadas o en ensayos de transcripción y recombinación del minilocus *TCRD* en ratones transgénicos<sup>402,189,403,404</sup>. La ocupación de los sitios Runx y Myb presentes en  $\delta$ E3 y GATA presente en  $\delta$ E4 ocurre de forma jerarquizada: primero se ocupa el sitio Runx, lo cual permite la ocupación de los sitios Myb y GATA<sup>190,405</sup>. La ocupación del sitio Runx tiene un papel estructural, mientras que la ocupación del sitio Myb es esencial para la actividad del *enhancer*<sup>405</sup>.

El fragmento  $\delta$ E1- $\delta$ E7 de 380 pb es suficiente para activar la recombinación V $\delta$ D $\delta$ J $\delta$  del minilocus *TCRD* de forma eficiente en ratones transgénicos, mientras que el fragmento  $\delta$ E3- $\delta$ E4 de 60 bp resulta inerte en este contexto<sup>406,407</sup>. Por tanto, los FT unidos a los sitios Runx, Myb y GATA presentes en  $\delta$ E3- $\delta$ E4 necesitan colaborar con los FT unidos a  $\delta$ E1- $\delta$ E2 y/o  $\delta$ E5- $\delta$ E7 para la activación recombinacional del minilocus en ratones transgénicos. El mecanismo de acción de E $\delta$  en el contexto del minilocus *TCRD* está mediado a través de



la inducción de la acetilación de las histonas H3 y H4<sup>358</sup>. En el gen endógeno, estas marcas de histonas se restringen al área incluida dentro del lazo de cromatina formado entre INT1/INT2 y TEAp en timocitos DN2/DN3a<sup>384,349</sup> (Figura 13). Como se ha mencionado anteriormente, E $\delta$  se inactiva en timocitos DP mediante la disociación de los FT unidos a dicho *enhancer* (Figura 15), lo cual provoca el silenciamiento del gen *Tcrd* durante la selección- $\beta$ <sup>372</sup>. El mecanismo molecular responsable de la disociación de los FT unidos a E $\delta$  durante la selección- $\beta$  es objeto de estudio en esta tesis<sup>392</sup>.



**Figura 15. E $\delta$  y E $\alpha$  durante el desarrollo.** Modelo que muestra la estructura de los enhanceosomas E $\delta$  y E $\alpha$  durante el desarrollo de las células T. Los diagramas representan los FT unidos a E $\delta$  y E $\alpha$  en timocitos y linfocitos T. La localización de los elementos  $\delta$ E3 y  $\delta$ E4 y de los elementos T $\alpha$ 1, T $\alpha$ 2, T $\alpha$ 3 y T $\alpha$ 4 está indicada. Los diferentes FT se indican por círculos de colores codificados. La fuerza de la unión de los FT es representada por la posición de los círculos coloreados que representan los FTs sobre el ADN del enhancer: una posición más cercana a la línea negra que representa al *enhancer* indica una unión más fuerte. Diferentes complejos de FT unidos se ensamblan en E $\delta$  y E $\alpha$  durante el desarrollo de las células T. En timocitos DN2/DN3a, E $\delta$  está activo y ocupado por MYB, RUNX1 y GATA-3, mientras que E $\alpha$  está preparado para ser activado y ocupado por CREB, TCF1/LEF1, RUNX1, ETS1, SPI1, GATA3, y E2A/HEB; en timocitos DN4 y eDP, E $\delta$  está inactivo y desocupado de FT, mientras que E $\alpha$  es activado a través del reclutamiento de los factores NFAT, EGR1 y AP1 inducidos por el pre-TCR; en timocitos IDP preseleccionados, E $\delta$  permanece inactivo y desocupado, mientras que E $\alpha$  es activado a través de la fuerte unión de E2A y ETS1; en timocitos SP y linfocitos T $\alpha\beta$ , E $\delta$  permanece inactivo y presumiblemente no ocupado, mientras que E $\alpha$  está inhibido y muestra una baja unión de los FT E2A y HEB; y en linfocitos T $\gamma\delta$ , E $\delta$  está activo y ocupado por MYB, RUNX3 y GATA3, mientras que E $\alpha$  está también activo y ocupado por los mismos FT que se encuentran unidos en los enhanceosomas de timo-

citos IDP preseleccionados, con la excepción de RUNX3 que podría estar sustituyendo a RUNX1. Ilustración tomada de Hernández-Munain C. et al. (2016).

## 9.2. *Enhancers* del gen *Tcrg* ( $E\gamma$ )

Existen dos tipos de *enhancers* en el locus *Tcrg* (Figura 10),  $E\gamma$ , localizado a 3 Kb 3' de cada región  $C\gamma$ , y HSA, localizado entre los segmentos  $V\gamma5$  y  $V\gamma2$  en el cluster  $\gamma1$ <sup>408,58,409</sup> ([www.imtg.com](http://www.imtg.com)).  $E\gamma$  y HSA poseen funciones únicas y redundantes<sup>410</sup>, siendo ambos importantes para el desarrollo y mantenimiento de células T  $\gamma\delta$ . En humanos hay descrito un único  $E\gamma$  localizado 3' de la región  $C\gamma2$  ([www.imtg.com](http://www.imtg.com)).

La actividad de  $E\gamma$  está controlada por diversos FT unidos a seis elementos altamente conservados: NF $\gamma1$ -NF $\gamma6$ . RUNX1 y MYB se unen a un sitio Runx y un sitio Myb presentes en NF $\gamma3$ , siendo son esenciales para la actividad de  $E\gamma$ <sup>191,411</sup>. Además,  $E\gamma$  se induce fuertemente por la señalización mediada por IL-7R, a través de STAT5 que se une a un sitio presente en NF $\gamma2$ <sup>342</sup>. Así, para la actividad de este *enhancer* se necesita la colaboración funcional entre RUNX1, MYB y STAT5. Aunque NFAT se une a un sitio que solapa con el de STAT5 en NF $\gamma2$ , las mutaciones puntuales que discriminan ambos sitios no han mostrado ninguna funcionalidad del sitio NFAT en respuesta a citoquinas<sup>412</sup>.

De forma similar a la regulación de  $E\delta$  y el gen *Tcrd* durante la transición de los timocitos DN3a a DP, los FT unidos a  $E\gamma$  también se disocian, inhibiéndose la transcripción del gen *Tcrg* y la expresión de cadena TCR $\gamma$  durante la selección- $\beta$ <sup>390,391</sup>. El mecanismo molecular responsable de esta regulación es objeto de estudio en esta tesis<sup>392</sup>. Como se ha mencionado anteriormente, la expresión errónea de una cadena TCR $\gamma$  en timocitos DP puede competir con el correcto ensamblaje del TCR $\alpha\beta$  en estas células, ya que se ha demostrado que la cadena TCR $\gamma$  puede ensamblarse con la cadena TCR $\alpha$  dando lugar a un TCR $\alpha\gamma$ <sup>396</sup>.

## 9.3. *Enhancer* del gen *Tcra* ( $E\alpha$ )

$E\alpha$  se encuentra 3' de  $C\alpha$  tanto en humanos como en ratones ([www.imtg.com](http://www.imtg.com)).  $E\alpha$  contiene cuatro regiones de unión a FT, T $\alpha1$ -T $\alpha4$ , en un fragmento de 275 pb<sup>413,414</sup>. La región T $\alpha1$ -T $\alpha2$ , en un fragmento de 116 pb, se considera el “ $E\alpha$ -core”, por ser capaz de acti-

var la transcripción de construcciones reporteras en células transfectadas. Los FT CREB, TCF1/LEF1, RUNX1 y ETS1 se unen a E $\alpha$ -core de una forma altamente cooperativa, mientras que E2A, HEB, GATA3, SP1, FLI1 e IKAROS se unen fuera de E $\alpha$ -core, en las regiones T $\alpha$ 3-T $\alpha$ 4 y 5' de T $\alpha$ 1<sup>415,416,417,418,332,419,420,421,422,423,186,314,424</sup> (Figura 15). De hecho los FT TCF1, LEF1 y GATA3 fueron descubiertos a través del estudio de la regulación de este *enhancer*<sup>420,419,422</sup>. Además a T $\alpha$ 1-T $\alpha$ 4 también se reclutan FT inducibles por el pre-TCR como EGR1, NFATc1 y AP1, y las HAT CBP y P300<sup>314</sup> (Figura 15).

E $\alpha$  se encuentra dentro de una región controladora del locus (*Locus Control Region*, LCR) de 7,4 Kb situada entre los genes *Tcra* y *Dad1*, capaz de separar los diferentes programas transcripcionales de los genes que lo flanquean<sup>425,426</sup>. Este LCR está constituido por ocho sitios de hipersensibilidad a la digestión por DNasa I (*Hypersensitivity Sites*, HS). El sitio denominado HS1 corresponde a T $\alpha$ 1-T $\alpha$ 4, mientras que el denominado HS1' corresponde a los dos sitios CTCF adyacentes, funcionalmente relevantes para la formación del nodo de cromatina entre E $\alpha$  y los promotores de los segmentos V $\alpha$  proximales y TEAp<sup>380</sup> (Figura 13). Cuando se habla de E $\alpha$ , normalmente se refiere al fragmento de 1 Kb de ADN que contiene HS1 y HS1', que fue deleciónado para la generación de ratones E $\alpha$ <sup>-/-</sup><sup>373</sup>. Los ratones E $\alpha$ <sup>-/-</sup> tienen la práctica ausencia de recombinaciones V $\alpha$ J $\alpha$  y de linfocitos T  $\alpha\beta$ .

Como en el caso de E $\delta$ , E $\alpha$  tiene la capacidad de activar de forma eficiente el minigen *TCRD* en ratones transgénicos, aunque ambos *enhancers* lo hacen en momentos distintos del desarrollo<sup>401,372</sup>. Mientras que E $\delta$  activa los reordenamientos V $\delta$ D $\delta$ J $\delta$  del minilocus *TCRD* en timocitos DN3a y timocitos de ratones E14, E $\alpha$  lo hace en timocitos DP y timocitos de ratones E17. A diferencia de E $\delta$ -core, E $\alpha$ -core, es capaz de activar los reordenamientos de esta construcción reportera<sup>406</sup>. Sin embargo, E $\alpha$ -core activa los reordenamientos VDJ del minilocus de una forma prematura, siendo detectados en timocitos DN3a, mientras que T $\alpha$ 1-T $\alpha$ 4 tiene la regulación temporal correcta, activando estos reordenamientos en timocitos DP<sup>406,424</sup>. Estos resultados indican que los FT que se unen a T $\alpha$ 1-T $\alpha$ 2 necesitan colaborar funcionalmente con los FT que se unen a T $\alpha$ 3-T $\alpha$ 4 para la correcta activación de E $\alpha$  durante el desarrollo de los timocitos, asegurando así una recombinación temporal apropiada del gen del TCR $\alpha$ . La regulación temporal de E $\alpha$  es importante porque los reordenamientos V $\alpha$ J $\alpha$  en timocitos DN3a conllevan a una la deleción prematura del gen TCR $\delta$  y a la inhibi-

ción de la generación de los linfocitos T  $\gamma\delta$ . Además, como se ha mencionado anteriormente, la expresión prematura de la cadena TCR $\alpha$  en timocitos DN3a permite su ensamblaje con la cadena TCR $\gamma$  dando lugar a la expresión de TCR $\alpha\gamma$ , capaz de dirigir la diferenciación a unos timocitos DP pero incapaces de ser seleccionados por la inhibición de la expresión de la cadena TCR $\gamma$ <sup>396,390</sup>. Es interesante que aunque T $\alpha$ 1-T $\alpha$ 2 sea suficiente para activar la transcripción y la recombinación de los segmentos génicos del minilocus *TCRD* en ratones transgénicos, E $\alpha$ -core no es capaz de activar la recombinación V $\alpha$ J $\alpha$  del locus *Tcra* endógeno<sup>406,427</sup>. Por tanto, los FT que se unen a E $\alpha$  pero fuera de T $\alpha$ 1-T $\alpha$ 2 son necesarios para conferir accesibilidad de RAG1 y RAG2 a las RSS de los segmentos génicos V $\alpha$  y J $\alpha$  del gen *Tcra* endógeno y permitir su recombinación V $\alpha$ J $\alpha$ . Es posible que entre estos elementos necesarios se encuentren los sitios CTCF adyacentes a T $\alpha$ 1-T $\alpha$ 4.

El control de la actividad de E $\alpha$  durante el desarrollo de los linfocitos T  $\alpha\beta$  ha sido estudiado mediante el análisis de los transcritos germinales dependientes del *enhancer* en el contexto del gen *Tcra* no reordenado en ratones *Rag2*<sup>-/-</sup>: Los ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> tienen un bloqueo total en el estadio DN3a debido a que los genes TCR no pueden ser recombinados<sup>428</sup>; los ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x TCR $\beta$  (*Rag2*<sup>-/-</sup> x bt $\beta$ ) o ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> inyectados con Ab para CD3 $\epsilon$  tienen un bloqueo en el estadio DP, debido a que los timocitos DN3a han podido pasar la selección- $\beta$  por la señalización mediada por el pre-TCR o CD3<sup>429,430,431</sup>; Los ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x TCR $\alpha\beta$  tienen linfocitos T  $\alpha\beta$  en periferia que expresan un mismo TCR $\alpha\beta$  transgénico<sup>432,433,434</sup>. Mediante la comparación de transcritos V $\alpha$  proximales y J $\alpha$  en estos tres tipos de ratones, *Rag2*<sup>-/-</sup>, *Rag2*<sup>-/-</sup> x bt $\beta$  o *Rag2*<sup>-/-</sup> inyectados con Ab para CD3 $\epsilon$ , y *Rag2*<sup>-/-</sup> x TCR $\alpha\beta$ , se ha determinado que E $\alpha$  está inactivo en timocitos DN3a, activo en timocitos DP, y fuertemente inhibido, con solo 15-20% de su actividad, en linfocitos T  $\alpha\beta$ <sup>373,372,376,397,314</sup>.

Para entender el mecanismo de activación e inhibición de E $\alpha$  a lo largo del desarrollo de los timocitos se ha comparado la unión de FT a este *enhancer* durante el desarrollo en timocitos DN3a de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup>, DP de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x bt $\beta$  o inyectados con Ab para CD3 $\epsilon$ , y linfocitos T  $\alpha\beta$  de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x TCR $\alpha\beta$ , y células SCID.adh estimuladas o no con PMA e ionomicina (PMA+I) como modelo de timocitos DN3a y DN4, respectivamente<sup>372,416,417,314,397</sup>. Los datos indican que durante el desarrollo de los timocitos se ensamblan cuatro *enhanceosomas* distintos con diferentes actividades: un *enhanceosoma*

inactivo pero listo para ser activado de forma rápida “poised” en timocitos DN3a, dos *enhanceosomas* activos en timocitos DN4/eDP y en timocitos IDP, y un *enhanceosoma* fuertemente inhibido en timocitos SP y linfocitos T  $\alpha\beta$  (Figura 15). La diferencia entre los dos *enhanceosomas* activos en timocitos DN4/eDP y IDP estriba en el reclutamiento de FT inducibles transitoriamente por la señalización del pre-TCR, observándose la unión de NFATc1, EGR1 y AP1 en el *enhanceosoma* formado en timocitos DN4/eDP<sup>314</sup>. El rasgo que mejor se correlaciona con la actividad de E $\alpha$  es la unión de E2A y HEB: los dos *enhancers* activos se caracterizan por un fuerte reclutamiento de E2A y HEB, mientras que el *enhancer* inactivo en timocitos DN3a y el *enhancer* inhibido en linfocitos T  $\alpha\beta$  se caracterizan por el débil reclutamiento o ausencia de estos TF<sup>314,397</sup>. Estos datos indican que la unión de FT inducibles de forma transitoria a E $\alpha$  en timocitos DN4/eDP dan lugar a una alta unión de E2A y HEB en timocitos IDP, que después se pierde en linfocitos T  $\alpha\beta$ . Sin embargo, la expresión forzada de E2A en linfocitos T  $\alpha\beta$  no es suficiente para activar E $\alpha$  en linfocitos T  $\alpha\beta$ , sugiriendo que el reclutamiento de otros FT es necesario<sup>397</sup>. Debido a que E $\alpha$  es necesario para la transcripción del gen *Tcrd* reordenado en linfocitos T  $\gamma\delta$ <sup>373</sup>, se ha propuesto que otro *enhanceosoma* E $\alpha$ , quizá distinto a los anteriores, pudiera ensamblarse en estas células<sup>62,371</sup>.

#### 9.4. *Enhancer* del gen *Tcrb* (E $\beta$ )

E $\beta$  se encuentra entre C $\beta$ 2-V $\beta$ 31 en ratones y C $\beta$ 2-V $\beta$ 30 en humanos ([www.imtg.com](http://www.imtg.com)). Este *enhancer* es necesario para la transcripción y recombinación del locus *Tcrb* como se evidenció con el hecho que los timocitos de los ratones E $\beta$ <sup>-/-</sup> no expresan la cadena TCR $\beta$  y, por tanto, no pueden diferenciar a linfocitos T  $\alpha\beta$ <sup>435</sup>. E $\beta$  activa a los promotores D $\beta$ , activando la transcripción germinal a través de la modificación de histonas y la apertura de la cromatina a lo largo de los clusters DJC $\beta$  adyacentes<sup>436,366</sup>.

E $\beta$  consta de siete motivos de unión ( $\beta$ E1- $\beta$ E7). E $\beta$ -core se compone de los elementos  $\beta$ E3 y  $\beta$ E4 y una secuencia adicional de 20 pb situada justo 3' del elemento  $\beta$ E4 y se encuentra ocupado por múltiples TF en timocitos inmaduros<sup>184</sup>, destacando el papel esencial de los FT ETS1 y RUNX1<sup>437</sup>. Aunque la unión cooperativa entre RUNX1 y ETS1 es esencial para la activación del *enhancer*, RUNX1 es el FT fundamental para la actividad de E $\beta$  ya que es responsable de establecer las interacciones con los promotores, remodelar la cromatina y activar la transcripción<sup>437</sup>.

## 10. Leucemias linfoblásticas agudas de linfocitos T (T-ALL)

Según la Organización Mundial de la Salud, las T-ALL son neoplasias de precursores de células T y su presentación clínica puede incluir hiperleucocitosis con afección de ganglios linfáticos y la presencia de una masa mediastínica que invade el timo<sup>438</sup>. Se trata, por tanto, de tumores agresivos resultantes de la transformación maligna de progenitores de células T. La transformación de estos progenitores es un proceso en el que diferentes alteraciones genéticas cooperan para alterar los mecanismos normales que controlan el crecimiento, la proliferación, la supervivencia y la diferenciación celular durante el desarrollo de timocitos, y comúnmente está asociada con translocaciones cromosómicas adquiridas y otras anomalías genéticas que conducen a la expresión aberrante de un grupo selecto de FT. Este tipo de cáncer afecta preferentemente a niños y adolescentes y representa aproximadamente a un tercio de los casos de leucemias linfoblásticas agudas (ALL). T-ALL representa el 10-15% de todos los casos de ALL en niños y el 25% de los casos en adultos, siendo más frecuente en varones aunque la incidencia disminuye con la edad. Los avances en transcriptómica de T-ALL han permitido establecer una clasificación en función de su fenotipo<sup>439</sup>: ETP, timocitos DN o DP. Las ETP-ALL representan el 15% de todas las T-ALL en niños y se caracterizan por la ausencia de la expresión de CD1a, CD8 y CD5, pudiendo ser inmunofenotípica, genética y biológicamente heterogéneas<sup>440</sup>. El perfil transcripcional de las ETP-ALL muestra similitud con el de los progenitores mieloides y HSC<sup>440</sup>. Las T-ALLs con fenotipo DN se caracterizan por presentar un bloqueo temprano en el desarrollo de timocitos, mientras que las T-ALL con fenotipo DP proceden de timocitos corticales más tardíos y expresan los marcadores de superficie CD4, CD8 y CD3, y el FT TAL1<sup>438</sup>.

### 10.1. Función oncogénica de NOTCH1 en T-ALL

La activación constitutiva de la señalización de NOTCH1 es la vía oncogénica principal en la transformación de precursores de células T, siendo causante de alrededor del 60% de los casos de T-ALL<sup>438</sup>. La activación continua de la señalización de NOTCH1 induce la transformación maligna a través de múltiples vías de señalización que alteran la supervivencia, la proliferación y el metabolismo celulares. La implicación de la señalización de Notch en la patogénesis de las T-ALL se descubrió tras la identificación de la translocación t(7;9)(q34;q34.3), que coloca a parte del gen *NOTCH1* bajo la dirección E $\beta$ , en menos del 1% de los pacientes<sup>438</sup>. Esta translocación da lugar a la expresión de una molécula de NOTCH1 truncada en su extremo amino-terminal, llamada TAN1 (*Translocation Associated*

*NOTCH 1*), que actúa como una forma dominante activa independiente de ligando. Las HSC de ratones que expresan TAN1 son capaces de desarrollar T-ALL en ratones<sup>441</sup>. Las isoformas truncadas de NOTCH2 y NOTCH3 también son capaces de inducir T-ALL cuando se expresan en HSC o timocitos DN<sup>442</sup>.

También se han identificado varias mutaciones de *NOTCH1* que están relacionadas con la generación de T-ALL, normalmente en los dominios responsables del control de la iniciación y terminación de la señalización de NOTCH, como PEST y HD<sup>443</sup>. Algunas mutaciones del HD potencian la acción de la  $\gamma$ -secretasa, incrementando así la tasa de producción de ICN1, mientras que mutaciones en PEST incrementan la vida media de ICN1, ya que inhiben su degradación. Otras mutaciones en el HD alargan la secuencia espaciadora entre el sitio S2 y la LNR o desestabilizan la región, evitando que la NRR inhiba la activación de Notch en ausencia de interacción con el ligando, lo que finalmente conduce a una señalización no regulada y constitutivamente activa. Otra mutación relacionada con la vía de Notch es la identificada en el gen *FBXW7*, presente en aproximadamente el 15% de los casos de T-ALL<sup>444</sup>. La mutación de este importante gen supresor de tumores inhibe la degradación de ICN1 en el proteosoma.

Los mecanismos moleculares por los cuales una señalización de Notch exagerada contribuye a la transformación maligna de células T no se conocen completamente. NOTCH1 oncogénico reprime la función de FT supresores de tumores, tales como P53 y E2A<sup>445,446</sup>. También se ha identificado a CD44 como una diana temprana de NOTCH1 en células pre-leucémicas que podría ser importante en la patogénesis de la enfermedad<sup>447</sup>. Sin embargo, una señalización aberrante de Notch por sí sola no es suficiente para la transformación leucémica, necesitándose la cooperación con otros FT oncogénicos, tales como MYC, HES1, P53 y E2A<sup>448</sup>. Por ejemplo, MYC es necesario junto con ICN1 para la progresión tumoral de los timocitos DP<sup>446</sup>, y HES1, cuya expresión es dependiente de la ruta de Notch, es también necesario para la generación y mantenimiento de T-ALL mediada por ICN1<sup>242</sup>.

## **10.2. Implicación de la ruta de IL-7 en T-ALL**

La señalización excesiva de IL-7 también puede conducir al desarrollo de T-ALL, la aceleración de la enfermedad y la resistencia a la quimioterapia<sup>449,450</sup>. De hecho, un 70% de las T-ALL tienen sobre-expresión de IL-7R, posiblemente a través de la ruta de Notch ya que expresión de IL-7R $\alpha$  se activa a través de esta ruta<sup>451,443,95</sup>. Por tanto, hay una relación

entre la activación de NOTCH1 e IL-7 en la patogénesis y progresión de T-ALL. Además de este mecanismo dependiente de Notch, en T-ALL se han descrito mutaciones en los genes *IL7Ra*, *JAK1* y *JAK3* que activan de forma constitutiva la vía IL7R/JAK-STAT y la pérdida del gen supresor de tumores *PTEN* que conduce a una señalización anormal PI3K-AKT<sup>439,452</sup>. Las mutaciones en *IL7Ra*, *JAK1* y *JAK3* se asocian con alteraciones en reguladores epigenéticos<sup>453</sup>.

Las T-ALL humanas con alta expresión de IL-7R $\alpha$  o IL-7 se relacionan con altas tasas de supervivencia y proliferación de las células malignas<sup>454</sup>. Las células epiteliales del timo y estromales de médula ósea promueven la supervivencia de las células T-ALL en cultivos *in vitro* a través de la secreción de IL-7<sup>455,456</sup>. El papel promotor de IL-7 sobre la generación y supervivencia de T-ALL también se ha observado en ratones transgénicos que sobreexpresan IL-7<sup>457</sup>. En estos ratones, IL-7 se expresa ectópicamente en las células linfoides, en lugar de en las células del estroma, generando un bucle autocrino de IL-7. Además, los ratones AKR/J, cuyos timocitos DN sobreexpresan IL-7R $\alpha$ , tienden a desarrollar T-ALL espontáneamente<sup>458</sup>. Sin embargo, la prueba más directa de la participación de la señalización de IL-7R en T-ALL proviene de la identificación de mutaciones somáticas de ganancia de función en *IL7R* que conducen a la activación constitutiva del receptor favoreciendo la transformación celular *in vitro* y la formación de tumores *in vivo*<sup>459</sup>. Estas mutaciones originan un residuo de cisteína o triptófano en la porción extracelular yuxta-transmembrana que provoca la homodimerización de la cadena mutante, dando lugar a un receptor activo constitutivamente e independiente de ligando<sup>459,460</sup>. Los estudios *in vivo* sobre el impacto de mutaciones oncogénicas de *IL7R* en precursores hematopoyéticos reflejan que el potencial leucemogénico depende de la etapa de diferenciación en la que se da la mutación<sup>461</sup>. La expresión de una cadena IL-7R $\alpha$  mutada en HSC induce una mieloproliferación, sin embargo cuando se expresa en combinación con ICN1 induce T-ALL. Es importante destacar que las mutaciones de ganancia de función de la ruta de señalización de IL-7 pueden también afectar a efectores posteriores de esta señalización, como JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR y RAS/MEK/ERK<sup>452,439</sup>.

Mutaciones en otros genes también pueden favorecer o inhibir la presencia de mutaciones en la ruta de IL-7. Así, las mutaciones en la ruta de IL-7R son más frecuentes en las T-ALL que sobreexpresan los FT HOXA y TLX, y menos frecuentes en las que expresan TAL1 y LMO<sup>452,462,463</sup>. Otra causa prevalente en T-ALL es la delección del gen *CDKN2A* que



codifica para el supresor de tumores P14ARF<sup>443,464</sup>. Los timocitos *Arf*<sup>-/-</sup> presentan una sobreexpresión de la cadena IL-7R $\alpha$  mutada, lo cual induce una leucemia similar a ETP-ALL<sup>465</sup>. Además, la mutación R98S en la proteína ribosomal L10, que se encuentra en el 8% de los casos de T-ALL pediátrica, promueve la expresión de IL-7R $\alpha$ <sup>466</sup>.

### 10.3. Implicación de la señalización del pre-TCR en T-ALL

La ruta de Notch activa la ruta del pre-TCR mediante la activación de la transcripción de *Ptcra* en la generación de T-ALL<sup>442</sup>. Las rutas del pre-TCR y Notch colaboran en la generación de T-ALL<sup>442</sup>. Como se ha mencionado anteriormente, las señales mediadas por el pre-TCR implican la activación de PI3K-AKT, RAS-MAPK y NFAT, las cuales están implicadas en la generación de T-ALL<sup>467</sup>. Se han identificado mutaciones activadoras de RAS en el 4-10% de los casos de T-ALL<sup>468</sup>. También la calcineurina mutada constitutivamente activa induce T-ALL en ratones transgénicos<sup>469</sup>. El papel central de la vía calcineurina-NFAT se confirmó en estudios preclínicos en los que usaron inhibidores de la calcineurina, los cuales inducen la apoptosis de T-ALL en modelos de ratones leucémicos que expresan TEL-JAK2, SCL-LMO o ICN1<sup>469,470,442</sup>.

### 10.4. Implicación de la recombinación V(D)J en T-ALL

Varios eventos de recombinación V(D)J son necesarios durante la génesis de cada nuevo linfocito, y cada uno de estos eventos implican roturas de la doble hebra del ADN cromosómico. Estas roturas en el genoma son muy peligrosas para la viabilidad celular, por lo que las células han desarrollado complejos mecanismos para corregir estas escisiones mediante una reparación eficiente. Sin embargo, la recombinación V(D)J es una importante fuente de inestabilidad genómica que puede dar lugar a translocaciones cromosomales que contribuyen al desarrollo de linfomas y leucemias<sup>354,58</sup>. Errores en el mecanismo de recombinación V(D)J o de la reparación de roturas ocasionadas por otras razones es una importante causa de expresión aberrante de moléculas involucradas en la generación de T-ALL por translocación de un oncogen en la vecindad de un *enhancer* de un gen del TCR. Entre los genes translocados, además de aquéllos que codifican por moléculas implicadas en señalización, destacan los FT oncogénicos<sup>439</sup>. Entre las translocaciones cromosómicas que involucran uno de los genes del TCR destacan: *TCRB* (7q34), *TCRA-TCRD* (14q11) y *TCRG* (7p14)<sup>439</sup>. Las translocaciones con el gen *TCRD* son predominantes, considerándose a E $\delta$  como un elemento de alta inestabilidad genómica<sup>471,472</sup>. Entre los genes de FT oncogénicos se incluyen miembros de la familia bHLH como *TAL1*, *TAL2*, *LYL1* y *BHLHB1*; *LMO1* y

*LMO2*; *TLX1/HOX11*, *TLX3/HOX11L2*, *NKX2.1*, *NKX2.2*, *NKX2.5*, y genes *HOX* como *TLX1*. Entre estos TF destaca *TAL1*, también conocido como *SCL* (*Stem Cell Leukemia*), presente en aproximadamente el 50-60% de los casos de T-ALL<sup>473</sup>. *TAL1* se identificó originalmente por la translocación de *TAL1* al gen *TCRD*, t(1;14)(p33;q11)<sup>474</sup>. *TAL1* se expresa en HSC y progenitores tempranos, siendo importante para la expresión de *KIT* durante la eritropoyesis y la hematopoyesis. *TAL1* es silenciado durante el desarrollo normal de los timocitos a partir del estadio DN4, lo que regula la expresión de *RAG1*, *RAG2* y pre-T $\alpha$ . La expresión aberrante en timocitos DN y DP inhibe la diferenciación de los precursores de linfocitos T. Otro mecanismo que da lugar a la sobre-expresión de *TAL1* es mediado por una translocación intracromosomal mediada a través de E $\delta$  para dar lugar a la proteína de fusión *SIL-TAL1*<sup>475,476</sup>. Recientemente se ha descrito otro mecanismo de sobre-expresión de *TAL1* a través de una mutación que genera un nuevo *enhancer*<sup>477,478</sup>. La transformación mediada por *TAL1* se deriva de su capacidad de inhibir la función de las proteínas E, ya que pertenece a la misma familia y compite con ellas por los mismos sitios de unión<sup>479,480</sup>. De hecho, los ratones *Tcf3*<sup>-/-</sup>, que carecen de E2A, desarrollan T-ALL, y la haplosuficiencia de E2A o HEB, *Tcf3*<sup>+/-</sup> o *Tcf12*<sup>+/-</sup> respectivamente, tienen mayor propensión a sufrir T-ALL<sup>207,208</sup>. Sin embargo, como en el caso de las otras alteraciones relacionadas con T-ALL, como las que afectan a las rutas de Notch, pre-TCR o IL-7, la sobre-expresión de *TAL1* no es suficiente para causar T-ALL, ya que solo un 30% de los ratones *Tal1*<sup>+</sup> desarrollan leucemia después de más de 100 días<sup>480</sup>, sugiriendo la necesidad de otras mutaciones adicionales. *LMO1* o *LMO2* forman un complejo con *TAL1*, y normalmente se sobre-expresan junto con *TAL1* en T-ALL<sup>473</sup>. Los ratones transgénicos *Tal1*<sup>+</sup> *Lmo2*<sup>+</sup> tienen mayor propensión a sufrir T-ALL que los que solo sobre-expresan uno de los dos FT; además, tanto *NOTCH1* como genes de la ruta *PI3K-PTEN-AKT-mTOR* están más frecuentemente mutados en T-ALL *TAL1*<sup>+</sup>, indicando una colaboración funcional entre *TAL1* y esta vía de señalización<sup>481,473</sup>. Aunque a día de hoy se desconoce la razón por la cual *TAL1* causa T-ALL, probablemente dependa de la regulación de alguno de sus genes diana ya que regula la expresión de numerosos FT, reguladores del ciclo celular, factores de supervivencia y factores de reparación de ADN, así como de genes que codifican por transcritos largos no codificantes<sup>473</sup>.

El panorama genético de T-ALL también incluye la pérdida de FT como *WT1*, *LEF1*, *RUNX1*, *ETV6* y *BCL11B*, inhibidores del ciclo celular como *CDKN2A*, *RB* y *CDKN1B*, ganancia de oncogenes como *MYB* y reordenamientos cromosómicos que pueden resultar en productos de fusión como *CALM-AF10*, *MLL1-ENL* y *NUP214-ABL1*.

Otro ejemplo de translocación interesante en T-ALL afecta a *MYB*<sup>482</sup>: la translocación t(6;7)(q23;q34) fusiona los genes *TCRB* y *MYB*, quedando éste último regulado por E $\beta$ , lo que provoca un subtipo de T-ALL en pacientes de menos de 2 años de edad, mientras que la duplicación del gen *MYB*, *MYB*<sup>dup</sup>, está asociada con una descontrolada expresión de MYB que dispara su actividad oncogénica dando lugar a T-ALL.

### 10.5. Circuito regulador central (CRC) de T-ALL

Varios estudios han demostrado que el estado transcriptómico general de una célula está determinado por un pequeño grupo de FT que crea lo que se conoce como un circuito regulador central (CRC)<sup>483</sup>. Cada tipo celular tendría un CRC que define su identidad. Los FT que forman parte de un CRC controlan su expresión génica entre sí, formando una red interconectada con capacidad de auto- e inter-regulación<sup>484</sup>. Cualquier cambio en la expresión de un FT de un CRC da lugar como resultado a una expresión génica alterada que puede desencadenar la aparición de enfermedad<sup>485</sup>. Esta alteración de un CRC da lugar a los programas de expresión génica alterados específicos de las células tumorales con el fin de lograr que se den las condiciones óptimas para la proliferación, supervivencia y mantenimiento de su fenotipo maligno<sup>486</sup>. Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de los CRC para varios tipos celulares, la composición de los CRC en diferentes tipos de cáncer y cómo están regulados para promover la tumorigénesis sigue siendo aún desconocida debido a la dificultad experimental que se requiere para la identificación y validación de los CRC<sup>483,484,485</sup>. La caracterización de los CRC se realiza mediante el mapeo de los sitios de unión de determinados FT mediante ChIP-seq en grupos de *enhancers* o *superenhancers* que regulan la expresión de un gen y la confirmación que los FT de un CRC regulan la expresión de los otros FT que forman parte del mismo CRC<sup>487,488</sup>.

La desregulación de los genes que codifican para ciertos FT es una de las características presentes en T-ALL, habiéndose identificado varios oncogenes y genes supresores de tumores afectados traslocaciones cromosómicas en casos de T-ALL, muchos de los cuales están implicados en la hematopoyesis normal como es el caso de TAL1<sup>439</sup>. Los resultados derivados del análisis de la expresión génica han demostrado que la sobreexpresión se asocia con un bloqueo en la diferenciación timocitos DP en modelos humanos y murinos y en desarrollo de T-ALL. Recientemente se ha identificado el conjunto de FT que colabora con TAL-1 para generar un CRC presente en T-ALL humanas, situando a TAL1 como un FT clave de este CRC<sup>485,489,477,490,473</sup>. Este CRC está formado por TAL1, GATA3, RUNX1 y

miembros de la familia ETS, como ERG, ETS1 y ETV5/6, los cuales se unen a las regiones reguladoras de sus propios genes y de los demás, formando un circuito interconecado autorregulado positivamente. Esta estructura de red proporciona los medios por los cuales la expresión aberrante de un único FT afecta a todo el programa de expresión génica de una célula, contribuyendo a la transformación maligna. La sobreexpresión de GATA3 y RUNX1 sostenida por TAL-1 puede contribuir al bloqueo de diferenciación en la etapa DP<sup>477</sup>. Este CRC además de estar implicado en el establecimiento y estabilidad de los timocitos transformados que sobreexpresan TAL-1, también es importante durante la hematopoyesis normal<sup>491,492</sup>.

## 10. 6. Implicaciones terapéuticas.

Las opciones terapéuticas para B-ALL se han expandido recientemente con el desarrollo de Ab monoclonales, inhibidores de tirosina-quinasas y células CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T-cells*), las terapias para T-ALL están limitadas a quimioterapia y trasplante alogénico de HSC, y siguen siendo insatisfactorias. El tratamiento actual para T-ALL da como resultado una remisión completa en el 80-90% de los adultos, pero aproximadamente la mitad de estos pacientes recaen en los primeros dos años. Además los pacientes que no logran una remisión completa, tienen muy mal pronóstico, por lo que se realizan esfuerzos continuos para optimizar el uso de los agentes quimioterapéuticos convencionales utilizados que incluyen a glucocorticoides inmunosupresores como dexametasona, enzimas como la asparraginas que inhibe la conversión de asparragina en ácido aspártico, y moléculas que inhiben la síntesis de ADN como el metotrexato que inhibe la formación de timidina y la nelarabina, análogo de la desoxiguanosina<sup>493,494,495,496</sup>.

La alta prevalencia de mutaciones en la vía de señalización de NOTCH1 en enfermos con T-ALL, coloca a esta vía como una diana interesante para el desarrollo de terapias dirigidas. Así, para frenar la continua activación de esta ruta inhibiendo los niveles de ICN1 y la transcripción de sus genes diana a través de la  $\gamma$ -secretasa se han sintetizado distintos GSI que provocan un bloqueo en la proliferación de las células malignas<sup>497,498</sup>. Sin embargo, estos inhibidores evidenciaron tener toxicidad gastrointestinal en los ensayos clínicos, ya que inhiben la ruta de Notch en las células intestinales, provocando mala absorción y metaplasia intestinal. Para paliar estos efectos negativos se han combinado GSI y dexametasona<sup>499,500</sup> y se han desarrollado terapias con Ab monoclonales que bloquean la actividad de NOTCH1 o inhiben a ADAM10<sup>501</sup> y péptidos inhibidores de la formación del complejo ICN1-RBPJK-

MAML1, tal como el péptido denominado SAHM1 capaz de sustituir a MAML1<sup>502,503</sup>. Además de intentar atacar a la señalización de Notch, en los últimos años se han desarrollado moléculas que actúan sobre otras vías que aparecen descontroladas en T-ALL. Por ejemplo, para intentar desactivar la vía metabólica PI3K/AKT/mTOR se han utilizado agentes derivados de la rapamicina, rapálogos, e inhibidores de PI3K y AKT<sup>504</sup>. También se ha intentado bloquear la ruta JAK/STAT, especialmente para ETP-TALL, mediante distintos fármacos como ruxolitinib y fedratinib. También se han utilizado fármacos para detener la vía de las MAPK en estas células, tales como trametinib y tipifarnib. Actualmente se están probando drogas que inhiben ciclinas tipo D, NF- $\kappa$ B y agentes modificadores epigenéticos<sup>505,506,507</sup>, terapias prometedoras basadas en el uso de Ab para IL-7R $\alpha$ <sup>508,509,450</sup> y se han desarrollado Ab monoclonales para CD38 y CD25<sup>510,511</sup> con resultados prometedores. De momento la terapia con CAR-T no ha tenido éxito para combatir T-ALL, debido a la dificultad de identificar antígenos exclusivos que no estén presentes en células T sanas que evite el efecto “fratricida” de las CAR-T entre ellas mismas. Recientemente se han desarrollado CAR-T anti-CD5 y anti- IL-7R $\alpha$ , con escaso carácter autodestructivo en ratón, cuya efectividad en humanos aún se desconoce<sup>450</sup>



## Objetivos

El objetivo principal de esta tesis ha sido dilucidar el programa de regulación transcripcional de los genes *Tcrd* y *Tcrg* durante la selección- $\beta$ , ya que su expresión coincide durante las etapas DN2/3a y DP del desarrollo de los timocitos. Estos datos sugerían que los *enhancers* responsables de la transcripción germinal y recombinación V(D)J de estos dos genes pudieran tener un mecanismo común mediado por las señalizaciones más relevantes presentes en la transición de timocitos DN3a a DP.

Para abarcar esta idea principal decidimos plantear los siguientes objetivos más concretos:

1. Analizar los efectos de las señalizaciones responsables de la diferenciación de los timocitos DN3a a DP, como son las mediadas por Notch, IL-7R y pre-TCR, en la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg*.
2. Identificación de los FT responsables de dichas señalizaciones mediante ensayos de unión y ensayos funcionales.
3. Establecer una relación directa entre las señalizaciones, el reclutamiento de los FT a E $\delta$  y E $\gamma$  y la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg*.

Estos estudios se realizaron de forma conjunta con el estudio de la regulación de E $\alpha$ , como *enhancer* con una regulación opuesta a la de E $\delta$  y E $\gamma$  durante la selección- $\beta$ .





## **Materiales y Métodos**

## 1. Ratones.

Se usaron ratones  $Rag2^{-/-}$ ,  $Rag2^{-/-}$  x  $Tcrb$  ( $Rag2^{-/-}$  x  $\beta tg$ ),  $Rag2^{-/-}$  x  $E\alpha^{-/-}$  y  $Rag2^{-/-}$  x  $\beta tg$  x  $E\alpha^{-/-}$ <sup>428,429,373</sup>. Los ratones fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos en la Unidad de Experimentación Animal del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. Para la mayoría de experimentos se usaron ratones entre 4-8 semanas de edad, excepto en algunos ensayos donde se utilizaron embriones E14,5  $Rag2^{-/-}$  x  $\beta tg$  x  $E\alpha^{-/-}$ . Se emplearon individuos machos y hembras, de forma aleatoria. Los animales y procedimientos utilizados estaban autorizados según las directrices bioéticas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Junta de Andalucía.

## 2. Extracción de órganos linfoides primarios.

Los ratones adultos fueron sacrificados mediante CO<sub>2</sub> por personal cualificado de la Unidad de Experimentación Animal. Para su disección, los ratones fueron sumergidos en etanol al 70%, previamente a colocarlos sobre tablas de corcho. Se les realizó una incisión con unas tijeras de trazo recto, comenzando desde la abertura uretral situada en la zona inferior del animal hasta la mandíbula inferior. Desde aquí se realizaron dos cortes hacia cada una de las axilas, se tiró de la piel suelta y se fijó con chinchetas al corcho para facilitar el siguiente paso. Para la extracción del timo se perforó el diafragma, se cortaron las costillas por cada uno de los lados hasta la clavícula, se levantaron las costillas con unas pinzas y se dejaron fijadas con chinchetas al corcho. El timo, localizado debajo de las costillas recubriendo el corazón, fue retirado con ayuda de unas pinzas curvas para sujetar y unas tijeras curvas para separar el timo del tejido conectivo. Los timos se pusieron en placas de cultivo celular (Falcon) de 60 x 15 mm de poliestireno con medio RPMI 1640 con 10% de suero bovino fetal inactivado con calor (*Fetal Bovine Serum*, FBS) preparadas previamente para luego proceder a la disgregación del órgano y la obtención de los timocitos. El FBS usado fue tratado con calor mediante incubación a 56<sup>0</sup>C durante 30 minutos para inactivar el complemento y evitar citotoxicidad celular.

Si las células de estos órganos necesitaron ser cultivadas posteriormente, estos procedimientos de extracción se realizaron en condiciones de esterilidad dentro de campana de flujo laminar en un cuarto específico para el cultivo de células animales.

### **3. Cultivo de líneas celulares leucémicas murinas y humanas y de células primarias murinas**

Las células SCID.adh proceden de un timoma de ratones con inmunodeficiencia celular severa (*Severe Cell ImmunoDeficiency*, SCID) debido a la presencia de una mutación inactivadora en el gen *Prkdc* que codifica para la quinasa DNA-PK<sup>512</sup>. Estas células fueron mantenidas en suspensión en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10 % de FBS inactivado y cantidades estándar de glutamina (1%), penicilina y streptomycin (1%), aminoácidos no esenciales (1%), piruvato sódico (1%) y 50  $\mu$ M de 2-mercaptoetanol (2-ME), a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células Jurkat proceden de células T-ALL de un niño de 14 años<sup>513</sup>. Estas células fueron mantenidas en suspensión en RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS inactivado y cantidades estándar de glutamina, penicilina y estreptomycin, a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células HEK-293T fueron obtenidas por transfección de la línea HEK-293 procedente de un riñón de un embrión humano para que expresen un alelo sensible a temperatura del antígeno T grande del virus SV40, lo cual permite que los plásmidos transfectados puedan replicarse para conseguir así una alta expresión de proteínas<sup>514</sup>. Son células adherentes y necesitan ser tripsinizadas para sus pases 1:4 o 1:8 cada dos o tres días, respectivamente. Estas células fueron mantenidas en medio DMEM, medio de Eagle modificado por Dulbecco, suplementado con 10% de FBS inactivado y cantidades estándar de glutamina, aminoácidos no esenciales, penicilina y estreptomycin, a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células Phoenix Ampho son derivadas de las células HEK-293T que expresan los genes retrovirales estructurales *gag/pol* y la envuelta anfotrópica del virus de la leucemia murina<sup>515</sup>. Estas células se usan para la producción de retrovirus al ser transfectadas con vectores retrovirales. Se cultivan en medio RPMI 1640 con 10% de FBS inactivado y cantidades estándar de glutamina, aminoácidos no esenciales, penicilina y estreptomycin, a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células estromales de ratón OP9 y OP9-DL1<sup>516</sup> fueron cultivadas en medio  $\alpha$ -MEM, medio mínimo esencial de Eagle con la modificación  $\alpha$ , suplementado con 20% de FBS inactivado, 2,2 g/L de bicarbonato sódico, 50  $\mu$ M de 2-ME, penicilina y estreptomycin, a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Son células adherentes y necesitan ser tripsinizadas para sus pases 1:4 cada dos días.

Las células COS7 proceden de fibroblastos de riñón de mono que fueron inmortalizadas mediante infección con el virus del sarcoma de Rous y fueron modificadas para producir el antígeno T grande del virus SV40 que permite la replicación de los plásmidos transfectados para conseguir una alta expresión de proteínas<sup>517</sup>. Son células adherentes y necesitan ser tripsinizadas para sus pases 1:4 o 1:8 cada dos o tres días, respectivamente.

Los timocitos de ratones E14,5 *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg x *E $\alpha$* <sup>-/-</sup> fueron cultivados sobre monocapas de células OP9 o OP9-DL1 en medio RPMI 1640 con 15% de FBS inactivado y cantidades estándar de glutamina, penicilina y estreptomycin, 1 ng/mL de IL-7 murina (PeproTech) y 5 ng/mL del ligando de FLT3 (*Fms-Like Tyrosine-kinase Ligand*, FLT3L) humano (PeproTech), a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4. Tratamiento de las células con activadores o inhibidores de señalizaciones celulares**

Las células SCID.adh y Jurkat (1x10<sup>5</sup> células/mL) fueron estimuladas con 20 ng/mL de PMA y 0,5  $\mu$ g/mL ionomicina (P+I) (Sigma-Aldrich) y/o 10 ng/mL de IL-7 (Prepotech), durante 24 o 48 horas. Para la inhibición de la señalización de Notch se trataron las células usaron las concentraciones de DAPT (Selleckchem) de 16  $\mu$ M para las células SCID.adh y 20  $\mu$ M para las células Jurkat durante 24 y 48 horas. Los tratamientos se hicieron en frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> de superficie (BD Falcon).

El PMA fue disuelto en dimetilsulfóxido a una concentración de 1 mg/mL y guardado a -20<sup>0</sup>C en pequeñas alícuotas de un solo uso. La ionomicina fue disuelta en agua a una concentración de 1 mg/mL y guardada a -20<sup>0</sup>C en pequeñas alícuotas de un solo uso. La IL-7 fue reconstituida en agua a una concentración de 0,1 mg/mL y guardada a -80<sup>0</sup>C en pequeñas alícuotas de 20  $\mu$  de un solo uso. El DAPT, también conocido como GSI-IX, fue disuelto a una concentración de 1mg/mL en agua y guardado a -20<sup>0</sup>C en pequeñas alícuotas como solución stock de un solo uso.

#### **5. Inducción de la diferenciación de timocitos DN3 a DP de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> *in vivo***

Para la diferenciación *in vivo* de los timocitos, ratones adultos *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg x *E $\alpha$* <sup>-/-</sup> fueron inyectados vía intraperitoneal con 150  $\mu$ g de un Ab monoclonal purificado para CD3e de ratón obtenido del hibridoma de hámster 145-2C11. Tras la inyección, los ratones fueron sacrificados a diferentes tiempos. La diferenciación de los timocitos fue comprobada por citometría de flujo usando Ab para CD4 acoplado a isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*, FITC), CD8 acoplado a ficoeritrina (*Phycoerythrin*, PE) y CD25 aco-

plado a alofococianina (*Allophycocyanin*, APC) (BD Biosciences Pharmingen) usando un citómetro (Becton Dickinson Excalibur Analyzer).

Para el estudio de la diferenciación *in vitro*, los timocitos de ratones E14,5 *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg x *E $\alpha$* <sup>-/-</sup> fueron co-cultivados sobre monocapas de células OP9 o OP9-DL1 en placas de 24 pocillos con medio RPMI 1640 suplementado con 15% de FBS inactivado, 1% de penicilina y estreptomycin, 50  $\mu$ M 2-ME, 1 ng/mL de IL-7 murina y 5 ng/mL de FLT3L humano. Los timocitos se recogieron a diferentes tiempos y los timocitos DN se purificaron mediante el uso de un citómetro-separador (Becton Dickinson Aria III), usando Ab CD4-FITC y CD8-PE (BD Biosciences Pharmingen).

## 6. Transducciones virales

Se llevaron a cabo transducciones con plásmidos retrovirales MigR y MigR-ICN1 y transducciones con plásmidos lentivirales de la colección MISSION (Sigma) con shRNA control, sh*Runx1*-RNA o sh*Myb*-RNA.

Las transducciones retrovirales utilizando los plásmidos MigR realizadas en células Jurkat y timocitos murinos E14,5 se hicieron empleando RetroNectin (Takara) y espinoculación (centrifugación conjunta celular y viral). La RetroNectin consiste un fragmento de la fibronectina humana. Para ello, placas de 24 pocillos no tratadas para cultivos celulares (Corning) fueron incubadas el día anterior a la transducción con 400  $\mu$ L de RetroNectin a 40-50  $\mu$ g/mL durante toda la noche a 4 °C o 2 horas a temperatura ambiente selladas con parafilm. La RetroNectin liofilizada se disuelve en tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) para tener una solución 5X a 150-200  $\mu$ g/mL que se guarda en alícuotas congeladas a -20°C. La solución de RetroNectin puede ser reutilizada 3 veces y se guarda a 4°C. Al día siguiente, se retiró la solución de RetroNectin de los pocillos, se añadió 1 mL/pocillo de PBS con 2% de FBS inactivado, incubándose 30 minutos a temperatura ambiente, y finalmente los pocillos se lavaron 3 veces con 1 mL de PBS. Dos días antes de la transducción, las células Phoenix Ampho presentes en una placa de 100 mm de diámetro al 60-70% de confluencia fueron electroporadas a 220 V, 1.050  $\mu$ F y 72 ohmios con un tiempo de pulso de 55-65 milisegundos en un electroporador Electro Cell Manipulator 600 (BTX) en 200  $\mu$ l de medio RPMI 1640 completo con 10% FBS inactivado conteniendo 5  $\mu$ l de NaCl 1,5M, 20  $\mu$ g del vector MigR correspondiente y 20  $\mu$ g del plásmido pAMLV, que contiene el gen de la envuelta anfotrópica del virus de la leucemia murina, en cubetas de 0,4 cm

y plaqueadas en 1,5 pocillos de una placa de cultivo de 6 pocillos en medio RPMI 1640 completo con 20% de FBS inactivado (normalmente se parten de 2 placas de 100 mm de diámetro que da para 3 pocillos de una placa de 6 pocillos por cada plásmido MigR). Al día siguiente, 24 horas post-transfección, se eliminó el medio de las células Phoenix Ampho electroporadas y se añadió 1 mL/pocillo de medio RPMI 1640 completo con 10% FBS inactivado. Ese mismo día se aislaron los timocitos embrionarios y se incubaron durante 16 horas con 1 ng/mL de IL-7. Al día siguiente, 48 horas post-transfección, se recogió el sobrenadante de las células Phoenix Ampho transfectadas conteniendo los retrovirus, que se filtró a través de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millex-HP, Millipore) y se añadió a los pocillos de las placas de 24 pocillos con RetroNectin. Las placas se centrifugaron a 2.000 g durante 2 horas a 32<sup>0</sup>C y se incubaron durante 4 horas. Después se retiró el virus no unido y se plaquearon  $7,5 \times 10^4$  células Jurkat o  $5 \times 10^5$  timocitos en 1,5 mL de medio RPMI 1640 completo con 30% de FBS inactivado suplementado con 8 ng/mL del polimerización polybrene y se volvió a centrifugar la placa. En el caso de los timocitos, el medio lleva además 1 ng/mL de IL-7 murina y 5 ng/mL de FLT3L humano. Las células Jurkat fueron incubadas durante 16-24 horas, transvasadas a pocillos de una placa de 6 pocillos con medio fresco y, 24 horas después, las células GFP<sup>+</sup> fueron purificadas mediante citometría de flujo en un separador celular. Los timocitos fueron transducidos de forma consecutiva durante un total de tres días seguidos siguiendo el mismo protocolo de centrifugación, sustituyendo 1 mL de medio de la transducción anterior por 1 mL de sobrenadante con retrovirus frescos obtenidos de las placas de células Phoenix Ampho transfectadas anteriormente, y después fueron cultivados sobre monocapas de células OP9 en presencia de 1 ng/mL de IL-7 murina y 5 ng/mL de FLT3L humano durante 10 días antes de purificar las células por citometría de flujo según la expresión de CD4 y CD8.

La transducción viral, retrovirus MigR y lentivirus de la colección MISSION de Sigma, de las células SCID.adh se realizó mediante espinoculación. Los retrovirus MigR fueron producidos en células HEK-293T al 90% de confluencia en pocillos de placas de 6 pocillos mediante transfección de 4,2  $\mu\text{g}$  del vector MigR correspondiente junto con 4,2  $\mu\text{g}$  del plásmido que contiene el gen de la envuelta ecotrópica del virus de la leucemia murina y 1,7  $\mu\text{g}$  del plásmido que contiene los genes *gag-pol* utilizando Lipo D (SignaGen Laboratories). Para ello, 30-60 minutos antes se cambió el medio a las células. Se mezclaron 500  $\mu\text{L}$  medio DMEM alta glucosa sin suero con la combinación de 10  $\mu\text{g}$  de los plásmidos mencionados para cada transfección (solución A). También se mezclaron aparte 30  $\mu\text{L}$  de Lipo D y 500  $\mu\text{L}$  de medio DMEM alta glucosa sin suero para cada transfección (solución B). Se echó

la solución B sobre la solución A, se mezclaron mediante vórtex y se realizó una breve centrifugación. Las mezclas se incubaron durante 15-20 minutos a temperatura ambiente y se añadieron gota a gota sobre cada pocillo de la placa de 6 pocillos conteniendo a las células HEK-293T. Los lentivirus fueron producidos de la misma forma pero utilizando los plásmidos lentivirales MISSION (Sigma-Aldrich) correspondientes junto con 4,2 µg del plásmido que contiene el gen de la envuelta ecotrópica del virus de la leucemia murina y 1,7 µg del plásmido pD7.8 con los genes *gag-pol*. Los vectores shRunx1 MISSION usados fueron TRCN0000338489 (shRunx1#89) y TRCN0000013660 (shRunx1#60) y los vectores shMyb MISSION empleados fueron TRCN0000042498 (shMyb#98) y TRCN0000042501 (shMyb#01). Se cambió el medio de las células 5 horas después de la transfección añadiendo 1 mL de medio DMEM completo con 10% FBS inactivado y los sobrenadantes que contenían los virus fueron recogidos 2 días después de la transfección. Los sobrenadantes fueron centrifugados a 3.000 revoluciones por minuto (rpm) en una centrífuga durante 15 minutos a 4<sup>0</sup>C y filtrados. A cada mL de este sobrenadante con virus se le añadieron 8 ng de polybrene y se mezclaron con 0,5-1x10<sup>6</sup> células SCID.adh en pocillos en placas de 24 pocillos. Las placas fueron centrifugadas a 1.400 g (2.000 rpm) durante 45 minutos a temperatura ambiente e incubadas a 37<sup>0</sup>C en medio completo con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células SCID.adh GFP<sup>+</sup> procedentes de las transducciones retrovirales con MigR fueron aisladas por citometría de flujo usando un citómetro separador (Becton Dickinson Aria III), mientras que las células transducidas con los lentivirus fueron seleccionadas por resistencia al antibiótico puromicina.

#### **7. Cuantificación de los transcritos celulares: RT-qPCR (PCR cuantitativa mediada por transcripción inversa)**

El ARN de las células se aisló utilizando el reactivo peqGOLD TriFast (Peqlab) basado en fenol y tiocianato de guanidinio. Para ello, las células fueron lisadas en dicho reactivo a una concentración aproximada de 10x10<sup>6</sup> células/mL y se guardaron los lisados a -80<sup>0</sup>C o se continuó con el procedimiento que se describe a continuación. Para la obtención del ARN, se añadió 0,2 mL de cloroformo/mL de lisado, se agitaron las muestras durante 15 segundos a mano y se dejaron reposar de 3-10 minutos a temperatura ambiente. Los lisados se centrifugaron a 12.000 g a temperatura ambiente durante 5 minutos en una minicentrífuga para separar las fases orgánica y acuosa. Se aisló la fase acuosa en un tubo nuevo y se añadió 0,5 mL de isopropanol por mL de lisado original, se mezcló bien, se incubó en hielo durante 15 minutos y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 rpm a 4<sup>0</sup>C. El ARN precipitado se lavó con etanol al 75% y se centrifugó durante 5 minutos a 7500 rpm a 4<sup>0</sup>C. El ARN

se dejó secar a temperatura ambiente y fue resuspendido en agua milliQ. La concentración de ARN se midió mediante un espectrofotómetro NanoDrop. Para la generación del ADN complementario (*complementary DNA*, cDNA) se utilizó el kit sScript cDNA SuperMix (Quanta Biosciences) mezclando 1 µg de ARN con una mezcla que contiene dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, hexaprimers y oligo-dT, inhibidor de RNAsa y la enzima transcriptasa reversa. Para ello, en un volumen de 10 µL se ponen 1 µg de ARN, 4 µL de la mezcla y se completa con agua estéril tratada con dietilpirocarbonato (diethylpyrocarbonate, DEPC). Los tubos se incuban a 25°C durante 5 minutos, a 42°C durante 30 minutos y a 85°C durante 5 minutos. Finalmente el volumen de 10 µL fue llevado hasta 100 µL con agua milliQ.

La cantidad relativa de los transcritos respecto a la transcripción del gen de β-actina se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa de forma cuantitativa (*quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR). La qPCR se realizó a partir de 4 µL de cDNA de cada muestra utilizando el kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) conteniendo una mezcla de los cuatro 2'-desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), MgCl<sub>2</sub>, el intercalante de ADN SYBR Green y los oligonucleótidos correspondientes a cada transcrito a medir utilizando un termociclador Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad). Para ello, 4 µL de cada cDNA, se mezcló con 5 µL de la mezcla del kit y 0,5 µL de cada oligonucleótido 10 µM, en un volumen total de 10 µL. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla 1 (al final de esta sección). El protocolo de temperaturas de qPCR fue: 95°C durante 7 minutos, seguidos de 45 ciclos de tres pasos (95°C durante 30 segundos, 59,5°C durante 45 segundos, 72°C durante 30 segundos) y, finalmente, una incubación de 95°C durante 1 minuto. Las condiciones de la curva ascendente de temperatura para separar las hebras de los productos de PCR o “*Melting*” fueron de 55-90°C con un incremento de 0,5°C cada 5 segundos. Los cálculos de la expresión de los transcritos se realizaron según el método de Livak o del ΔΔCt, normalizando los valores obtenidos para los transcritos de cada muestra con su correspondiente valor para los transcritos del gen de β-actina (*Actb* en transcritos de ratón o *ACTB* en transcritos humanos).

## **8. Inmunoprecipitación de cromatina cuantitativa (qChIP).**

Las células SCID.adh sin estimular o estimuladas con P+I durante 24 o 48 horas fueron tratadas con formaldehído al 1% durante 10 minutos a temperatura ambiente para entrecruzar el ADN y las proteínas. La reacción fue detenida añadiendo glicina hasta obtener una concentración final de 0,125 M e incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente.



Después de dos lavados con PBS o solución tampón de Hank (*Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS),  $2 \times 10^7$  células fueron resuspendidas en 500  $\mu$ L de un tampón de lisis conteniendo 1% de dodecil sulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS), 10 mM de ácido dietilendiaminotetraacético (*Ethylene Diamine Tetra-Acetic acid*, EDTA), 50mM de Tris-HCl [pH:8,1], 1mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (*PhenylMethylSulfonyl Fluoride*, PMSF ) y un cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete, Roche) e incubadas durante 10 minutos en hielo. Los lisados celulares fueron sonicados en tubos de 1,5 mL inmersos en hielo usando un sonicador Branson al 50 % de capacidad, durante 13 ciclos con periodos de sonicación de 15 segundos y periodos de reposo de 2-5 minutos. El ADN cromosomal se redujo a un tamaño entre 200-500 pb, como se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa. Los lisados sonicados fueron centrifugados en durante 30 minutos a 14.000 rpm a 4°C en una minicentrífuga y el sobrenadante fue diluido 10 veces añadiendo 4,5 mL de un buffer de unión conteniendo 0,01% de SDS, 1,1% de Tritón X-100 (v/v), 1,2 mM de EDTA, 16,7 mM de Tris-HCl [pH 8,1], 167 mM de NaCl, 1 mM de PMSF 1mM y el cóctel de inhibidores de proteasas. El 5% del material total (250  $\mu$ L) fue guardado para usar como material de partida o “input” para utilizarlo en las reacciones de qPCR para el cálculo de la cantidad de cromatina inmunoprecipitada. Los lisados fueron “pre-aclarados” mediante incubación con 140  $\mu$ L de proteína A agarosa previamente bloqueada con seroalbúmina bovina (*Bovine Serum Albumin*, BSA) y lavada según las indicaciones del fabricante (Upstate Biotechnology) durante 2-3 horas a 4°C con el fin de disminuir las uniones inespecíficas de la cromatina a la agarosa. La cromatina pre-aclarada fue dividida en 2 alícuotas de aproximadamente 2,5 mL (correspondiente a  $10^7$  de células SCID.adh) en tubos de poliestireno de 5 mL, añadiendo a cada tubo 5-10  $\mu$ g del Ab correspondiente o del Ab control e incubada durante 16 horas a 4°C en rotación. Al día siguiente se realizó otra incubación de 2 horas a 4°C, adicionando 70  $\mu$ L de proteína A/agarosa previamente bloqueada a la que se unirán los complejos ADN/proteína. Además en esta incubación se añadieron 25  $\mu$ l de BSA 20 mg/ml y 40  $\mu$ g de ADN de esperma de salmón previamente sonicado (previalmente calentado y enfriado en hielo). Los inmunoprecipitados fueron transferidos a tubos de 1,5 mL y se lavaron con 500  $\mu$ L de una serie de tampones fríos en ciclos de 5 minutos de rotación a temperatura ambiente: dos lavados con tampón de baja sal (0,1 % de SDS, 1% de Triton X-100, 2 mM de EDTA, 20 mM de Tris-HCl [pH:8,1], 150 mM de NaCl); un lavado con de alta sal (0,1% de SDS, 1% de Triton X-100, 2 mM de EDTA, 20 mM de Tris-HCl [pH:8,1], 500 mM de NaCl); un lavado en tampón TE (10 mM de Tris-HCl [pH:8,1], 1 mM de EDTA); un lavado con tampón de LiCl (1% de Nonidet P-40 (NP-40), 1% de ácido deoxicólico, 10 mM de

Tris-HCl [pH:8,1], 1 mM de EDTA, 0,5 M de LiCl) y 1 último lavado en tampón TE, con centrifugaciones en una minicentrífuga a 1.000 rpm durante 1 minuto a 4<sup>0</sup>C entre lavados, excepto la última que fue de 3 minutos. A continuación, los complejos ADN/proteína/Ab fueron separados de la proteína A-agarosa en dos ciclos, resuspendiendo el precipitado en 250 µL de un buffer de elución compuesto por 0,1M de NaHCO<sub>3</sub> y 1% de SDS, calentando a 65°C durante 1 hora y dejándolos después rotar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los eluidos fueron centrifugados a 1.000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se recogieron los sobrenadantes y se les añadió 20 µL de NaCl 5M (también al *input*) y se incubaron a 65°C durante toda la noche para eliminar los entrecruzamientos. Los complejos fueron tratados con 2 µL de RNasa A 10 mg/mL a 37 °C durante 10 minutos y 1 µL de 20 mg/mL de proteinasa K a 45°C durante 1 hora. A continuación se purificó el ADN mediante extracciones de fenol (1 vez), fenol-cloroformo (1 vez) y cloroformo (2 veces) y se precipitó a -20<sup>0</sup>C tras la adición 40 µL de 3M acetato sódico [pH:5,2], 100 µg de glicógeno y de 1 mL de etanol. Tras 2-3 días de precipitación a -20<sup>0</sup>C, el ADN fue centrifugado a 14.000 rpm durante 45 minutos a 4<sup>0</sup>C en una minicentrífuga, lavado con 300 µL de etanol frío a -20<sup>0</sup>C al 75% y resuspendido en 50 µL de agua Milli Q para los puntos de ChIP y en 250 µl los *inputs*. Las cromatinas resuspendidas fueron calentadas durante 2 minutos a 65<sup>0</sup>C. Se procedió a realizar la qPCR de los ChIPs en las mismas condiciones descritas para el análisis de transcritos utilizando 4 µL de cromatina. Los cálculos de la unión de FT se normalizaron los valores con los correspondientes *inputs* y se compararon con la unión a una secuencia exónica del gen *Oct2*, como control negativo.

Los Ab utilizados fueron IgG control (ab46540, Abcam), RUNX1 (sc-28679, Santa Cruz Biotechnology o ab23980, Abcam), MYB (sc-517, Santa Cruz Biotechnology o 05-175, Merck Millipore), STAT5 (sc-835, Santa Cruz Biotechnology), CTCF (07-729, Merck Millipore), H3K4me3 (ab8580, Abcam) y H3K27ac (ab4729, Abcam).

## 9. Construcción de plásmidos reporteros

Los plásmidos reporteros conteniendo el gen de la luciferasa de luciérnaga (LUC): Jα49p-LUC, Jα49p-LUC-Eα386, Vδ1p-LUC, TEAp-LUC y TEAp-LUC-Eα386, todos basados en el plásmido pXPG, fueron descritos anteriormente<sup>314,376</sup>. Los plásmidos Vδ1p-LUC, Eδ370-Vδ1p-LUC, Eδ370mRunx1-Vδ1p-LUC, Eδ370mMyb-Vδ1p-LUC, Eδ280-Vδ1p-LUC, Eδ160-Vδ1p-LUC, Eδ60-Vδ1p-LUC y Eδ35-Vδ1p-LUC se obtuvieron de construcciones Vδ1-CAT en el plásmido BlueScript previamente descritas<sup>402,189</sup> mediante su di-

gestión con los enzimas de restricción SacI y HindIII, para obtener los fragmentos E $\delta$ -V $\delta$ 1p. Estos fragmentos fueron subclonados en el plásmido pXPG digerido con estos mismos enzimas. Para generar el plásmido TEAp-LUC-E $\delta$ 370, se amplificó la secuencia E $\delta$ 370 por PCR convencional usando los oligonucleótidos CTGATGTGAATTCCCCCAGCCCAA-AGT y GACAGTCGAATTCCAATTGAAAGGATTAGACATT, a los que se les incluyó las secuencias para generar un sitio EcoRI para su posterior clonaje en el sitio EcoRI del plásmido TEAp-LUC derivado de pXPG.

Para estudiar la funcionalidad del enhancer E $\gamma$ , se utilizaron construcciones donde el promotor FOS (cfosp) fue clonado en sitios EcoRV y HindIII y los enhancers E $\gamma$ 1 o E $\gamma$ 4 en sitios BamHI y SalI dentro del plásmido pGL4.10 (Promega). Estos plásmidos fueron generosamente cedidos por los Dres. Koichi Ikuta y Shizue Tani-ichi de la Universidad de Kyoto, Japón.

Los plásmidos CSL-LUC (8xRBPJ $\kappa$ ) y CMV-ICN1 fueron descritos anteriormente<sup>518</sup>. Estos plásmidos fueron generosamente cedidos por el Dr. Jonathan Aster de Harvard Medical School, Estados Unidos.

## **10. Ensayos de actividad de luciferasa**

Se realizaron dos tipos de estos ensayos para medir la actividad de los enhancers E $\delta$  y E $\gamma$ . Por un lado se llevaron a cabo experimentos para ver el efecto de la señalización de Notch mediante la co-transfección conjunta de los plásmidos reporteros de LUC junto con un plásmido de expresión de ICN1, CMV-ICN1, bajo el control de las regiones reguladoras de citomegalovirus, o el plásmido control BlueScript. Por otro lado, se midió el efecto de distintas señalizaciones sobre la actividad de distintas versiones de los enhancers analizados sobre la transcripción de LUC. En todos los casos se transfectó el plásmido pGL4.10 (Promega), conteniendo el gen de luciferasa de *Renilla* bajo el control de las regiones reguladoras de la quinasa de timidina (*Thymidine Kinase*, TK), pRL-TK.

En los ensayos de co-transfección para ver el efecto de la señalización de Notch, 4x10<sup>6</sup> células Jurkat fueron lavadas con PBS frío estéril y se transfectadas con 2,5  $\mu$ g del plásmido reportero de LUC correspondiente junto con 12,5  $\mu$ g de los plásmidos CMV-ICN1 o pBlueScript (control negativo). En todos los casos se cotransfectaron las células con 10 ng de pRL-TK. La transfección se realizó mediante electroporación en 300  $\mu$ L de medio RPMI 1640 sin suero a 260 V, 80 Ohmios y 1500  $\mu$ F en cubetas BTX de 0,4 cm en un electropora-

dor Electro Cell Manipulator 600 (BTX). Inmediatamente después de la electroporación las cubetas se dejaron en hielo y se añadieron 500 µl de FBS inactivado. Las células se diluyeron en 5 mL de medio RPMI 1640 completo que previamente se deja atemperando en placas de 6 pocillos. Las células se cultivaron durante 48 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

En los ensayos en los que se midió la actividad de los plásmidos LUC en las células tratadas con diferentes tratamientos, 4x10<sup>6</sup> células Jurkat fueron electroporadas con 5 µg de la construcción LUC y 10 ng de pRL-TK *Renilla*. Una vez terminada la electroporación, el contenido de cada cubeta se repartió por igual entre dos pocillos en placas de 6 pocillos con 5 mL de medio RPMI 1640 completo, a uno de los cuales se le añadió el tratamiento correspondiente con P+I, IL-7 o DAPT, como se indicó anteriormente. Las células fueron cultivadas durante 48 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

En ambos casos, a continuación las células fueron recogidas y lisadas en hielo con un buffer compuesto de Passive Lysis Buffer (Promega) conteniendo el cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete, Roche), 1 mM de PMSF y 1 mM ditiotritiol (DTT) durante 30 minutos. Los lisados fueron congelados y guardados a -80<sup>0</sup>C un mínimo de 30 minutos para su posterior análisis, como un paso que favorece la ruptura celular por criolisis. La actividad las luciferasas (LUC/*Renilla*) se midió con el Dual-Luciferase-Kit (Promega) en un luminómetro FB12 Single tube Luminometer (Berthold). Los resultados se expresaron como el cociente entre el valor de LUC y de la luciferasa de *Renilla*.

## 11. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética

Este tipo de ensayos (*Electrophoretic Mobility Shift Assays*, EMSA) se utilizan para validar posibles sitios de unión para FT. Realizamos EMSA para validar posibles sitios de unión para RBPJκ en Eδ y Eγ, y STAT5 en Eδ.

El protocolo está estructurado en las siguientes etapas:

*Preparación de los extractos nucleares:* Para los EMSA de RBPJκ, se transfectaron células COS7 con el plásmido CMV-RBPJκ-Myc. Para los EMSA de STAT5, se hicieron extractos celulares de células SCID.adh estimuladas o no con 10 ng/mL de IL-7 durante 48 horas. Para la obtención de los extractos nucleares en los dos casos, 10<sup>7</sup> de células fueron lavadas con 10 mL de PBS y centrifugadas para obtener un precipitado celular. El precipitado de células fue resuspendido en 300 µl de buffer-A frío (10 mM de Tris-HCl [pH: 7,9], 60 mM de KCl, 1 mM de EDTA, 0,5 µM de PMSF y el cóctel de inhibidores de proteasas (cOmple-

te, Roche) e incubado durante 15 minutos en hielo en un tubo de 1,5 mL para facilitar la lisis de las membranas plasmáticas. A continuación se añadió 0,4% de NP-40 a los lisados y se les dio un vórtex a las muestras durante 10 segundos. Se dejaron los lisados en hielo durante 3 minutos previos a una centrifugación a 15.000 rpm durante 3 minutos a 4°C en una mini-centrífuga. Los núcleos celulares obtenidos tras este tratamiento se lavaron con buffer-A frío y se resuspendieron en 100 µL de buffer-C frío (20 mM de Tris-HCl [pH:8,0], 0,4M de NaCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 0,5 µM de PMSF y el cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete, Roche), dejándose en rotación a 4°C durante 30 minutos. A continuación se separaron los extractos nucleares de los restos celulares no disueltos mediante centrifugación a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C en una minicentrífuga. Se añadió glicerol a los extractos nucleares con una concentración final del 25%. Los extractos nucleares fueron guardados a -80 °C hasta su posterior uso. La concentración de proteína de los extractos nucleares se realizó mediante la técnica de Bradford (Bio-Rad).

*Marcaje de las sondas:* Las sondas utilizadas son oligonucleótidos de doble cadena marcados radiactivamente con <sup>32</sup>P, que contienen la secuencia de unión del FT a ensayar, en nuestro caso RBPJk y STAT5. Para ello, nucleótidos de simple cadena purificados por cromatografía de líquidos de alto rendimiento (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) (Metabion) se resuspendieron a una concentración de 200 µM. Las secuencias de las sondas utilizadas están registradas en la tabla 1 (al final de esta sección). Para obtener oligonucleótidos de doble cadena, 5 nmoles de cada oligonucleótido se hibridó con su complementario en 200 µl de buffer 2 (New England Biolabs). La mezcla de los dos oligos complementarios se calentó durante 2 minutos a 95°C en un bloque térmico (Eppendorf), el cual se dejó apagado hasta que llegó a temperatura ambiente para conseguir la hibridación completa de los oligonucleótidos, que se guardaron a -20°C para su posterior uso.

Antes del marcaje radiactivo, cada oligonucleótido de doble cadena fue diluido 10 veces con agua milliQ para obtener una concentración de 2,5 pmoles/µL. Para el marcaje se mezclaron 2 µL de cada nucleótido de doble cadena (5 pmoles), 5 µL del buffer 10X para la T4 polinucleótido quinasa (100 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 nM de DTT, 700 mM de Tris-HCl [pH:7,6]) junto con 2,5 µCi de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-adenosina trifosfato (ATP) (PerkinElmer), 2 µL de T4 polinucleótido quinasa y 35,5 µL de agua MilliQ. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 45 minutos y posteriormente a 65°C durante 10 minutos. Para terminar se le añadió 50 µL de agua MilliQ. Finalmente las sondas se purificaron usando cromatografía de exclusión con Sephadex G-25 en jeringas de 1 mL con tampón TE mediante centrifugación, y posterior-

mente se filtraron usando filtros de 0,45  $\mu\text{m}$ . El marcaje de cada sonda se midió analizando las desintegraciones o cuentas por minuto (cpm) presentes en 2  $\mu\text{L}$  de usando un contador de radiactividad (QC-2000, Bioscan).

*Unión ADN-proteína:* Las reacciones de unión se realizaron en 25  $\mu\text{L}$  con 1  $\mu\text{g}$  de BSA, 0,5  $\mu\text{g}$  de poli-dI-dC (Sigma), 10 mM de Tris-HCl [pH:7,5], 50 mM de NaCl, 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA y 2% de glicerol, en presencia de determinadas cantidades de extractos celulares o tampón C con 25% de glicerol. Antes de analizar la unión de cada FT a cada sonda, se hicieron experimentos de prueba con distintas cantidades del extracto nuclear para establecer las condiciones experimentales adecuadas. A continuación se añaden 30.000 cpm de la sonda correspondiente y el exceso de oligonucleótidos sin marcar en el caso que se hagan competiciones. La mezcla se incuba durante 30 minutos en hielo. En caso de añadirse Ab, 1  $\mu\text{g}$  del Ab específico o control se añade a la mezcla y se incuba durante 20-30 minutos más. Se usó 1  $\mu\text{g}$  de Ab para MYC (clon 9E10 de Abcam o Santa Cruz Biotechnology), STAT5 (sc-835, Santa Cruz Biotechnology) y Ab control (Sigma).

*Electroforesis del gel:* Se utilizaron geles de acrilamida al 4% (19:1 acrilamida/bisacrilamida) en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5X: 44,5 mM de Tris, 44,5 mM de ácido bórico y 1 mM de EDTA. Antes de cargar las muestras, los geles se pre-corrieron a 200 V durante un 45-90 minutos en un cuarto frío para eliminar las trazas de persulfato de amonio usado para polimerizar los geles de poli(acrilamida), distribuir los iones del buffer de electroforesis y asegurar una temperatura constante del gel. Después, se añade azul de bromofenol a las reacciones y se corren las muestras a un voltaje continuo de 200 V a 4°C durante aproximadamente 90 minutos. Al finalizar la electroforesis, se procedió a la extracción cuidadosa de los geles de los cristales, se pusieron sobre papel Whatman, se fijaron en una mezcla de 30% metanol y 10% ácido acético durante 15 minutos y se secaron en un secador de geles con vacío (Bio-Rad) durante 1 hora. Una vez secos totalmente, se metieron dentro de un cassette junto a una película radiográfica (Sigma Life Plus) a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante uno o varios días. Se hicieron exposiciones a diversos tiempos en función de la intensidad. Las películas fueron reveladas en un revelador AGFA CURIX 60.

## **12. Análisis y separación de poblaciones celulares mediante citometría de flujo**

Para el análisis de las distintas poblaciones de timocitos de ratones  $Rag2^{-/-}$  x  $E\alpha^{-/-}$  inyectados con Ab para CD3 $\epsilon$ , los timocitos fueron marcados simultáneamente con los Ab

CD4-FITC, CD8-PE y CD25-APC (BD Biosciences Pharmingen) a una dilución 1:100 en un tampón HBSS con 2% de FBS inactivado en hielo y oscuridad durante 20-30 minutos. La medición se realizó utilizando el software FlowJo en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Excalibur Analyzer). La tinción de las poblaciones aisladas mediante el Sorter (Becton Dickinson Aria III) fueron preparadas de la misma forma usando los Ab CD4-FITC y CD8-PE

### 13. Análisis estadístico

Los datos se expresan como media  $\pm$  el error de la medida estándar (*Standard Error of Measurement*, SEM) de los resultados obtenidos por duplicado de al menos tres experimentos independientes (n). A los resultados se les aplicó el test no paramétrico de t de Student con corrección de Welch. Estos análisis se realizaron con el programa Prism de GraphPad. Los p valores se representan mediante \*: p<0,05 (\*), p<0,005 (\*\*), y p<0,0005 (\*\*\*)

### 14. Tabla1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados

#### Transcritos de ratón:

<b>C<math>\alpha</math></b>	5'- CCTGGAGCAACCAGACAA
	5'- GGCTACTTTCAGCAGGAGGA
<b>C<math>\delta</math></b>	5'- TACGACTGCTGTTTGCCAAGA
	5'- TGAAGGGTCAGTCTGAAGCA
<b>C<math>\gamma</math>4</b>	5'- CCCAGGAAGGAAACACCATA
	5'- TCATGCCGCAAAACACTATC
<b>Runx1</b>	5'- CTCGGCAGAACTGAGAAATG
	5'- GGTGATGGTCAGAGTGA
<b>Runx3</b>	5'- GGTTCAACGACCTTCGATTC
	5'- GGTCCATCCACAGTGACCTT
<b>Myb</b>	5'- GAGCAGAAGAAGTTTCCCGATTT
	5'- AGCGGGAATCGGATGAATCT
<b>Ubb</b>	5'- GCCCAGTGTACCACCAAGA
	5'- CCCATCACACCCAAGAACA
<b>Notch1</b>	5'- AGATCGACAACCGGCAATGT
	5'- CCCACAGCCCACAAAGAAC
<b>Hes1</b>	5'- TACCCCAGCCAGTGTCAACA
	5'- TTCTTGCCCTTCGCCTCTT
<b>Il7r</b>	5'- AGTCCGATCCATTCCCCATAA
	5'- ATTCTTGGGTTCTGGAGTTTCG
<b>Actb</b>	5'- ACACCCGCCACCAGTTC
	5'- TACAGCCCGGGGAGCAT

**Transcritos humanos:**

<b>C<math>\delta</math></b>	5'- ACTGTGCACTCCACTGACTT
	5'- CACCTTCTCGGTATGAACTA
<b>ICN1</b>	5'- GCCGTCATCTCCGACTTCAT
	5'- CGGCATCAGAGCGTGAGTAG
<b>HES1</b>	5'- ATAGCTCGCGGCATTCCAAG
	5'- TGTGCTCAGCGCAGCCGTCA
<b>RUNX1</b>	5'- CTGCCCATCGCTTTCAAGGT
	5'- GCCGAGTAGTTTTTCATCATTGCC
<b>RUNX3</b>	5'- AGCACCACAAGCCACTTCAG
	5'- GGGAAGGAGCGGTCAAAGT
<b>MYB</b>	5'- GAAAGCGTCACTTGGGGAAAA
	5'- TGTTTCGATTCGGGAGATAATTGG
<b>IL7R</b>	5'- GGAGAAAGTGGCTATGCTCAAAA
	5'- TCCATTCACCTTCCAAGTGGCTAT
<b>ACTB</b>	5'- CGCGAGAAGATGACCCAGA
	5'- TCACGATGCCAGTGGTACG

**qChIP**

<b>E<math>\delta</math></b>	5'- CTTCTCGAAGGAGAGGCAAG
	5'- ATCTGCTCTCAACCCTCCTG
<b>E<math>\gamma</math>4</b>	5'- GACATCTCAGCAGCCTCCTT
	5'- TGAGCATTTTCCAAGAAGCA
<b>Oct2</b>	5'- CGGGTGTGAGAGGTGTGG
	5'- CGAGTCTGAAGCAAGCCAGT
<b>E<math>\alpha</math>-CTCF</b>	5'- AGGAAGTCGCAGAACCTGAA
	5'- CGTAGGATGCAGGGATTTTC

**EMSAs**

<b>hE<math>\delta</math> <math>\delta</math>E3</b>	5'- GATCAGCAATGCATGTGGTTTTCCAACCGTTAATGCTAGA
	5'- GATCTCTAGCATTAAACGGTTGGAAACCACATGCATTGCT
<b>hE<math>\delta</math> 5'-<math>\delta</math>E1 RBPJ<math>\kappa</math></b>	5'- CAACTAAATCAGACCAGGAT
	5'- ATCCTGGTCTGATTTAGTTG
<b>hE<math>\delta</math> 5'-<math>\delta</math>E3 RBPJ<math>\kappa</math></b>	5'- GGGAGGTGAGTGAGCAATGC
	5'- GCATTGCTCACTCACCTCCC
<b>hE<math>\delta</math> <math>\delta</math>E5/6 RBPJ<math>\kappa</math></b>	5'- GGAAGTTTTCTCAAGCAGGT
	5'- ACCTGCTTGAGAAAATTCC
<b>hE<math>\delta</math> <math>\delta</math>E5/6 RBPJ<math>\kappa</math> - MUT</b>	5'- GGAAGTTTTATTAAGCAGGT
	5'- ACCTGCTTAATAAACTCC
<b>mE<math>\gamma</math>4 NF<math>\gamma</math>1/2 RBPJ<math>\kappa</math></b>	5'- CTTTATTTTCTCAGGCATCTT
	5'- AAGATGCCTGAGAAAATAAAG
<b>mE<math>\gamma</math>4 NF<math>\gamma</math>4 RBPJ<math>\kappa</math></b>	5'- GCAGAGTCACACTGCGGACAG
	5'- CTGTAAGCAGTGTGACTCTGC
<b>HES1-WT</b>	5'- GGTTACTGTGGGAAAGAAA
	5'- TTTCTTTCCACAGTAACC



<b>HES1-MUT</b>	5'- GGTTACTGACGCTAAGAAA
	5'- TTTCTTAGCGTCAGTAACC
<b>hEδ Eδ6/7 STAT5</b>	5'- AAAGCAGGTTCCAAGAAAGCCCTTT
	5'- AAAGGGCTTTCTTGGAACCTGCTTT
<b>hEd 3'Eδ STAT5</b>	5'- TGGGGGGTTTCTCTGAATAGTTGAT
	5'- ATCAACTATTCAGAGAAACCCCCA
<b>STAT5 site</b>	5'- TAAAAGATTTCTAGGAATTCAATCC
	5'- GGATTGAATTCCTAGAAATCTTTTA
<b>STAT5 site – MUT</b>	5'- TAAAAGATTTAGTTTAATTCAATCC
	5'- GGATTGAATTAATACTAAATCTTTTA

**Clonaje de Eδ370 en sitios *EcoRI* de TEAp-LUC.**

<b>Eδ370</b>	5'- CTGATGTGAATTCAGCCCAAGT
	5'- GACAGTCGAATTCGAATTGAAAGGATTAGACATT

## **Resultados**

## 1. La transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg* depende del reclutamiento de RUNX1 Y MYB a E $\delta$ y E $\gamma$ durante el desarrollo de los timocitos

La transcripción germinal y los reordenamientos de los genes *Tcra*, *Tcrd* y *Tcrg* son dependientes de sus respectivos *enhancers* y están muy regulados durante la selección- $\beta$ <sup>58</sup>. En los genes *Tcrd* y *Tcrg*, estos eventos ocurren en timocitos DN2 y DN3a, mientras que en el gen *Tcra* ocurren en timocitos DP. Nosotros hemos confirmado esta regulación mediante RT-qPCR, cuantificando los transcritos germinales C $\alpha$ , C $\delta$  y C $\gamma$ 4 (como representante de los distintos C $\gamma$  del locus *Tcrg* de ratón), en presencia y ausencia de E $\alpha$ , en timocitos DN3a de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> y en timocitos DP de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg<sup>428,429</sup> (Figura 16A). La utilización de timocitos de ratones de fondo *Rag2*<sup>-/-</sup> permite analizar todos los transcritos germinales de los genes del TCR ya que, al carecer de RAG2, no ocurre la recombinación V(D)J<sup>428</sup>. Además, como se mencionó en la Introducción, los ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> tienen un bloqueo en el estadio DN3a debido a su incapacidad para reordenar los genes del TCR, mientras que en los ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg, al expresar una cadena TCR $\beta$  transgénica, sus timocitos pueden diferenciar hasta el estadio DP<sup>429,428</sup>. Así, los ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> constituyen una fuente prácticamente pura de timocitos DN3a, mientras que los ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg constituyen una fuente prácticamente pura de timocitos DP, con los genes del TCR en configuración no reordenada.

Nuestros análisis transcripcionales realizados mediante RT-qPCR (Figura 16A) confirmaron los datos obtenidos previamente por Northern-blots<sup>372,373</sup>. Nuestros experimentos indicaron que los transcritos C $\alpha$  no están presentes en timocitos *Rag2*<sup>-/-</sup>, pero son muy abundantes en timocitos *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg. Además, de acuerdo con el papel esencial de E $\alpha$  para la transcripción germinal del gen *Tcra*<sup>373</sup>, se comprobó que los transcritos C $\alpha$  dependen totalmente de la función de E $\alpha$ , ya que no se observan en timocitos DP de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg x E $\alpha$ <sup>-/-</sup>. A diferencia de los transcritos C $\alpha$ , los transcritos C $\delta$  son muy abundantes en timocitos DN3a de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> y *Rag2*<sup>-/-</sup> x E $\alpha$ <sup>-/-</sup>. La transcripción de C $\delta$  en los timocitos *Rag2*<sup>-/-</sup> y *Rag2*<sup>-/-</sup> x E $\alpha$ <sup>-/-</sup> depende de la función de E $\delta$ , el cual está activo en timocitos DN3a, y no se ve afectada por la ausencia de E $\alpha$ , el cual está inactivo en timocitos DN3a. También se observó que los transcritos C $\delta$  son abundantes en timocitos DP de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg y están ausentes en timocitos DP de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg x E $\alpha$ <sup>-/-</sup>. Estos datos demuestran que los transcritos de C $\delta$  observados en timocitos DP de los ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg son dependientes de la activación de E $\alpha$  en estos timocitos. La activación de E $\alpha$  en timocitos DP afecta a la

transcripción del gen *Tcrd*, ya que este gen se encuentra en *cis* respecto a  $E\alpha$  en la configuración no reordenada del locus *Tcra/Tcrd* presente en los ratones *Rag2*<sup>-/-</sup>. Por tanto, los transcritos C $\delta$  presentes en los timocitos DN3a en ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> son consecuencia de la actividad de  $E\delta$ , mientras que los transcritos C $\delta$  presentes en timocitos DP en ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg son consecuencia de la activación de  $E\alpha$ , actuando en *cis*. La ausencia de transcritos C $\delta$  en timocitos DP de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg x  $E\alpha$ <sup>-/-</sup> demuestra que la transcripción del gen *Tcrd* dependiente de  $E\delta$  se inhibe en la transición de los timocitos de DN3a a DP, tal y como sucede en la situación natural tras el reordenamiento del gen *Tcra* que da lugar al aislamiento del gen *Tcrd* de la influencia de  $E\alpha$ .

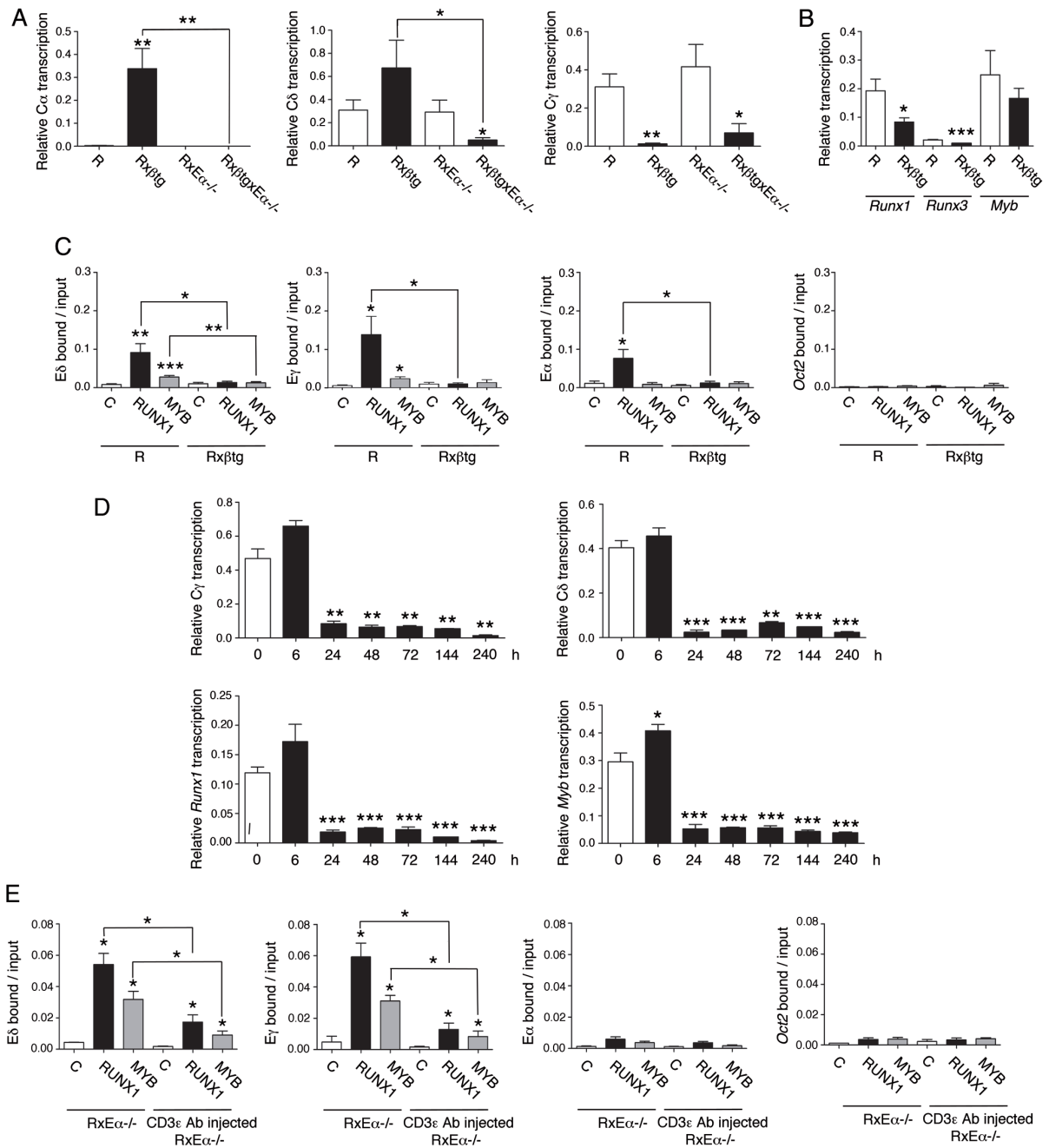
En cuanto a la regulación de los transcritos germinales del gen *Tcrg*, de acuerdo con su regulación transcripcional durante la selección- $\beta$ <sup>390,391</sup>, nuestros datos indican que la transcripción de  $C\gamma$  es alta en timocitos DN3a de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> y está fuertemente inhibida en timocitos DP de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg, siendo independiente de la actividad de  $E\alpha$ .

Estos resultados confirman que la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg* es muy abundante en timocitos DN3a y está fuertemente inhibida en timocitos DP, mientras que la transcripción del gen *Tcra*, la cual es dependiente de  $E\alpha$ , se induce en la transición de los timocitos de DN3a a DP.

La inactivación de la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg* durante la selección- $\beta$  coincide y se correlaciona con la pérdida de la unión de los FT de la familia RUNX a un sitio de unión esencial presente en los elementos  $\delta E3$  y  $NF\gamma3$ , de los *enhancers*  $E\delta$  y  $E\gamma$  respectivamente<sup>372,391</sup>. De los tres miembros de la familia RUNX presentes en timocitos, la transcripción de *Runx1* es mucho más alta que la de *Runx2* y *Runx3* en timocitos DN2/DN3a (Figura 17), y su nivel transcripcional se corresponde con los de los genes *Tcrd* y *Tcrg* durante la selección- $\beta$ <sup>60,519</sup>. De acuerdo con estos datos, nuestros análisis por RT-qPCR indican que los transcritos de *Runx1* son mucho más abundantes que los de *Runx3* en timocitos DN3a de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup>, siendo ambos inhibidos en timocitos DP de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg (Figura 16B). Para evaluar si RUNX1 es el miembro de la familia RUNX que se une a los *enhancers* de los genes *Tcrd* y *Tcrg*, y si esta unión se correlaciona con la regulación de la transcripción de estos genes durante la selección- $\beta$ , hicimos experimentos de qChIP para comparar el reclutamiento de RUNX1 a  $E\delta$  y  $E\gamma4$  (como representante de los  $E\gamma$  del locus *Tcrg* de ratón) en timocitos DN3a y DP procedentes de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> y *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg, respectivamente (Figura 16C). De acuerdo con el descenso de la transcripción de *Runx1* en

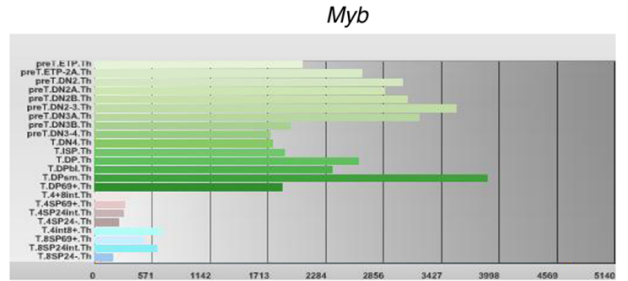
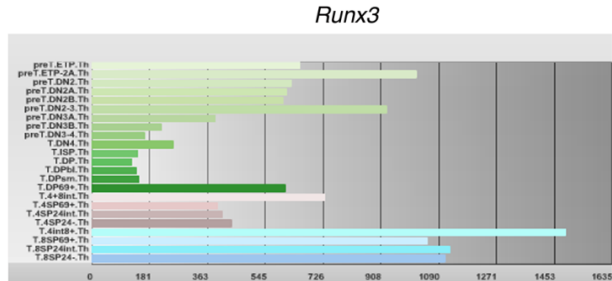
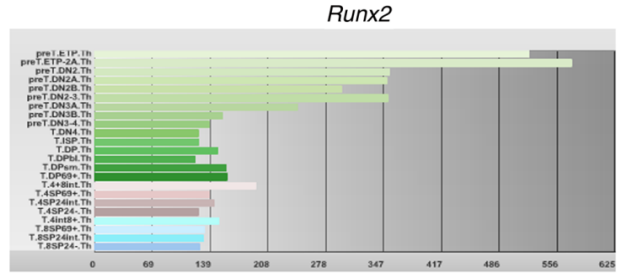
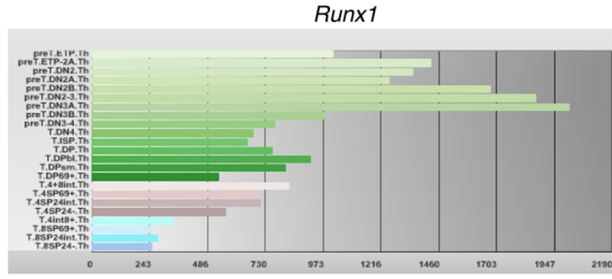
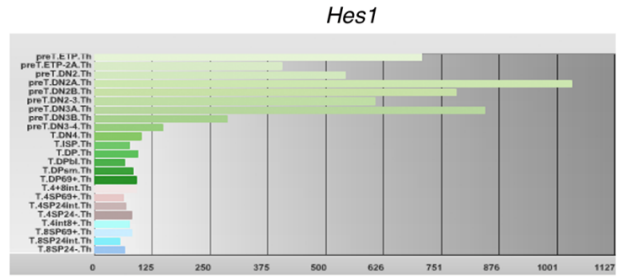
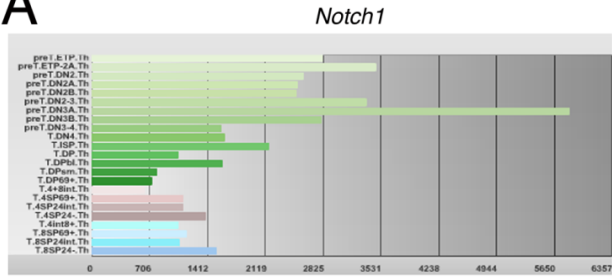
timocitos DP en comparación con timocitos DN3a (Figura 16B), observamos que la unión de RUNX1 a E $\delta$  y E $\gamma$  en timocitos DN3a de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> se inhibe claramente en timocitos DP de *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg, indicando que el reclutamiento de RUNX1 en timocitos DN3a es mucho más eficiente que en timocitos DP. También analizamos la unión de RUNX1 a E $\alpha$  como control positivo<sup>332</sup> y a una región exónica de *Oct2*, gen que no se expresa en timocitos como control negativo (Figura 16C). De acuerdo con los resultados obtenidos previamente en timocitos por ChIP-seq<sup>332</sup>, observamos una reducción de la unión de RUNX1 a E $\alpha$  en timocitos DP de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg comparada con su unión en timocitos DN3a de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup>. Como era previsible, no observamos una unión significativa de este FT a la secuencia control *Oct2*. Estos resultados demuestran que RUNX1 se une específicamente a E $\delta$  y E $\gamma$  en timocitos DN3a, y que este FT se disocia de la cromatina de estos *enhancers* en timocitos DP, estableciéndose una correlación directa entre la unión de RUNX1 a E $\delta$  y E $\gamma$  y la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg* durante el desarrollo de los timocitos DN3a a DP.

La función de E $\delta$  y E $\gamma$  también depende de la ocupación de un sitio MYB, adyacente al sitio de unión RUNX1, presente en los elementos  $\delta$ E3 y NF $\gamma$ 3 de los *enhancers* E $\delta$  y E $\gamma$ , respectivamente<sup>189,403,411</sup>. Estudios previos mostraron que MYB se une a E $\gamma$  en células SCID.adh y que un oligonucleótido antisentido de *MYB* es capaz de inhibir la actividad de E $\delta$  en células Jurkat transfectadas con construcciones reporteras dependientes de E $\delta$ <sup>189,342</sup>. El análisis de los niveles de transcripción de *Myb*, analizados tanto por microarrays como por RNA-seq, en timocitos DN3a y DP de ratones WT (Figura 17), como por RT-qPCR en timocitos de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> y *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg no muestran diferencias transcripcionales significativas (Figura 16B). Sin embargo, nuestros experimentos de qChIP revelaron que hay una fuerte unión de MYB a E $\delta$  y E $\gamma$  en timocitos DN3a de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup>, la cual se inhibe claramente en timocitos DP de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg, no observándose unión de MYB a las secuencias control E $\alpha$  y *Oct2* (Figura 16C). Por tanto, nuestros datos indican que la unión de MYB y RUNX1 a E $\delta$  y E $\gamma$  se correlaciona directamente con los niveles de los transcritos *Tcrg* y *Tcrd* presentes en timocitos DN3a y DP, apoyando que el eficiente reclutamiento de esos FT durante el desarrollo de los timocitos está directamente implicado en la regulación de la transcripción de estos genes durante la selección- $\beta$ .

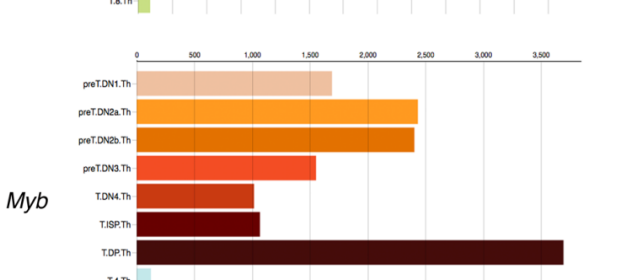
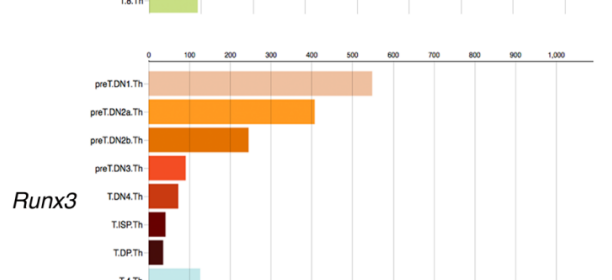
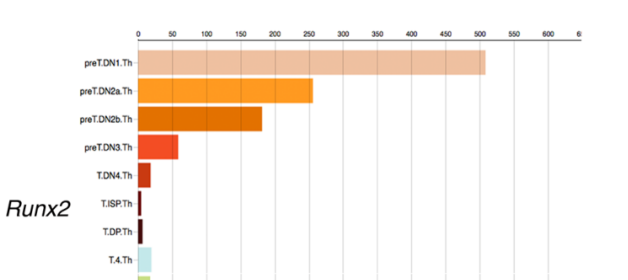
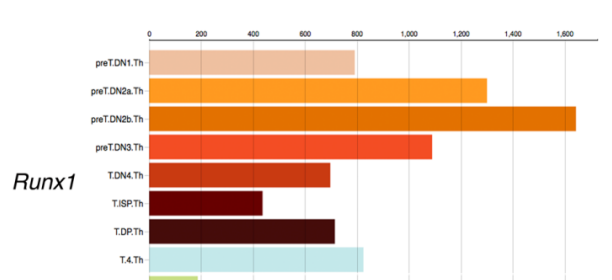
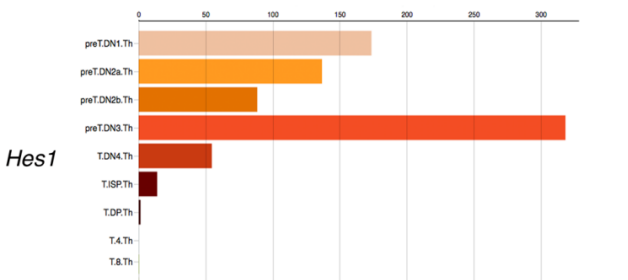
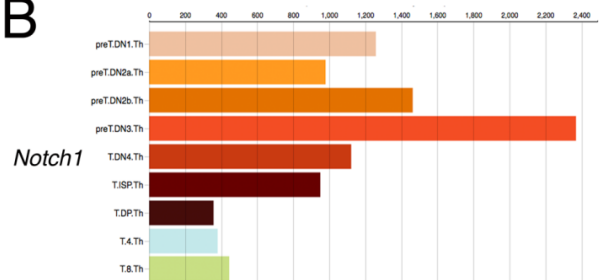


**Figura 16. La transcripción de *Tcrd* y *Tcrg* está asociada con el reclutamiento de RUNX1 y MYB a Eδ y Eγ durante la selección-β.** (A) Análisis transcripcional por RT-qPCR de Cα, Cδ y Cγ en timocitos de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup>, *Rag2*<sup>-/-</sup> x βtg, *Rag2*<sup>-/-</sup> x Eα<sup>-/-</sup> y *Rag2*<sup>-/-</sup> x βtg x Eα<sup>-/-</sup> (n=6-7). (B) Análisis transcripcional por RT-qPCR de *Runx1*, *Runx3* y *Myb* en timocitos de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> y *Rag2*<sup>-/-</sup> x βtg (n=5-11). (C) Análisis por qChIP de la unión de RUNX1 y MYB a Eδ, Eγ, Eα y *Oct2* en timocitos de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> y *Rag2*<sup>-/-</sup> x βtg (n=5-9). (D) Análisis transcripcional por RT-qPCR de Cγ, Cδ, *Runx1* y *Myb* en timocitos de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x Eα<sup>-/-</sup> después de ser inyectados con un Ab monoclonal para CD3ε y sacrificados a los tiempos indicados (n=3). (E) Análisis por ChIP de la unión de RUNX1 y MYB a Eδ, Eγ, Eα y *Oct2* en timocitos de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x Eα<sup>-/-</sup> sacrificados 10 días después de ser inyectados con un Ab monoclonal para CD3ε (n=3). Los datos son representados como la media ± SEM de resultados obtenidos por duplicado de n experimentos independientes. Se muestra la significancia entre los valores obtenidos según se indica o relativa al control de timocitos *Rag2*<sup>-/-</sup> x Eα<sup>-/-</sup> sacrificados a tiempo 0 de inyección que corresponde con ratones control no inyectados (D).

**A**



**B**



**Figura 17. Niveles de transcripción génica durante el desarrollo de timocitos en ratón mostrados en la base de datos ImmGen.** Análisis transcripcionales de *Runx1*, *Runx2*, *Runx3*, *Myb*, *Notch1* y *Hes1* obtenidos a partir de arrays de expresión de genes y RNA-seq realizados con poblaciones purificadas de ratón por citometría de flujo ([www.immgen.org](http://www.immgen.org)).

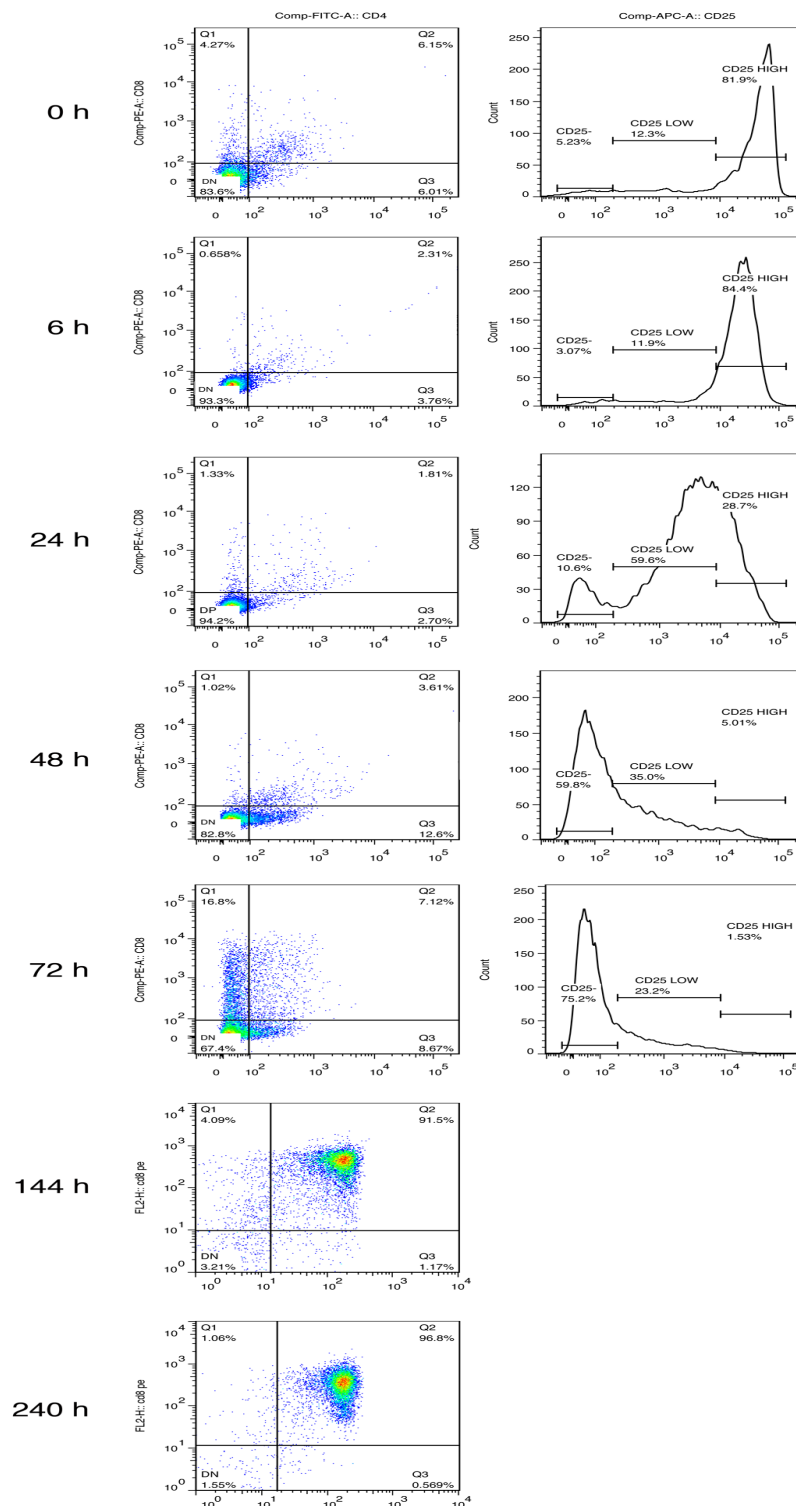
## **2. La señalización mediada por el pre-TCR controla el grado de reclutamiento de RUNX1 y MYB a E $\delta$ y E $\gamma$ en timocitos DN3a y DP**

La señalización del pre-TCR desencadena el silenciamiento de la transcripción del gen *Tcr $\gamma$* <sup>390</sup>. Para evaluar si la señalización del pre-TCR desencadena, de forma similar, un silenciamiento en la transcripción del gen *Tcr $\delta$* , cuantificamos los transcritos C $\delta$  y C $\gamma$  en timocitos DN3a y DP de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x E $\alpha$ <sup>-/-</sup> (Figura 16D). El uso de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x E $\alpha$ <sup>-/-</sup> nos permite analizar con fiabilidad la transcripción del gen *Tcr $\delta$*  en ausencia de la activación de E $\alpha$  (Figura 16A). Para asegurarnos que el efecto observado era consecuencia directa de la señalización mediada por el pre-TCR, estos ratones fueron inyectados con un Ab monoclonal para CD3 $\epsilon$ , ya que este tratamiento promueve la eficiente diferenciación de los timocitos DN3a a DP en ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> a través de la señalización mediada por CD3, de forma equivalente a la mediada por el pre-TCR en ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg<sup>431</sup>. La diferenciación progresiva de los timocitos DN3a a DP fue monitorizada mediante su tinción con Ab acoplados a distintos fluorocromos y subsecuente análisis por citometría de flujo (Figura 18). Nuestros análisis por RT-qPCR de los transcritos C $\delta$  y C $\gamma$  mostraron una bajada drástica después de 24 horas desde la inyección del Ab, quedando los genes *Tcr $\delta$*  y *Tcr $\gamma$*  silenciados de forma estable durante el resto de los tiempos analizados: 48, 72, 144 y 240 horas después de la inyección. Estos datos indican que la señalización mediada por el pre-TCR induce el silenciamiento estable de la transcripción de los genes *Tcr $\gamma$*  y *Tcr $\delta$* , con una cinética similar entre ambos.

De forma interesante, la inhibición de la transcripción de los transcritos C $\delta$  y C $\gamma$  coincidió con la inhibición de los transcritos *Runx1* y *Myb* (Figura 16D). Por tanto, nuestros datos indican que el silenciamiento transcripcional de los genes *Tcr $\delta$*  y *Tcr $\gamma$*  y la inhibición de la transcripción de los genes *Runx1* y *Myb* tienen lugar en un periodo de tiempo muy cercano durante la maduración de los timocitos de DN3a a DP, como consecuencia de la señalización del pre-TCR. El brusco descenso en la transcripción de *Myb* observado tras la inyección del Ab para CD3 $\epsilon$  en los ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> no se esperaba ya que no se detecta ese descenso durante la diferenciación de los timocitos DN3a a DP en ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> y *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg, o



en ratones WT (Figuras 16B y 17). Esta diferencia sea consecuencia de diferencias entre las señalizaciones mediadas por el pre-TCR y por CD3 (ver Discusión).



**Figura 18.** La inyección de un Ab para CD3ε en ratones *Rag2<sup>-/-</sup>* induce la diferenciación los timocitos DN3a a DP. Análisis por citometría de flujo de la diferenciación *in vivo* de timocitos DN3a de ratones *Rag2<sup>-/-</sup>* x *Eα<sup>-/-</sup>* inducida mediante inyección de un Ab monoclonal para CD3ε. Se muestran la expresión de CD8 y CD4 (paneles de la izquierda) y CD25 (panel de la derecha) de los timocitos de ratones sacrificados a los tiempos indicados después de la inyección del Ab.

Para analizar si la inhibición de la transcripción de los genes *Runx1* y *Myb* mediada por la señalización del pre-TCR se ve reflejada en el reclutamiento de la unión de RUNX1 y MYB en timocitos DN3a y DP, analizamos la unión de estos TF por qChIP a E $\delta$  y E $\gamma$  en timocitos DN3a de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x E $\alpha$ <sup>-/-</sup> y timocitos DP de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x E $\alpha$ <sup>-/-</sup> obtenidos tras 240 horas desde la inyección con el Ab monoclonal para CD3 $\epsilon$  (Figura 16E). Nuestros datos indicaron que la unión de RUNX1 y MYB observada en timocitos DN3a se inhibe en timocitos DP, no observándose unión de estos TF a E $\alpha$  por estar este *enhancer* ausente en estos ratones, ni tampoco al control negativo *Oct2* como era esperado (Figura 16E). Estos resultados indican que la unión de RUNX1 y MYB a E $\delta$  y E $\gamma$  observado en timocitos DN3a está fuertemente inhibida en timocitos DP, por lo que el reclutamiento de RUNX1 y MYB a E $\delta$  y E $\gamma$  se correlaciona con la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg*.

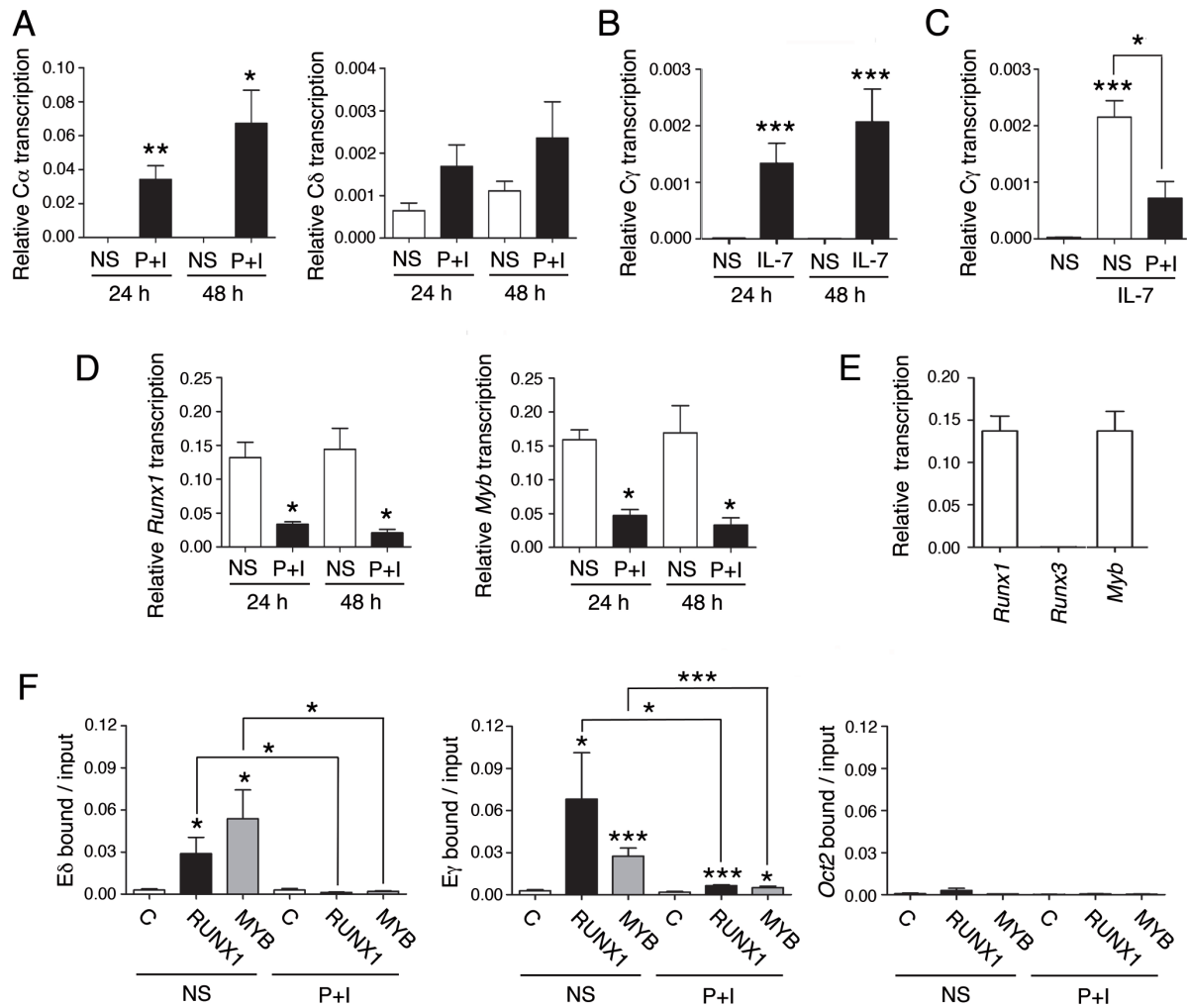
Para investigar el mecanismo molecular que controla la actividad de E $\delta$  y E $\gamma$  mediada por la señalización del pre-TCR durante la selección- $\beta$  a través de la regulación del reclutamiento de RUNX1 y MYB a estos *enhancers*, usamos la línea celular SCID.adh<sup>512</sup>. Estas células tienen un fenotipo equivalente a timocitos DN3a y pueden diferenciar a un fenotipo equivalente a timocitos DN4 mediante el tratamiento de P+I<sup>314,520</sup>, por lo que constituyen un modelo celular excelente para estudiar la señalización mediada por el pre-TCR y la selección- $\beta$ <sup>512</sup>. El tratamiento con P+I simula la señalización por el pre-TCR durante la diferenciación del fenotipo DN3a a DN4 en esta línea celular, induciendo la activación de E $\alpha$  y la transcripción del gen *Tcra*<sup>314</sup>, siendo este modo de activación comparable a una activación mediada por pre-TCR o CD3 $\epsilon$  en estas células para el estudio la regulación transcripcional de este gen<sup>512,313</sup>. De acuerdo con análisis previos<sup>314</sup>, nuestros experimentos por RT-qPCR mostraron que los transcritos C $\alpha$  están ausentes en células no estimuladas (NS) y fuertemente inducidos en células tratadas con P+I después de 24 o 48 horas de tratamiento. Sin embargo, observamos que los transcritos de C $\delta$  son abundantes tanto en células NS como estimuladas, sin diferencias significativas entre células estimuladas durante 24 o 48 horas (Figura 19A). Estos resultados en células SCID.adh son similares a los obtenidos en los timocitos *Rag2*<sup>-/-</sup> y *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg (Figura 16A), indicando que este modelo celular en presencia y ausencia de PMA+I es válido para el estudio del mecanismo molecular del silenciamiento del gen *Tcrd* a través de la señalización mediada por el pre-TCR.

En el caso del gen *Tcrg*, además de su regulación por la señalización mediada por el pre-TCR, su transcripción depende de forma crítica de la señalización mediada por IL-

7R<sup>390,296,129,386,388</sup>. Para comprobar la idoneidad de la línea celular SCID.adh en la regulación de la transcripción del gen *Tcrg*, analizamos la dependencia de la transcripción de este gen de la señalización mediada por IL-7R en estas células (Figuras 19B y 19C). Nuestros experimentos del análisis de la regulación de la transcripción del gen *Tcrg* mediante RT-qPCR en células SCID.adh en presencia o ausencia de IL-7 mostraron que los transcritos  $C\gamma$  se inducen fuertemente después de incubar a las células en presencia de IL-7, sin diferencias notables entre un tratamiento de 24 o 48 horas (Figura 19B). De acuerdo con el papel inhibitorio de la señalización mediada por el pre-TCR en la transcripción del gen *Tcrg*<sup>390</sup>, el tratamiento de las células SCID.adh con P+I inhibió la transcripción de  $C\gamma$  activada por IL-7 (Figura 19C). Estos resultados indican que las células SCID.adh constituyen un modelo celular idóneo para estudiar el mecanismo molecular del papel de las señalizaciones mediadas por el pre-TCR e IL-7R en la regulación transcripcional de los genes *Tcra*, *Tcrd* y *Tcrg* en el desarrollo de los timocitos DN3a a DN4 durante el proceso de la selección- $\beta$ .

De acuerdo con los datos obtenidos en timocitos de ratón inyectados con el Ab para CD3 $\epsilon$  (Figura 16D), la transcripción de *Runx1* y *Myb* también se inhibe en células SCID.adh estimuladas con P+I respecto a las células NS, tanto tras 24 horas como 48 horas de estimulación (Figura 19D), siendo los transcritos de *Runx1* y *Myb* mucho más abundantes que los de *Runx3* en las células no estimuladas como ocurre en timocitos primarios (Figuras 17 y 19E). Por tanto la estimulación de las células SCID.adh con PMA+I también reproduce la regulación de la transcripción de los genes *Runx1* y *Myb* por la señalización mediada por CD3 durante el desarrollo de los timocitos.

En relación con la regulación de la transcripción de *Runx1* y *Myb* durante la estimulación de las células SCID.adh con PMA+I, el análisis de la unión de RUNX1 y MYB a E $\delta$  y E $\gamma$  por qChIP observamos que ésta también se inhibe tras la estimulación de las células con PMA+I, mientras que no se detectó una unión relevante de estos FT a la secuencia de *Oct2* (Figura 19F). Estos resultados confirman en células SCID.adh los resultados obtenidos en timocitos de ratón, indicando que la señalización mediada por el pre-TCR provoca la pérdida de la unión de RUNX1 y MYB a E $\delta$  y E $\gamma$ , lo cual se correlaciona perfectamente con el silenciamiento de los genes *Tcrd* y *Tcrg* observado durante la selección- $\beta$  y la señalización por el pre-TCR.

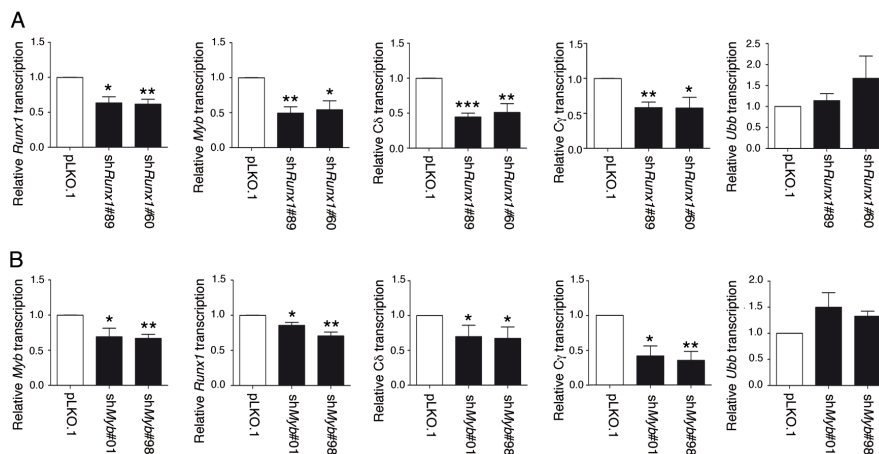


**Figura 19. El reclutamiento de RUNX1 y MYB a E $\delta$  y E $\gamma$  se inhibe tras la estimulación de células SCID.adh.** (A) Análisis transcripcional por RT-qPCR de C $\alpha$  y C $\delta$  en células no estimuladas (NS) y células estimuladas con P+I después durante 24 y 48 horas (n=7). (B) Análisis transcripcional por RT-qPCR de C $\gamma$  en células SCID.adh cultivadas en ausencia (-) o presencia de IL-7 durante 24 y 48 horas (n=10). (C) Análisis transcripcional por RT-qPCR de C $\gamma$  en células SCID.adh no estimuladas (NS) y estimuladas con P+I en ausencia (-) o presencia de IL-7 durante 48 horas (n=4). (D) Análisis transcripcional por RT-qPCR de *Runx1* y *Myb* en células SCID.adh no estimuladas (NS) o estimuladas con P+I después de 24 y 48 horas (n=5). (E) Análisis transcripcional por RT-qPCR de *Runx1*, *Runx3* y *Myb* en células SCID.adh no estimuladas (n=5). (F) Análisis por qChIP de la unión de RUNX1 y MYB a E $\delta$ , E $\gamma$  y *Oct2* en células SCID.adh no estimuladas (NS) y estimuladas con P+I (n=12). Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM de resultados obtenidos por duplicado de n experimentos independientes. La significancia entre los valores obtenidos está indicada.

### 3. La regulación mutua entre la expresión de RUNX1 y MYB controla la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg*

Los datos previos sugerían un papel esencial para los FT de las familias RUNX y MYB en la regulación de la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg*<sup>189,342,403,411,404,191</sup>. Estos estudios funcionales estaban basados en las consecuencias de la destrucción de los sitios de

unión para estas familias de FT, pero no demostraban la identidad de los FT implicados. Para probar de forma inequívoca la implicación de RUNX1 y MYB en la regulación de la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg*, inhibimos la transcripción de estos dos FT de forma independiente, mediante transducción de las células SCID.adh con vectores lentivirales que portan secuencias de pequeños ARN inhibidores de doble-cadena en forma de horquilla (small hairpin RNA, shRNA) específicos para *Runx1*, *shRunx1*-RNA, o *Myb*, *shMyb*-RNA. Para minimizar los posibles efectos inespecíficos, utilizamos dos shRNA distintos para inhibir cada gen de forma independiente. El análisis transcripcional de *Runx1* y *Myb* por RT-qPCR reveló una inhibición mutua significativa de la transcripción de ambos, mientras que el gen control *Ubb* no estaba afectado (Figuras 20A y 20B). La mutua regulación transcripcional observada entre los genes *Runx1* y *Myb* está relacionada con la participación de estos dos FT en el CRC que controla la identidad de estas células, tal y como ocurre en el caso de las células T-ALL<sup>485,521,477,484</sup>. La participación de RUNX1 y MYB en el CRC de las células SCID.adh explica que no se pueda conseguir su total inhibición, ya que la expresión de estos FT es necesaria para la viabilidad celular (ver Discusión). De forma muy interesante, observamos que la inhibición de la transcripción de cualquiera de los dos FT disminuyó significativamente la transcripción de *Cδ* y *Cγ*, confirmándose estos resultados usando dos *shRunx1*-RNAs y dos *shMyb*-RNAs distintos (Figuras 20A y 20B). Estos datos demuestran que RUNX1 y MYB son los miembros de las familias RUNX y MYB con un papel esencial en la activación de la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg* en timocitos DN3a.



**Figura 20. La regulación mutua entre RUNX1 y MYB controla la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg*.** Análisis transcripcional por RT-qPCR de *Runx1*, *Myb*, *Cδ*, *Cγ* y *Ubb* después de inhibir la expresión de *Runx1* o *Myb* en células SCID.adh transducidas con lentivirus que vectorizan *shRunx1* (A) o *shMyb* (B) (n=5-8). Los datos son representados como la media ± SEM de resultados obtenidos por duplicado de n experimentos independientes. La significancia de los valores obtenidos son relativos a los obtenidos en las células transducidas con lentivirus control, pLKO.1.

#### 4. La señalización mediada por la ruta de Notch induce la transcripción del gen *Runx1* en paralelo con la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg* durante la diferenciación de los timocitos

La señalización de Notch está regulada durante el desarrollo de los timocitos, siendo fuerte en los timocitos DN1-DN3a, bajando fuertemente después de la señalización mediada por el pre-TCR<sup>522</sup>. Como se ha indicado en la Introducción, esta ruta de señalización se activa cuando NOTCH1, presente en los timocitos, interactúa con su ligando en las TEC para provocar la escisión del dominio intracelular del receptor, dando lugar a que ICN1 se trasloque al núcleo para activar la transcripción de los genes diana de esta ruta a través del FT RBPJK, previamente unido al ADN. De acuerdo con la inhibición de la transcripción del gen *Notch1* y también de su gen diana canónico *Hes1* durante la transición de los timocitos de DN3a a DP en ratones WT (Figura 17), nuestros análisis por RT-qPCR indicaron una fuerte inhibición de la transcripción de los genes *Notch1* y *Hes1* en timocitos DP de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg y ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> inyectados con el Ab para CD3 $\epsilon$ , comparados con los timocitos DN3a de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> (Figuras 21A y 21B). La cinética de inhibición en los ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> inyectados reveló una regulación temporal de los genes *Notch1* y *Hes1* prácticamente idéntica a la observada en la regulación de los genes *Runx1*, *Myb*, *Tcrd* y *Tcrg*, con una inhibición máxima tras 24 horas desde la inyección, que se mantiene estable durante los 10 días que duró el experimento (Figuras 16D y 21B). Para evaluar de forma directa el posible efecto de la señalización de Notch sobre la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg* en timocitos, se infectaron timocitos DN3a de ratones embrionarios E14.5 *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg x *E $\alpha$* <sup>-/-</sup> con retrovirus MigR que expresan GFP (GFP) o ICN1 y GFP juntos (ICN1) y se incubaron sobre monocapas de células estromales OP9 (Figura 22A). Como era de esperar<sup>523,524,115</sup>, los timocitos GFP permanecieron en el estadio DN3a, mientras que los timocitos ICN1 diferenciaron hacia el estadio DP (Figura 22A). La razón para utilizar timocitos *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg x *E $\alpha$* <sup>-/-</sup> fue para evitar la interferencia derivada de la activación de *E $\alpha$*  sobre la transcripción del gen *Tcrd* (Figura 16A). Analizamos transcripcionalmente por RT-qPCR los timocitos DN GFP e ICN1 purificados por citometría de flujo (Figura 21C). De acuerdo con la auto-regulación transcripcional positiva dependiente de NOTCH1 previamente descrita<sup>201</sup>, nuestros análisis revelaron que la transcripción de *Notch1* es más alta en timocitos DN transducidos con retrovirus ICN1 que en aquellos transducidos con retrovirus GFP. De forma interesante, también observamos un incremento significativo de la transcripción de *Runx1* junto con una fuerte inducción de la transcripción de *C $\delta$*  y *C $\gamma$*  en timocitos DN transducidos con retrovirus

ICN1 respecto a los transducidos con retrovirus GFP, indicando que estos genes responden positivamente a la señalización de NOTCH1. En cuanto a la transcripción de *Myb*, no se detectó un efecto significativo derivado de la transducción de retrovirus ICN1 en los timocitos DN. Estos datos indican que la señalización de Notch activa la transcripción de *Notch1*, *Runx1*, *Tcrd* y *Tcrg*, pero no de *Myb* en timocitos DN primarios de ratón.

La exposición de progenitores de células T a células OP9 que expresan el ligando de Notch DL1 induce el desarrollo del linaje T<sup>523</sup>. Para confirmar nuestras observaciones en un nivel fisiológico de señalización de Notch, analizamos el efecto de la activación endógena de esta ruta a través del ligando DL1. Para ello co-cultivamos timocitos DN3a de ratones E14.5 *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg x *E $\alpha$* <sup>-/-</sup> sobre monocapas de células OP9 o OP9-DL1 (Figura 22B). Como era de esperar<sup>523</sup>, los timocitos DN cultivados sobre monocapas de células OP9 permanecen en el estadio DN, mientras que los cultivados sobre monocapas de células OP9-DL1 diferencian hacia timocitos DP (Figura 22B). Los timocitos DN cocultivados sobre células OP9 o OP9-DL1 fueron purificados mediante citometría de flujo y analizados mediante RT-qPCR (Figura 21D). De acuerdo con la autorregulación positiva de *Notch1*, la transcripción de *Notch1* se indujo en los timocitos expuestos a ligando (células OP9-DL1 versus OP9). De forma interesante y de forma similar a lo que observamos tras la sobre-expresión de ICN1 (Figura 21C), se observó una fuerte inducción de los transcritos de  $C\delta$  y  $C\gamma$ , junto a un incremento de la transcripción de *Runx1* en estos timocitos DN cultivados sobre células OP9-DL1 comparado con los resultados obtenidos en los timocitos cultivados sobre monocapas de células OP9, mientras que no se vio ningún efecto considerable sobre la transcripción de *Myb*. Estos resultados indican que los niveles fisiológicos de la señalización de Notch son esenciales para la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg* en timocitos DN, sugiriendo que ocurre a través de la regulación de la expresión de RUNX1.

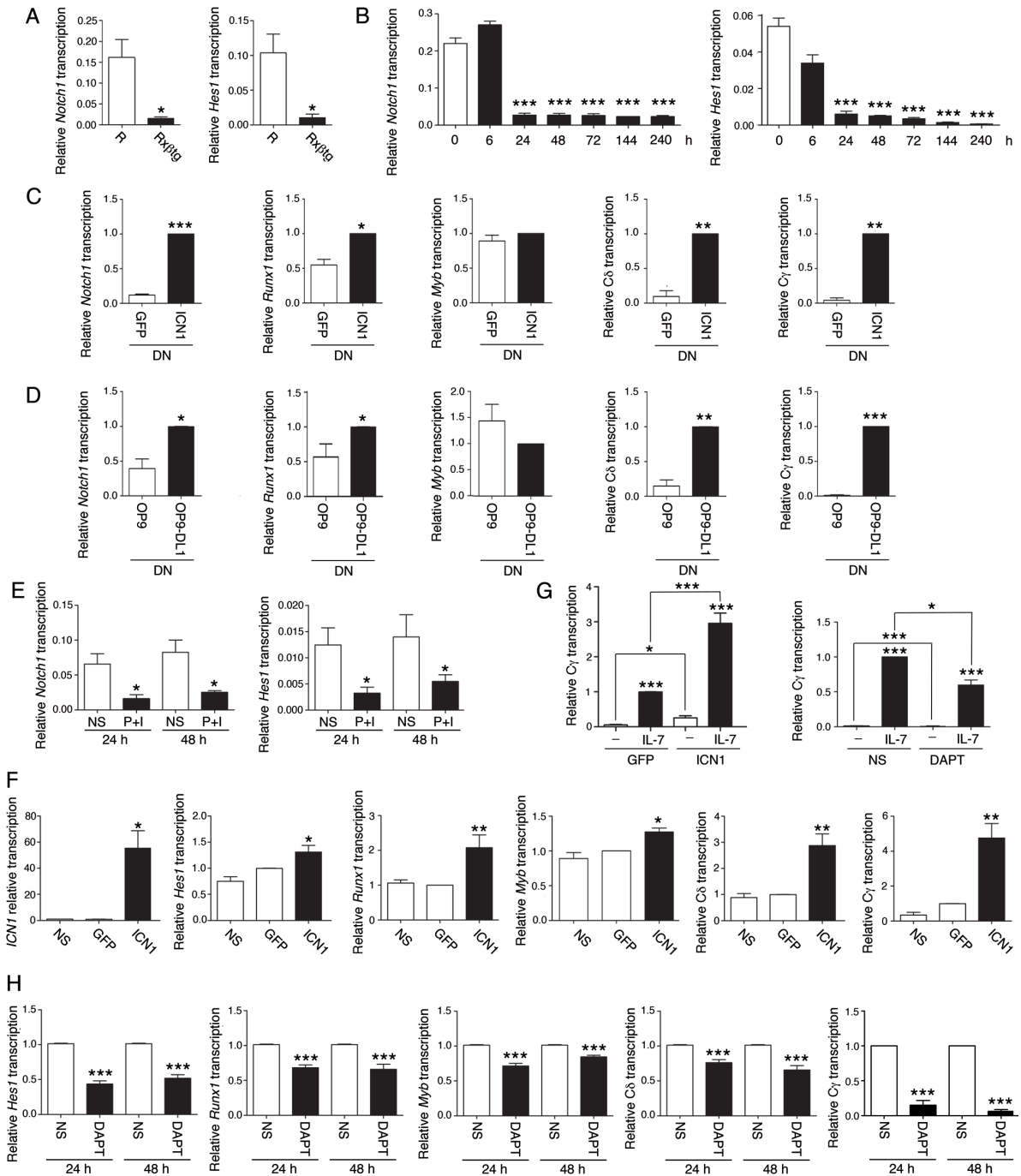
Los cultivos de timocitos sobre monocapas de células OP9 y OP9-DL1 requieren la presencia de IL-7 para la supervivencia celular<sup>523</sup>. Para comprobar si los efectos sobre la transcripción génica observados son consecuencia de un posible efecto de la señalización de Notch sobre la expresión de IL7-R, analizamos el efecto de Notch sobre la transcripción del gen *Il7r* en nuestros cultivos de timocitos (Figura 23A). Nuestros resultados no revelaron ningún efecto de la señalización de Notch sobre la transcripción de *Il7r*, descartando que el efecto observado mediado por Notch en la inducción de la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg* en timocitos DN esté mediado por IL-7. Para descartar de forma definitiva un posible papel de IL-7R en el efecto de la señalización de Notch sobre la transcripción de *Tcrd* y

*Tcrg* decidimos hacer este análisis en ausencia de IL-7 utilizando células SCID.adh, las cuales no necesitan la presencia continua de IL-7 para su supervivencia. De acuerdo con el efecto inhibitorio de la ruta por el pre-TCR de la transcripción de los genes *Notch1* y *Hes1* en timocitos (Figuras 21A y 21B), las células SCID.adh reproducen la bajada en la transcripción de *Notch1* y *Hes1* tras estimularlas con P+I (Figura 21E). Después de transducir estas células con retrovirus que expresan ICN1+GFP (ICN1) o solo GFP (GFP), observamos un incremento significativo en la transcripción de *Hes1*, *Runx1*, *Cδ* y *Cγ* en estas células, y un menor efecto sobre la transcripción de *Myb* (Figura 21F). Debido a que los experimentos se hicieron en ausencia de IL-7, estos resultados indican claramente que la señalización de Notch activa la transcripción de *Runx1*, *Tcrd* y *Tcrg* de una forma independiente a la vía de señalización mediada por IL-7R.

Debido a que en las condiciones naturales los timocitos DN3a se encuentran expuestos a la señalización mediada por IL-7 y que la transcripción del gen *Tcrg* es muy dependiente de esta señalización, evaluamos el efecto de la señalización de ICN1 sobre la transcripción de *Cγ* activada por IL-7 en células SCID.adh mediante su transducción con retrovirus MigR GFP e ICN1-GFP (Figura 21G). Se observaron altos niveles de transcritos *Cγ* en células transducidas con virus ICN1 en comparación con las células transducidas con virus GFP en presencia de IL-7. Estos resultados indican que la señalización de Notch activa no solo la transcripción basal de *Tcrg*, sino también la inducida por IL-7.

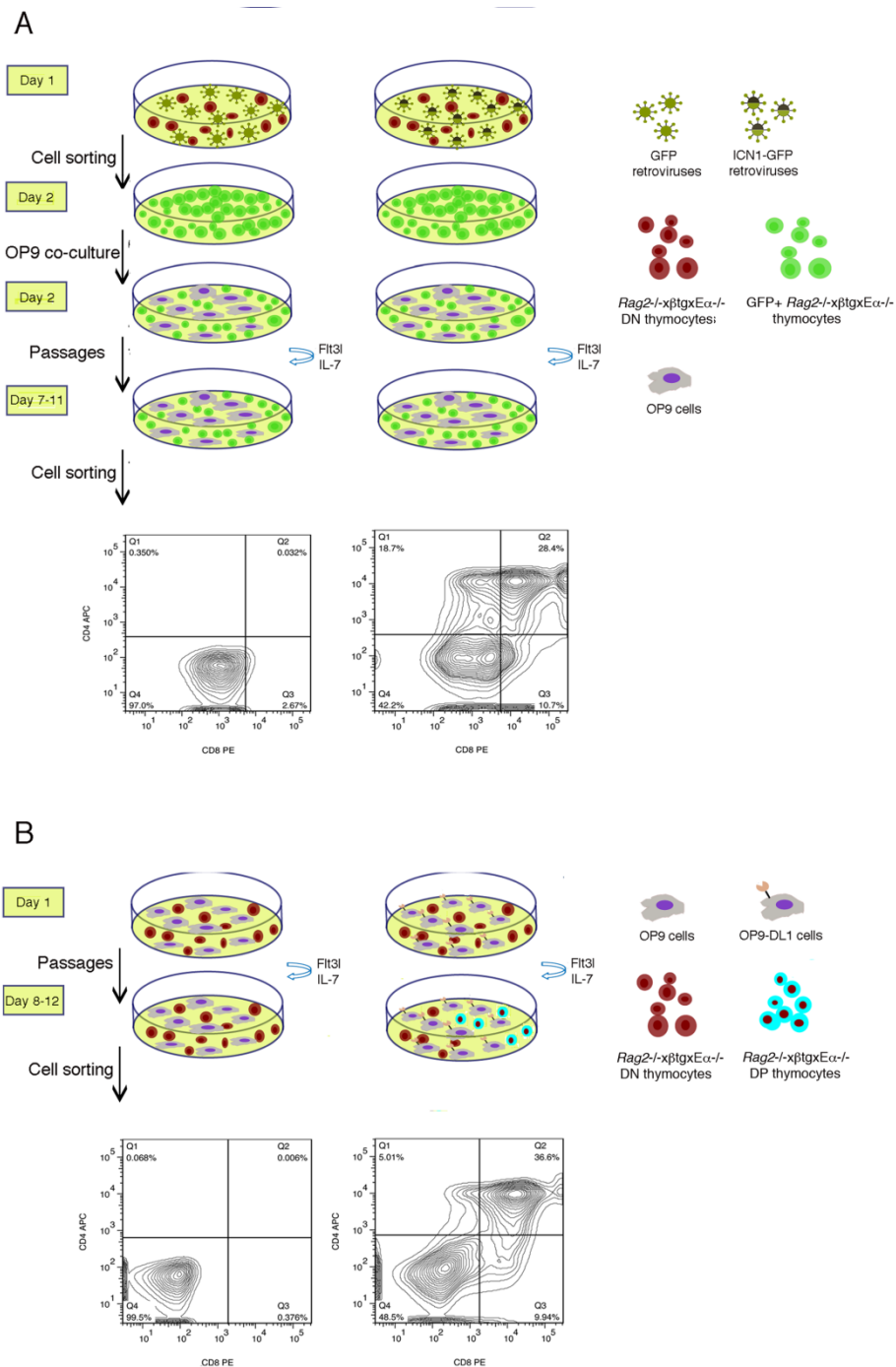
Para analizar el papel de la señalización de Notch sobre la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg*, inhibimos esta señalización tratando las células SCID.adh con el GSI DAPT. De acuerdo con el papel activador de la señalización de Notch observado en las células SCID.adh transducidas con los retrovirus de ICN1, la presencia de DAPT inhibió la transcripción de los genes *Hes1*, *Runx1*, *Il7r*, *Cδ* y, tanto la transcripción basal como la inducida por IL-7R en el caso de los transcritos *Cγ* (Figuras 21G, 21H y 23B). Estos resultados demuestran claramente que la transcripción de *Runx1*, *Tcrd* y *Tcrg* es activada por la señalización de Notch en timocitos DN3a.





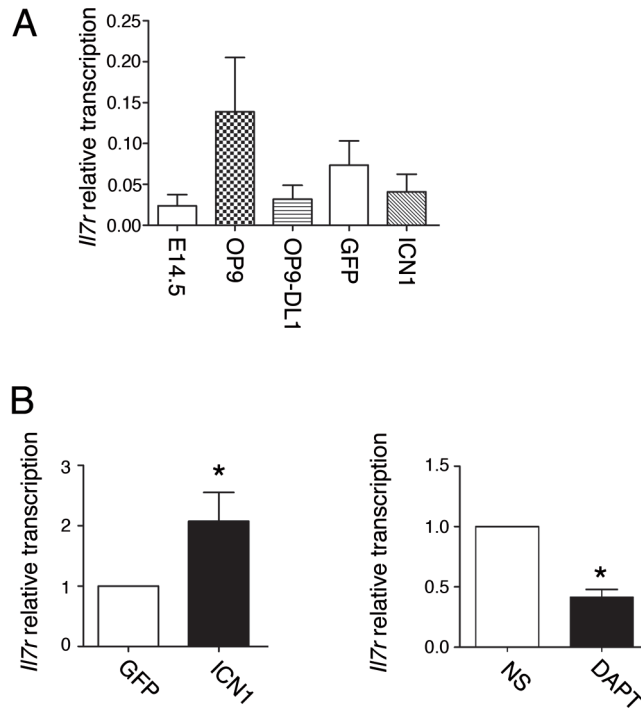
**Figura 21. La señalización de Notch induce la transcripción de los genes *Runx1*, *Tcrd* y *Tcrg* en timocitos DN y células SCID.adh.** (A) Análisis transcripcional por RT-qPCR de *Notch1* y *Hes1* en timocitos de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> y *Rag2*<sup>-/-</sup> x βtg (n=4). (B) Análisis transcripcional por RT-qPCR de *Notch1* y *Hes1* en timocitos de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x *Eα*<sup>-/-</sup> después de inyectarlos con un MAb para CD3ε y sacrificados a los tiempos indicados (n=3). (C) Análisis transcripcional por RT-qPCR de *Notch1*, *Runx1*, *Myb*, Cδ y *Cγ* en timocitos DN de ratones embrionarios E14.5 *Rag2*<sup>-/-</sup> x βtg x *Eα*<sup>-/-</sup> después de ser transducidos con retrovirus con GFP o ICN1 y cultivados sobre células OP9 (n=3). (D) Análisis transcripcional por RT-qPCR de *Notch1*, *Runx1*, *Myb*, Cδ y *Cγ* en timocitos DN de ratones embrionarios E14.5 *Rag2*<sup>-/-</sup> x βtg x *Eα*<sup>-/-</sup> cultivados sobre células OP9 o OP9-DL1 (n=3). (E) Análisis transcripcional por RT-qPCR de *Notch1* y *Hes1* en células SCID.adh no estimuladas (NS) y estimuladas con P+I durante 24 y 48 horas (n=6). (F) Análisis transcripcional por RT-qPCR de *ICN1*, *Hes1*, *Runx1*, *Myb*, Cδ y *Cγ* en células SCID.adh transducidas con retrovirus MigR GFP o ICN1 (n=7). (G) Análisis transcripcional por RT-qPCR de *Cγ* en células SCID.adh transducidas con retrovirus MigR GFP o ICN1 (n=7) o

tratadas o no con DAPT durante 24 horas en ausencia o presencia de IL-7 (n=3). **(H)** Análisis transcripcional por RT-qPCR de *Hes1*, *Runx1*, *Myb*, *Cδ* y *Cγ* en células SCID.adh no tratadas (NS) o tratadas con DAPT durante 24 o 48 horas (n=15). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de los resultados por obtenidos por duplicado obtenidos de n experimentos independientes. La significancia entre los valores obtenidos está indicada o relativa al control de timocitos *Rag2*<sup>-/-</sup> x *Eα*<sup>-/-</sup> sacrificados a tiempo 0 de inyección que corresponde con ratones control no inyectados (B).



**Figura 22. Diferenciación *in vitro* de timocitos de ratones E14.5 *Rag2*<sup>-/-</sup> xβtg x *Eα*<sup>-/-</sup> y análisis por citometría de flujo. (A) Esquema para la diferenciación de timocitos transducidos con virus GFP o ICN1 y cultivados sobre células OP9 a lo largo de los distintos días, así como un análisis de expresión simultánea de CD4 y CD8 por citometría de flujo al final del experimento. (B) Esquema para la diferenciación de timocitos transducidos con virus GFP o ICN1 y cultivados sobre células estromales OP9 a lo largo de los días. Se muestra un análisis**

de doble-expresión de CD4 y CD8 por citometría de flujo al final del experimento. **(B)** Esquema de la diferenciación de los timocitos cultivados sobre células estromales OP9-DL1 a largo de los días. Se muestra un análisis de doble-expresión de CD4 y CD8 por citometría de flujo al final del experimento.



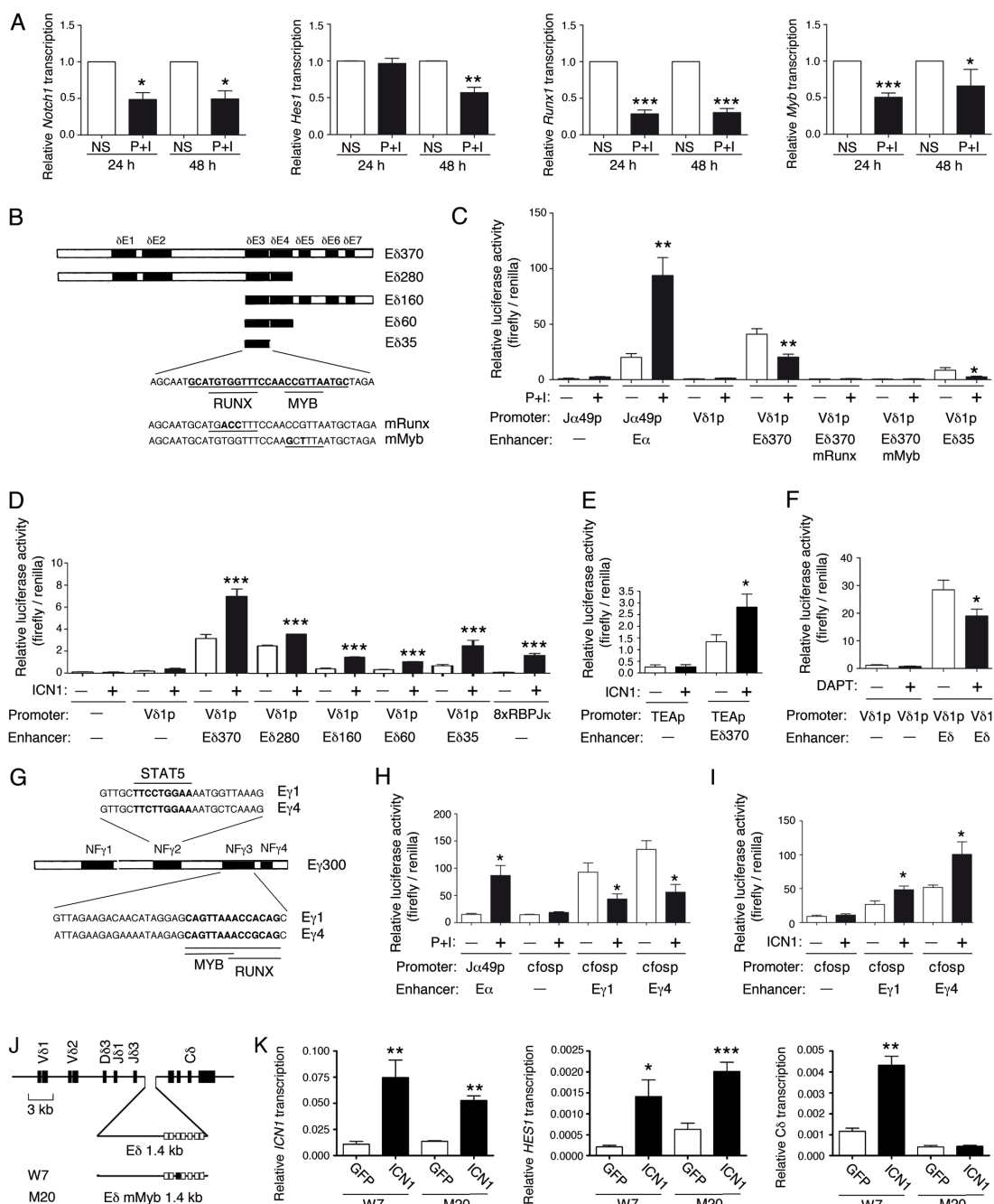
**Figura 23. La señalización de Notch activa la transcripción de *Ii7r* en células SCID.adh, pero no en timocitos primarios.** (A) Análisis transcripcional por RT-qPCR de *Ii7r* en timocitos DN de ratones E14.5 *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg x *E $\alpha$* <sup>-/-</sup> incubados sobre células OP9 o OP9-DL1, o transducidos con retrovirus MigR GFP o ICN1 y cultivados sobre células OP9 (n=3). (B) Análisis transcripcional de *Ii7r* por RT-qPCR en células SCID.adh transducidas con retrovirus MigR GFP o ICN1, o células no tratadas (NS) o tratadas con DAPT durante 24h (n=3). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de los resultados obtenidos por duplicado de n experimentos independientes. La significancia obtenida es relativa a las células transducidas con retrovirus GFP o células no tratadas con DAPT.

## 5. La señalización mediada por NOTCH1 activa E $\delta$ y E $\gamma$

Para evaluar si efecto de la señalización de Notch observado sobre la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcr $\gamma$*  está mediado a través de un mecanismo directo sobre la función de E $\delta$  y E $\gamma$ , analizamos el efecto del tratamiento de P+I o la sobre-expresión de ICN1 sobre la actividad de los *enhancers* usando construcciones de expresión del gen reportero LUC en células Jurkat transfectadas transitoriamente (Figura 24). Estas células constituyen un buen modelo para estudios de activación de células T<sup>525</sup> y para la actividad transcripcional de los *enhancers* del TCR<sup>399,402,189,190,403,417,314</sup>.

De acuerdo con un reciente análisis de un RNA-seq que muestra que la estimulación con P+I de células Jurkat inhibe la transcripción de los genes *NOTCH1*, *HES1*, *RUNX1* y *MYB*<sup>526</sup>, de forma similar al efecto mediado por el pre-TCR en timocitos y el tratamiento con

P+I en células SCID.adh (Figuras 16D, 19D, 21B y 21E), observamos que el tratamiento con P+I inhibe la transcripción endógena de estos genes en células Jurkat (Figura 24A). También comparamos el efecto de la estimulación con P+I sobre la transcripción del gen reportero LUC dirigida por E $\delta$ , evaluando un fragmento de E $\delta$  de 370 pb (E $\delta$ 370) que contiene los siete elementos descritos para la unión de proteínas en este *enhancer*:  $\delta$ E1- $\delta$ E7<sup>402</sup> (Figura 24B). De acuerdo con los datos previos<sup>189</sup>, los sitios de unión de RUNX1 y MYB en  $\delta$ E3 son necesarios para la función de E $\delta$ , ya que las versiones de E $\delta$ 370 con una mutación puntual de estos sitios de forma individual, E $\delta$ mRunx1 y E $\delta$ 370mMYB, son inactivas (Figura 24B).



**Figura 24. La estimulación celular inhibe la función de E $\delta$  y E $\gamma$ , mientras que la señalización de NOTCH1 la activa.** (A) Análisis transcripcional por RT-qPCR de *NOTCH1*, *HES1*, *RUNX1* y *MYB* en células Jurkat no estimuladas (NS) y estimuladas con P+I después de 24 o 48 horas. (B) Estructura de E $\delta$ , indicando la localización de los elementos  $\delta$ E1- $\delta$ E7 y los sitios de unión para RUNX1 y MYB a  $\delta$ E3. También se muestran las secuencias de las versiones mutantes mRunx y mMyb de E $\delta$ . (C) Análisis de la actividad transcripcional de E $\alpha$  y distintas versiones de E $\delta$  presentes en construcciones de LUC transfectadas células Jurkat no estimuladas (-) o estimuladas (+) con P+I durante 24 horas. La presencia de los promotores J $\alpha$ 49p o V $\delta$ 1p, así como los distintos *enhancers* analizados, está indicada (n=6). (D) Análisis de la actividad transcripcional de distintos fragmentos de E $\delta$  en construcciones de LUC controladas por V $\delta$ 1p y el control positivo 8xRBPJ $\kappa$  en células Jurkat co-transfectadas con un vector de expresión de ICN1 (+) o un plásmido control (-) (n=8). (E) Análisis de la actividad transcripcional de E $\delta$  en construcciones de LUC controladas por TEAp en células Jurkat co-transfectadas con un vector de expresión de ICN1 (+) o un plásmido control (-) (n=5). (F) Análisis de la actividad transcripcional de E $\delta$  en construcciones de LUC en células Jurkat no tratadas (-) o tratadas (+) con DAPT (n=8). (G) Estructura de E $\gamma$ 1 y E $\gamma$ 4, indicando la localización de los elementos NF $\gamma$ 1-NF $\gamma$ 4 y los sitios de unión para STAT5 en NF $\gamma$ 2 y para RUNX1 y MYB en NF $\gamma$ 3. (H) Análisis de la actividad transcripcional de E $\alpha$ , E $\gamma$ 1 y E $\gamma$ 4 en construcciones de LUC transfectadas en células Jurkat no estimuladas (-) o estimuladas (+) con P+I durante 24 horas. La presencia de los promotores J $\alpha$ 49p o cfosp, así como los distintos *enhancers* analizados, está indicada (n=6). (I) Análisis de la actividad transcripcional de E $\gamma$ 1 y E $\gamma$ 4 en construcciones de LUC controladas por cfosp en células Jurkat co-transfectadas con un vector de expresión de ICN1 (+) o un plásmido control (-) (n=6). (J) Estructura del minilocus *TCRD* humano con la versión WT o mMyb de E $\delta$  presente en los clones de células Jurkat W7 y M20, respectivamente. Los segmentos V $\delta$ , D $\delta$  y J $\delta$ , así como los exones de C $\delta$  están representados como rectángulos negros. Los elementos  $\delta$ E1- $\delta$ E7 WT se representan como rectángulos blancos, mientras que el elemento  $\delta$ E3 mMyb se representa como un rectángulo negro. (K) Análisis transcripcional por RT-qPCR de *ICN1*, *HES1* y C $\delta$  en los clones de células Jurkat W7 y M20 transducidos con retrovirus MigR GFP o ICN1 (n=3). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de los resultados obtenidos por duplicado de n experimentos independientes. La significancia entre los valores obtenidos está indicada.

Como era esperable por experimentos previos<sup>314</sup>, el tratamiento de las células Jurkat con PMA+I causó una clara activación de la transcripción de LUC dependiente de E $\alpha$ , dirigida por el promotor *Traja49* de ratón (J $\alpha$ 49p), no detectándose ningún efecto sobre el promotor solo (Figura 24C). Al contrario del efecto positivo sobre la actividad de E $\alpha$ , el tratamiento con P+I inhibió la actividad de la construcción dependiente de E $\delta$ 370 y dirigida por el promotor *TRDVI* humano (V $\delta$ 1p), no detectándose ningún efecto sobre el promotor solo (Figura 24C). Estos resultados se correlacionan con el efecto inhibitorio del tratamiento de P+I sobre la transcripción de *RUNX1* y *MYB* en estas células (Figura 24A). Para evaluar si la inhibición de E $\delta$  causada por el tratamiento de P+I es mediada a través de los sitios de unión de RUNX1 y MYB, comparamos la actividad del fragmento de E $\delta$ 35, que solo contiene los 35 bp que constituyen el elemento  $\delta$ E3 y que contiene los sitios Runx y Myb, en células tratadas (+) y no tratadas (-) (Figura 24C). De acuerdo con el descenso en la transcripción de *RUNX1* y *MYB* observado en células Jurkat tratadas con P+I (Figura 24A), la actividad de E $\delta$ 35 se inhibe en las células estimuladas. Estos resultados indican que el mecanismo del efecto inhibitorio de la señalización del pre-TCR sobre la transcripción del gen *Tcrd* ocurre a

través de la regulación de la actividad de E $\delta$ , mapeando este efecto en el fragmento de 35-pb que contiene los sitios de unión para RUNX1 y MYB.

Nuestros datos en timocitos de ratón y células SCID.adh sugieren que el efecto inhibitorio de la señalización mediada por el pre-TCR o el tratamiento con P+I está mediado a través de inhibición de la ruta de Notch (Figura 24). Para evaluar el efecto de la señalización de Notch sobre la función de E $\delta$  de forma directa, analizamos las consecuencias de la sobreexpresión de ICN1 en células Jurkat sobre la actividad transcripcional de construcciones reporteras V $\delta$ 1p-LUC en presencia de diferentes fragmentos de E $\delta$ : E $\delta$ 370 de 370 bp con los elementos  $\delta$ E1- $\delta$ E7, E $\delta$ 280 de 280 bp con los elementos  $\delta$ E1- $\delta$ E4, E $\delta$ 160 de 160 bp con los elementos  $\delta$ E3- $\delta$ E7, E $\delta$ 60 de 60 bp con los elementos  $\delta$ E3- $\delta$ E4 y E $\delta$ 35 de 35 bp con solo al elemento  $\delta$ E3 (Figura 24B y 24D). El elemento  $\delta$ E3 está presente en todos los fragmentos testados ya que es necesario para la actividad del *enhancer*, por contener los sitios Runx y Myb esenciales<sup>399,402,189</sup>. Como control positivo para el efecto mediado por ICN1, usamos un plásmido reportero de LUC, cuya transcripción está controlada por ocho sitios de unión en tándem para RBPJ $\kappa$ , 8xRBPJ $\kappa$  (Figura 24D). Se observó un efecto activador de ICN1 sobre la actividad de todos los fragmentos de E $\delta$  probados, incluyendo E $\delta$ 35 que carece de posibles sitios de unión para RBPJ $\kappa$  (Figura 24D). Para descartar algún posible efecto de ICN1 sobre la actividad de V $\delta$ 1p, analizamos el efecto de la sobreexpresión de ICN1 sobre la actividad transcripcional de E $\delta$ 370 pero esta vez dirigida por el promotor TEAp (Figura 24E). Nuestros resultados revelaron que ICN1 activa eficientemente la transcripción de la construcción TEAp-LUC-E $\delta$ 370, pero no la construcción control TEAp-LUC. Estos resultados indican que la señalización de Notch es capaz de activar a E $\delta$ , mapeando este efecto dentro de los 35 bp que constituyen el elemento  $\delta$ E3, en ausencia de la unión del TF diana de esta señalización RBPJ $\kappa$  a esta secuencia. Aunque la expresión constitutiva de NOTCH1 presente en las células Jurkat hace difícil mostrar el efecto inhibitorio de esta ruta mediante el uso de GSIs<sup>527</sup>, el tratamiento de estas células con DAPT inhibió significativamente la actividad de la construcción V $\delta$ 1p-E $\delta$ 370-LUC, pero no la construcción control V $\delta$ 1p-LUC (Figura 24F), apoyando el efecto positivo de la señalización de Notch sobre la regulación de la función de E $\delta$ .

Para analizar si RBPJ $\kappa$  puede ejercer también un efecto sobre E $\delta$  a través de su unión directa al *enhancer*, realizamos una búsqueda de posibles sitios de unión de RBPJ $\kappa$  al *enhancer* mediante el análisis comparativo de la secuencia de E $\delta$  humano y de ratón (Figura 25).

**Eδ humano/ratón - sitios RBPJκ**

```

-----TTCTAGCAAGCCTTAATTATCCAACATAATCAGACCAGGA
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AGACCCTGTCTCAGCAAAAATCCAAGCAAGCCTTCAGTGACCAACTTACTCAGACTGGAT

TTAAGAGATACTCTTAATAAACAAGGAGATAGGGTGTATTTAT-----
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
C-----ATATTCCTGAGTAACCGATAAGGTAGGGGTTTIGAGTTGGCTTTGGTTAGTT
                                δE1

-----GGACAAGTTTCTTTTGT
      | | | | | | | | |
GGTGGGTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTGAACAAATTCT-----

AACTTGTAACCTCCCTTGAAAG-TCAGCC--AGAGTATGTCTCAAACCAAAGTCAAGATAG
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AACTCCTAACCTCTCTTGAAAATCAACCGCAAAAATACATGCCAGCCCAAACAAGATAA
                                δE2

                                RUNX1
TGAGCAAGA---AGTGTTCACCTTATGAAGGGAGGTGAGTGAGCAATGCAATGGTTTCC
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
TGAAACAAGAGATAGCAGGGCTTCTCGAAGGAGAGGCAAGTGATGAAGACTTGTGGTTTCC
                                δE3

                                MYB
AACCGTTAATGCTAGAGTTATCACTTTCTGTTATCAAGTGGCTTCAGCTATGC AAGGAAA
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AACCGTTAATGCTGGGGTTATCAGTTT-TGCTGGCA-GCAGCTTCAG-TGTGTAAGAAGA
                                δE4

                                δE5/6 RBPJκ                                δE6/7 STAT5
CCAAACAGGGGAAGTTT TCTCAGCAGGTTGAAAGCAGG----TTCCAAGAAAGCCCTTTGA
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
CTAAAAACCTAAGGTTT TCTCAGGAGGTTGAGAGCAGATAA-TTCTAAGAAA-CCCTTTGT
                                δE5                                δE6                                δE7

AAAATGT-----CTAATCCTTCAATTGTCTAGAACTAAAGCCAAAAC
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
AAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGCAATCTTGTCTGA-----AAGCCAAA--

ATAAGGAACCAGATTCTTAGGAATAAGTTTCCCTGCCCTGAGTGACTGAAACAGAATCAGT
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
-----CAGAATCTTAGGAATTAGCCTTCTGCCCTGAGTGCCAGAACAGATCCCCAT

CTTTTAGTTGAGCTTCTCAGCAGAGGAAACGGGGAGAATGATGATGGTAGTGATGGGG--
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
CTTTCAGTTGAGCTTCTCGGTGGAGAAAACGGGAGAATTGTAATG-TACTCATGAGGAA

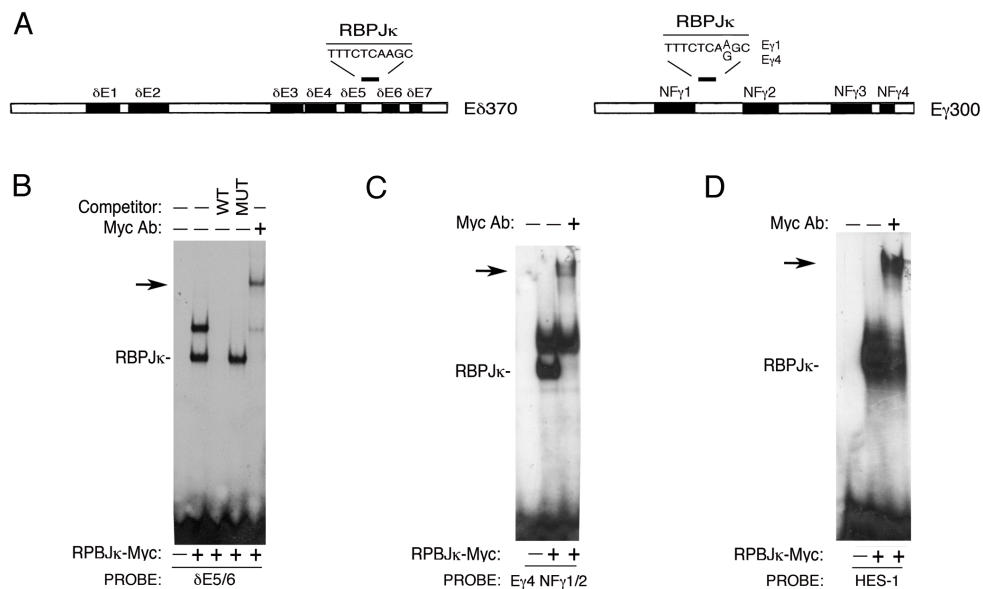
                                3' Eδ STAT5
GGTTTTCTCTGAATAGTTGATTTTCT-AGGAAAACCATGATCAACTTTGGTCCATTACAA
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
GCCTTCTCTGAACAGCTTGTTCCTTAGGATATCCCTGATCTGCCCTGATCCAGTTCTAC

```

**Figura 25. Sitios de unión de RBPJκ en Eδ.** Secuencias de Eδ humano y de ratón, y lugares potenciales de unión de RBPJκ. Se representan los siete elementos que componen la secuencia de Eδ. δE1 en fucsia, δE2 en salmón, δE3 azul, δE4 en morado, δE5 en rosa, δE6 en amarillo y δE7 en verde. Además de aparecer indicado el sitio de unión en δE6/7 de RBPJκ, aparecen: un sitio de unión a RUNX1 y MYB en δE3, un sitio para STAT5 en δE6/7 y en 3'.

Nuestro análisis reveló la presencia de tres posibles sitios conservados para este TF situados 5'δE1, 5'δE3 y entre los elementos δE5 y δE6, δE5/6. Para validar estos sitios, rea-

lizamos análisis por EMSA utilizando extractos celulares de células COS7 transfectadas con un vector de expresión de RBPJ $\kappa$  fusionado al epítipo Myc, validándose únicamente el sitio  $\delta$ E5/6 (Figura 26A). Como se observa en este ensayo, se forma un complejo con la sonda marcada radiativamente con  $^{32}$ P que contiene el sitio de unión para este FT en el promotor *HES1* en presencia de un extracto de células COS7 que expresan RBPJ $\kappa$ -Myc (Figura 26D). La presencia de RBPJ $\kappa$  en dicho complejo se verificó mediante la adición de un Ab específico para el epítipo Myc, lo cual provocó un retraso en la movilidad del complejo (marcado por una flecha). En el caso de la sonda marcada que contiene el sitio  $\delta$ E5/6 (Figura 26B), se observó la formación de dos complejos en presencia de un extracto de células COS7 que expresan RBPJ $\kappa$ -Myc, cuya movilidad se retrasó en presencia del Ab específico para el epítipo Myc (marcado por una flecha). La formación del complejo de mayor movilidad (marcado como RBPJ $\kappa$ ) se inhibió en presencia de un exceso molar de 50 veces del mismo oligonucleótido de doble cadena no marcado, pero no en presencia del mismo exceso molar del oligonucleótido conteniendo una mutación puntual en el sitio de unión para RBPJ $\kappa$ . La diferencia de intensidad de marcas radiativas observadas entre las bandas correspondientes a los complejos de RBPJ $\kappa$  formados con las sondas  $\delta$ E5/6 y *HES1* indican que la afinidad de RBPJ $\kappa$  por el sitio  $\delta$ E5/6 es menor que por el sitio del promotor de *HES1*. Así pues, hemos identificado y validado la presencia de un sitio para RBPJ $\kappa$  en E $\delta$  situado entre los elementos  $\delta$ E5 y  $\delta$ E6 (Figuras 25 y 26).



**Figura 26. Validación de sitios conservados para RBPJ $\kappa$  en E $\delta$  y E $\gamma$ .** Diagrama que representa la localización de los sitios de unión de RBPJ $\kappa$  conservados en ratón y humano en E $\delta$ ,  $\delta$ E5/6, y E $\gamma$ 4, NF $\gamma$ 1/2, validados en (B-C). Análisis por EMSA de la unión de RBPJ $\kappa$  a los sitios  $\delta$ E5/6 (**B**), NF $\gamma$ 1/2 (**C**) y al promotor humano *HES1* (**D**). Oligonucleótidos de doble cadena conteniendo los sitios  $\delta$ E5/6, NF $\gamma$ 1/2 y del sitio control presente



en el promotor de *HESI* fueron marcados radioactivamente con  $^{32}\text{P}$  e incubados con extractos de células COS-7 transfectadas con el plásmido CMV-RBPJ $\kappa$ -Myc, en presencia o ausencia de oligonucleótidos WT o mutantes (MUT) no marcados y en un exceso de 50X o de un Ab específico para el epítipo Myc. Los complejos que contienen RBPJ $\kappa$  están indicados. Las flechas indican la posición retardada de los complejos que contienen el Ab unido al complejo.

También se investigó el efecto de la sobreexpresión de ICN1 sobre la función de E $\gamma$  mediante la transfección en células Jurkat de construcciones reporteras basadas en el promotor de *FOS* humano, cfosp-LUC (Figuras 24G y 24H). Se testaron un fragmento de 300 bp de E $\gamma$ 1 y E $\gamma$ 4, que incluyen los cuatro elementos descritos para la unión de proteínas: NF $\gamma$ 1-4 (Figura 24G). De forma similar a los efectos observados en los tratamientos de P+I y tras la sobreexpresión de ICN1 sobre la función de E $\delta$ , la actividad de E $\gamma$ 1 y E $\gamma$ 4 fue inhibida tras la estimulación con P+I (Figura 24H) y activada por ICN1 (Figura 24I). Estos datos demuestran que la actividad de E $\delta$  y E $\gamma$  está regulada de forma similar a mediante la señalización de Notch.

Nuestra búsqueda de posibles sitios de unión de RBPJ $\kappa$  a E $\gamma$  reveló la presencia de dos posibles sitios conservados en humanos y ratón para este TF en el *enhancer*, situados entre los elementos NF $\gamma$ 1 y NF $\gamma$ 2, NF $\gamma$ 1/2, y 3'NF $\gamma$ 4 (Figura 27).

Se hicieron análisis por EMSA de estos sitios, utilizando extractos celulares de células COS7 transfectadas con un vector de expresión de RBPJ $\kappa$  fusionado al epítipo Myc, validándose únicamente el sitio NF $\gamma$ 1/2 (Figura 26A). Como se observa en este ensayo usando la sonda marcada con  $^{32}\text{P}$  que contiene el sitio NF $\gamma$ 1/2, la formación de dos complejos en presencia de un extracto de células COS7 que expresan RBPJ $\kappa$ -Myc (Figura 26C). La movilidad del complejo de mayor movilidad (marcado como RBPJ $\kappa$ ) se retrasó en presencia del Ab para Myc (indicado por una flecha). La diferencia de intensidad de marcas radiactivas observadas entre las bandas correspondientes a los complejos de RBPJ $\kappa$  formados con las sondas  $\delta\text{E}5/6$ , NF $\gamma$ 1/2 y el promotor *HESI* indican que la afinidad de RBPJ $\kappa$  por el sitio  $\delta\text{E}5/6$  es menor que por los sitios presentes en NF $\gamma$ 1/2 y el promotor de *HESI*. De esta forma hemos identificado y validado la presencia de un sitio para RBPJ $\kappa$  en E $\gamma$  situado entre los elementos NF $\gamma$ 1 y NF $\gamma$ 2 (Figuras 27 y 26).

Ey humano/Ey1 ratón/Ey4 ratón - sitios RBPJκ

```

CTTCAGCAATGTAGAGAGAGAATGCAGTGGTGGTGGTGGAGGAGGCAGAGTGGGTG.GTG
|         |         |         |         |         |         |         |
GCTGGAGTCCACCTGGCAGCCCAAGCCCTCAGCAAGTGC TGGGGACAGAG.AGAT...A
|         |         |         |         |         |         |         |
CCTCAGCA--GTACAGAGTG---TCAGTTGCAGGAGAGGAGGGGACACCGGAGGTGTGCA
                                                NFγ1

NFγ1/2 RBPJκ
GGAGGGCGCTGATGTGGCGGATGGTGTIT.TAITTTCTCAAGCCTTCTTTTGTITACGTGC
|         |         |         |         |         |         |         |
GAAAGGCCTTGTGTGGCTCAACTCAGTTGTACTTTCTCAAGCTCCTTTTGGTTATCTGC
|         |         |         |         |         |         |         |
GGATGGCGTGTCTATGGTGGTGGC--TT-TAITTTCTCAAGCATCTTTTCGTTTATCTGT

STAT5
TCTGGCAAATGTG GTTGTATTCATGGAAAATGCTCAAAGTCAAACCGGCCCTACTGGTTG
|         |         |         |         |         |         |         |
TCTG-TCTATGTA GTTGCTTCCTGGAAAATGGTTAAAGTCAAACCT---CCT.CTGTTTG
|         |         |         |         |         |         |         |
T-TGGTCAAATGTG GTTGCTTCCTGGAAAATGGTCAAAGTCAAACCCACCCTACTGACTG
                                                NFγ2

MYB RUNX1
GGGCCTGTGCATGGGGTGGCTAGGGTTGTAAAGACAAAACGAGGACAGTTAAACCACAA
|         |         |         |         |         |         |         |
GGGCAGCACAAAATGTGTCTAAGGCTTAGAAGACAAACATAGGAGCAGTTAAGCCAGAGC
|         |         |         |         |         |         |         |
GGCGACACAAAAGGTAGCTAGGGTTATTAGAAGAGAAAATAAGAGCAGTTAAGCCAGCAG
                                                NFγ3

CAACTTT-GCTCACTTTCAAAGGCCACAGCTAATGGAAATAAAAATATCCATCTTCACAC
|         |         |         |         |         |         |         |
CAGTTTTTGTCTGCTTTCGAAGGCCACAGCTATTAGACAGAAAACCTCCTGTACTGGAA
|         |         |         |         |         |         |         |
CAGCTCT-GCTCTCTTTCAAAGGTACAGGCTAGTAGGAAAAAAAAAATTAGCTTCATGC
                                                NFγ4

3' NFγ4 RBPJκ
ATACAAGATTACTATCAAAC-----ACACTCTCCACCCTGTGGGTAGGTGGGGC
|         |         |         |         |         |         |         |
GTGGCCCTGAAACAGCAT-CGTGCTGACAGACACTGGGCTTGTATGGTTGTCTGCTCAC
|         |         |         |         |         |         |         |
-TGTGTGGTGGCT-TCAAACTG--CAGAGTCAACTGCGGACAGCA-GGACTCCTGGGGG

```

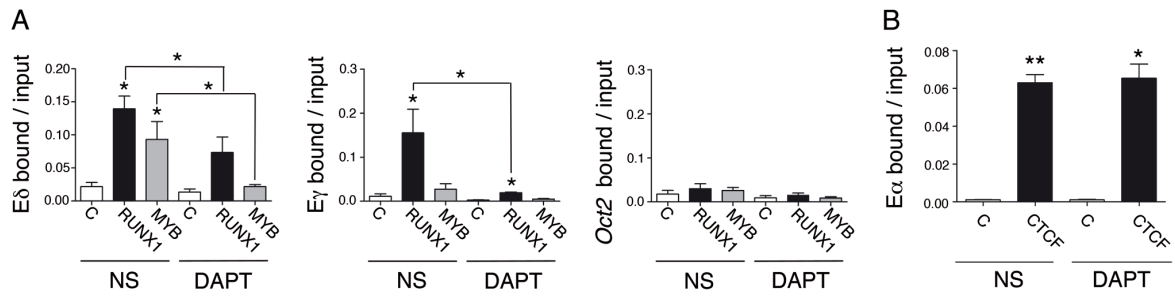
**Figura 27. Sitios de unión de RBPJκ en Ey.** Se representan las secuencias de Ey humano, Ey1 de ratón y Ey4 de ratón. Se pueden observar los elementos NFγ1 en morado, NFγ2 en amarillo, NFγ3 en azul y NFγ4 en fucsia. Aparecen subrayados los sitios de unión de RBPJκ a los elementos NFγ1/2 y en la región 3' de NFγ4, a STAT5 en NFγ2 y a RUNX1 y MYB en NFγ3.

Para confirmar el efecto observado de la señalización de Notch en la función de estos *enhancers* en un contexto natural de cromatina, evaluamos el efecto de la sobre-expresión de ICN1 sobre la transcripción de un minilocus *TCRD* humano integrado en el genoma en clones de células Jurkat<sup>405</sup>. Este minilocus de 22 kb consta de los segmentos Vδ1, Vδ2, Dδ3, Jδ1 y Jδ3 sin reordenar y los cuatro exones *TRDC*, con Eδ localizado en su localización natural en un fragmento de 10,5 kb (Figura 24J). Debido a que el gen endógeno *TCRD* ha sido deletado por la historia de reordenamientos del gen *TCRA* en esas células, no hay ninguna región endógena del gen *TCRD* que pueda interferir con el análisis del minilocus integrado. Los reordenamientos VδDδ-Jδ del minilocus y la transcripción de Cδ en timocitos de

ratones transgénicos dependen de la presencia de E $\delta$  WT, ya que E $\delta$ mRunx y E $\delta$ mMyb resultan ser inactivo<sup>403,405,404</sup>. Nosotros sobre-expresamos ICN1 mediante transducción con retrovirus GFP o ICN1 (GFP+ICN1) en dos clones previamente caracterizados que contienen el minilocus con E $\delta$  WT, W7, o con E $\delta$ mMyb, M20<sup>405</sup> (Figuras 24J y 24K). Los clones W7 y M20 fueron seleccionados entre una batería de clones porque ambos tienen dos copias del transgén y un fenotipo que muestra que la transcripción de C $\delta$  depende de la presencia del sitio MYB<sup>405</sup>. Nuestros resultados mostraron que la transducción con los virus ICN1 incrementó la transcripción del gen diana de Notch *HES1* en los clones W7 y M20. De acuerdo con los datos obtenidos sobre el efecto de la señalización de Notch sobre la actividad de E $\delta$  presente en construcciones reporteras de LUC transfectadas transitoriamente (Figura 24D), la sobre-expresión de ICN1 indujo un aumento de la transcripción de C $\delta$  en el clon W7, pero no en el clon M20 (Figura 24K). Estos resultados indican que la señalización de Notch es capaz de activar la transcripción dependiente de E $\delta$  en cromatina nativa.

## **6. El reclutamiento de RUNX1 y de MYB a E $\delta$ y E $\gamma$ es dependiente de la señalización de Notch**

El hecho de que la señalización de ICN1 pueda activar la función de E $\delta$  y E $\gamma$  (Figuras 24D, 24H y 24K), incluyendo E $\delta$ 35 que solo tiene el elemento  $\delta$ E3 con los sitios de unión para MYB y RUNX1, junto con el efecto de la sobre-expresión de ICN1 y el tratamiento con DAPT sobre la transcripción de *Runx1* y *Myb* en timocitos de ratón (Figuras 21C, 21F y 21H), sugieren que la señalización de Notch activa a estos *enhancers* a través del reclutamiento de RUNX1 y MYB a sus sitios de unión. Para evaluar este punto de forma directa comparamos la unión de estos FTs a E $\delta$  y E $\gamma$  mediante qChIP en células SCID.adh tratadas o no tratadas con DAPT (Figura 28A). De acuerdo con el efecto inhibitorio derivado del tratamiento con DAPT sobre la transcripción de *Runx1*, *Myb*, C $\delta$  y C $\gamma$  (Figura 21H), observamos que la unión de RUNX1 y MYB a E $\delta$  y E $\gamma$  se inhibe fuertemente en las células tratadas con DAPT, mientras que no se observa ninguna unión a la secuencia control *Oct2* (Figura 28A). Como control de especificidad del efecto inhibitorio del reclutamiento de RUNX1 y MYB, se analizó la unión de CTCF a E $\alpha$  en las células tratadas o no con DAPT (Figura 28B). La unión de CTCF a E $\alpha$  no se afecta por el tratamiento de las células con DAPT, demostrando que la especificidad del efecto inhibitorio del reclutamiento de RUNX1 y MYB a E $\delta$  y E $\gamma$ . Nuestros resultados demuestran que la señalización de Notch activa la transcripción dependiente de E $\delta$  y E $\gamma$ , favoreciendo el reclutamiento de RUNX1 y MYB a la cromatina de estos *enhancers*.

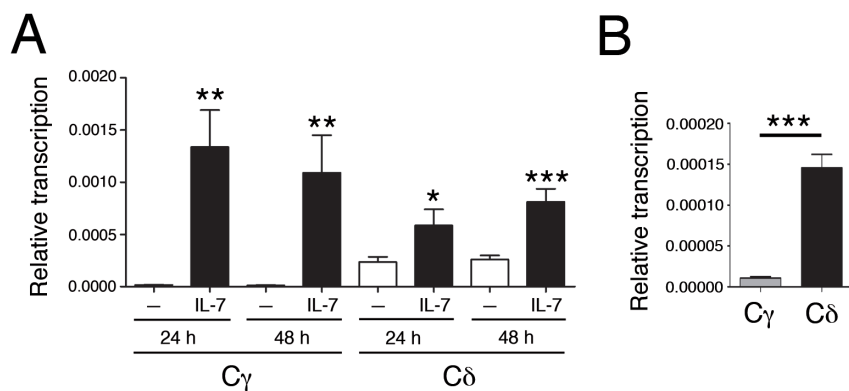


**Figura 28. El reclutamiento de RUNX1 y MYB a Eδ y Eγ es dependiente de la ruta de Notch. (A)** Análisis por qChIP de la unión de RUNX1 y MYB a Eδ, Eγ y Oct2 (n=8) y **(B)** de CTCF a Eα (n=3) en células SCID.adh no tratadas (NS) o tratadas con DAPT. Los datos representan la media ± SEM de los resultados obtenidos por duplicado de n experimentos independientes. La significancia entre los valores obtenidos está indicada.

## 7. El tratamiento con IL-7 induce la transcripción germinal del gen *Tcrd*

La señalización de IL-7R al igual que la de Notch es fundamental para el desarrollo de las etapas tempranas durante la diferenciación de las células T<sup>528,386</sup>. Experimentos en ratones *Il7r*<sup>-/-</sup> demostraron previamente que esta señalización es esencial para la transcripción germinal y recombinación VγJγ del gen *Tcrg*, y la generación de los linfocitos T γδ<sup>129,386,529,295,296</sup>. El hecho de que tanto la transcripción germinal como los reordenamientos del gen *Tcrg* ocurran simultáneamente en el gen *Tcrd* durante los mismos estadios de diferenciación de los timocitos, y que los *enhancers* responsables de estos procesos en ambos genes tengan una regulación paralela a través de la ruta de Notch, nos condujo a estudiar un posible papel de esta señalización mediada por IL-7 sobre el gen *Tcrd*.

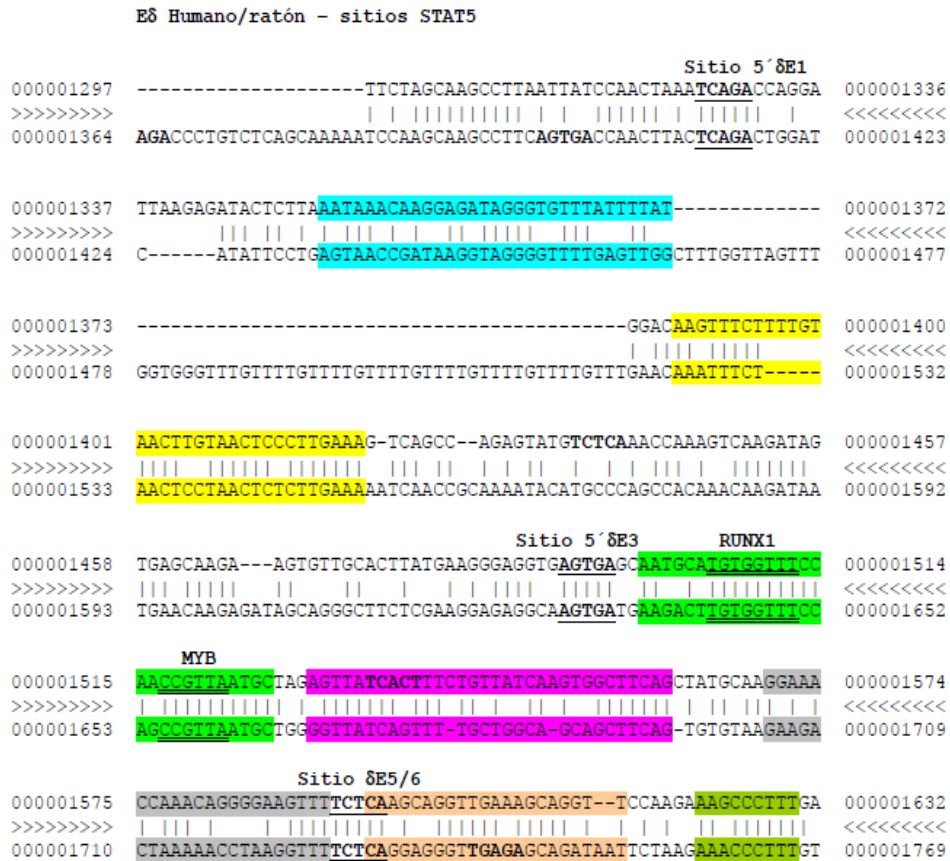
Debido a que observamos que el modelo celular SCID.adh constituye un buen modelo para el estudio de la dependencia de la transcripción del gen *Tcrg* a la señalización mediada por IL-7 (Figura 19B), decidimos usar este sistema para analizar el posible efecto de IL-7 sobre la transcripción del gen *Tcrd* (Figura 29A). De acuerdo con nuestros experimentos (Figura 19B), el tratamiento con IL-7 induce la transcripción del gen *Tcrg* en estas células, pero también aumenta la transcripción del gen *Tcrd* a unos niveles que son comparables a los del gen *Tcrg* inducido después de un tratamiento de 24 o 48 horas (Figura 29A). El hecho que el gen *Tcrd* tenga una transcripción basal mucho mayor que la del gen *Tcrg* indica que la dependencia de esta señalización para la transcripción del gen *Tcrd* es menor que la del gen *Tcrg* (Figura 29B). Estos datos indican que tanto el gen *Tcrg* como el gen *Tcrd* son activados por la señalización mediada por IL-7R, con una dependencia mayor por esta señalización en el caso del gen *Tcrg*.



**Figura 29. La señalización mediada por IL-7 activa la transcripción del gen *Tcrd*.** (A) Análisis transcripcional por RT-qPCR de C $\gamma$  y C $\delta$  en células SCID.adh no tratadas (-) o tratadas con IL-7 (IL-7) durante 24 o 48 horas (n=8). (B) Comparación entre los niveles de transcripción basal de C $\gamma$  y C $\delta$  en células SCID.adh (n=8). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de los resultados obtenidos por duplicado de n experimentos independientes. La significancia entre los valores obtenidos está indicada.

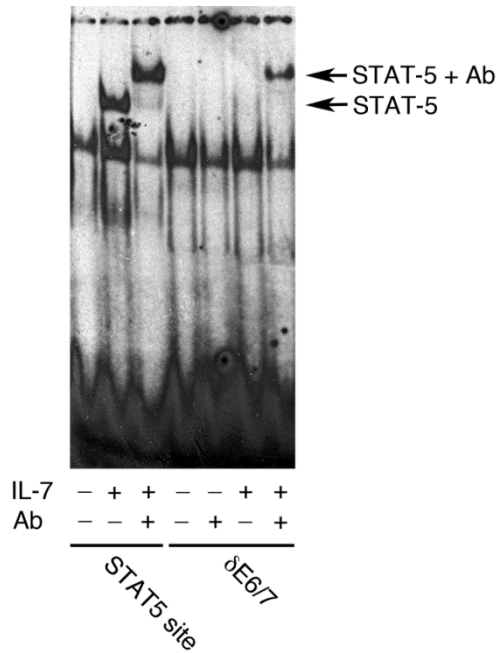
## 8. La señalización mediada por IL-7 activa E $\delta$

La inducción de la transcripción germinal y la recombinación V $\gamma$ J $\gamma$  en el locus *Tcrd* mediada por el IL-7R ocurre a través de la activación de E $\gamma$  y los promotores V $\gamma$  y J $\gamma$ <sup>386,342</sup>. Como se ha mencionado en la Introducción, cuando IL-7 se une a su receptor se desencadena la fosforilación y activación de STAT5A y STAT5B, los cuales forman homo y heterodímeros y se translocan al núcleo, donde se unen a sus secuencias de unión específicas, activando la transcripción de sus genes diana. En trabajos realizados con anterioridad se observó que STAT5 activado por la presencia de IL-7 se une a secuencias específicas presentes en los promotores V $\gamma$  y J $\gamma$ , induciendo el reclutamiento de coactivadores, lo que provoca la acetilación de histonas, la transcripción germinal y la recombinación V $\gamma$ J $\gamma$ <sup>386</sup>. Además de a estos promotores, STAT5 se une a un sitio específico presente en E $\gamma$ <sup>342</sup> (Figura 27). Así pues, la unión de STAT5 a E $\gamma$  y a los promotores V $\gamma$  y J $\gamma$  desencadena la accesibilidad local de la cromatina necesaria para activar la transcripción germinal y los reordenamientos V $\gamma$ J $\gamma$ <sup>530,531</sup>. Para evaluar si el efecto activador de la transcripción del gen *Tcrd* que hemos observado (Figura 29A) está mediado a través de la activación de E $\delta$  por STAT5 como ocurre en el caso de E $\gamma$ , hicimos un mapeo comparativo de E $\delta$  humano y de ratón para buscar posibles sitios de unión TTCN<sub>3</sub>GAA para STAT5 conservados. Nuestra búsqueda reveló la presencia de dos posibles sitios conservados para este TF situados entre los elementos  $\delta$ E6 y  $\delta$ E7,  $\delta$ E6/7, y en la región 3', 3'E $\delta$  (Figura 30).



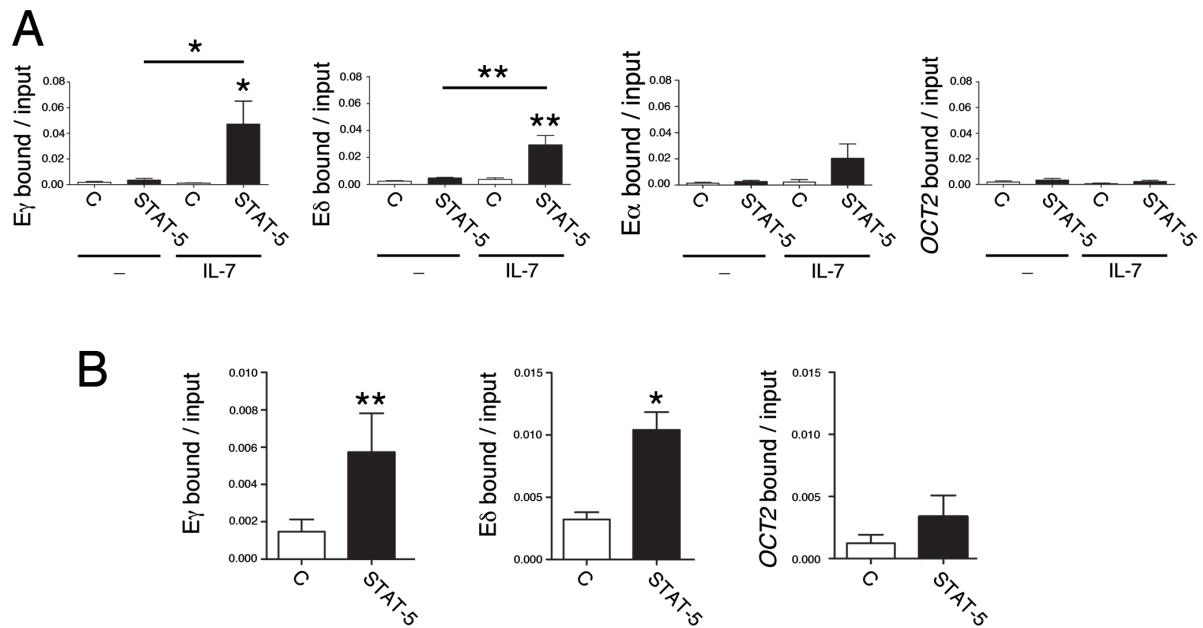
**Figura 30. Sitios de unión de STAT5 en Eγ.** Secuencia de Eδ y sitios de unión para STAT5 en humano y en ratón. Se representan los sitios de unión de unión a STAT5 en 5' del elemento δE1, 5' de δE3 y entre los elementos δE5 y δE6.

Para validar estos sitios potenciales realizamos análisis por EMSA, utilizando extractos celulares de células SCID.adh tratadas o no con IL-7 durante 30 minutos, validándose únicamente el sitio δE6/7 (Figura 31). Como se observa en este ensayo, en presencia de una sonda marcada radiactivamente con <sup>32</sup>P que contiene un sitio consenso de unión para STAT5 se forma un complejo solo en presencia de un extracto de células SCID.adh tratadas con IL-7 durante 30 minutos, pero no en presencia de un extracto de células no tratadas. La presencia de STAT5 en dicho complejo se verificó mediante la adición de un Ab específico para dicho FT, lo cual provocó un retraso en la movilidad del complejo. En el caso de la sonda que contiene el sitio δE6/7, se observó la presencia de una tenue banda en presencia de extractos de células tratadas con IL-7, pero no con extractos de células no tratadas, cuya movilidad se retrasó en presencia del Ab específico. De esta forma hemos identificado la presencia de un sitio para STAT5 en Eδ, cuya afinidad por este FT es menor que la del sitio consenso usado como control positivo.



**Figura 31. STAT5 se une a un sitio situado entre los elementos  $\delta E6$  y  $\delta E7$ .** Análisis por EMSA de la unión de STAT5 al sitio  $\delta E6/7$ . Oligonucleótidos de doble cadena conteniendo un sitio consenso para STAT5 o el sitio  $\delta E6/7$  fueron marcados radioactivamente con  $^{32}P$  e incubados con extractos de células SCID.adh cultivadas en ausencia o presencia de IL-7 durante 30 minutos. Los complejos que contienen STAT5 en ausencia o presencia de un Ab para STAT5 están indicados.

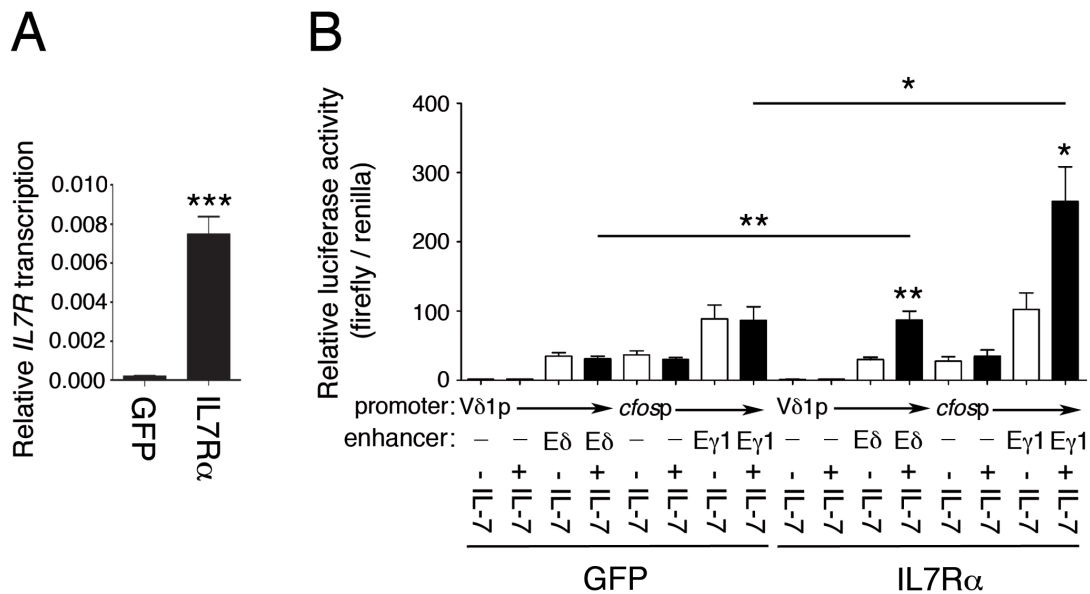
Para determinar si STAT5 se une *in vivo* a  $E\delta$ , realizamos experimentos de qChIP (Figura 32). Para ello, utilizamos extractos de células SCID.adh tratadas o no con IL-7 durante 30 minutos y comparamos la unión de STAT5 a  $E\delta$  y  $E\gamma$  (Figura 32A). De acuerdo con los resultados obtenidos en células SCID.adh tratadas o no con IL-7 en la transcripción de  $C\delta$  y  $C\gamma$ , observamos que STAT5 se recluta eficientemente y de forma equivalente a  $E\gamma$  y  $E\delta$ . También analizamos la unión de STAT5 a  $E\alpha$  y  $Oct2$ , observándose unión de STAT5 a  $E\alpha$ , pero no a la secuencia control  $Oct2$  (Figura 32A). Para comprobar si STAT5 se une a  $E\delta$  y  $E\delta$  en timocitos DN3a de ratón, realizamos experimentos de qChIP en timocitos de ratones  $Rag2^{-/-}$  cultivados *in vitro* durante 30 minutos en presencia o ausencia de IL-7 (Figura 32B). Nuestros resultados indicaron que STAT5 se une  $E\gamma$  y  $E\delta$  tras la señalización de IL-7R en timocitos DN3a. Estos datos apoyan que la unión de STAT5 a  $E\gamma$  y  $E\delta$  es responsable de la activación de la transcripción de los genes  $Terg$  y  $Tcrd$  por la señalización de IL-7R.



**Figura 32. La señalización por IL-7 induce la unión de STAT5 a E $\delta$ .** (A) Análisis por qChIP de la unión de STAT5 a E $\delta$ , E $\gamma$ , E $\alpha$  y Oct2 en células SCID.adh no tratadas (-) o tratadas con IL-7 (IL-7) (n=8). (B) Análisis por qChIP de la unión de STAT5 a E $\delta$ , E $\gamma$  y Oct2 en timocitos de ratón Rag2<sup>-/-</sup> cultivados en presencia de IL-7 no tratados (barras blancas) o tratados con IL-7 (barras negras) durante 48 horas (n=4). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de los resultados obtenidos por duplicado de n experimentos independientes. La significancia entre los valores obtenidos está indicada.

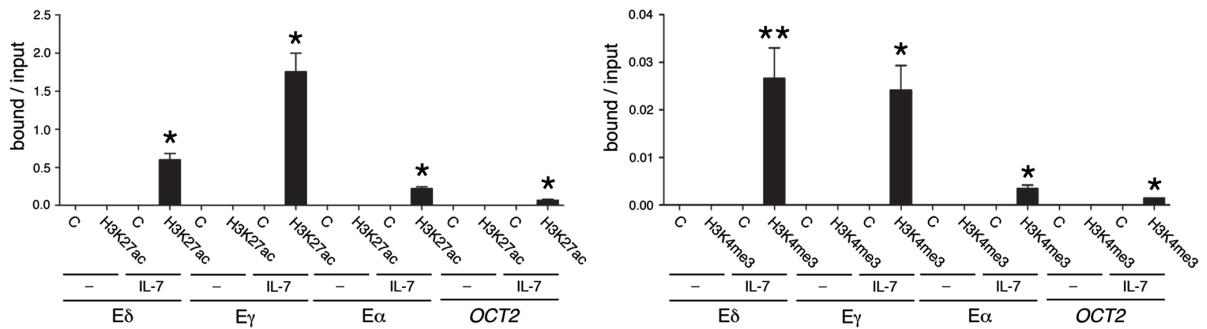
Para evaluar funcionalmente el papel de esta señalización sobre la actividad de E $\delta$ , realizamos ensayos de expresión de genes reporteros de LUC mediante transfecciones transitorias en células Jurkat (Figura 33). Para estos experimentos utilizamos dos clones de células Jurkat, que expresan o no IL-7R<sup>532</sup>. Estos dos clones fueron aislados después de ser transducidos con retrovirus que expresan GFP (GFP) o IL-7R $\alpha$  + GFP (IL-7R $\alpha$ ). Como se comprobó mediante RT-qPCR, el clon IL-7R $\alpha$  tiene una alta transcripción del gen *IL7R* comparado con el clon control (Figura 33A). Para comprobar si la señalización de IL-7 activa E $\delta$ , transfectamos las construcciones V $\delta$ 1-LUC y E $\delta$ 370-V $\delta$ 1-LUC en ambos clones cultivando las células en ausencia o presencia de IL-7 durante 48 horas (Figura 33B). Como control positivo, se transfectaron las construcciones c-fos-LUC y E $\gamma$ 1-cfos-LUC (Figura 33B). Como era esperable, no observamos que la actividad transcripcional de ninguna de estas construcciones se afectase en las células GFP en presencia de IL-7, ya que estas células no expresan IL-7R (Figura 33A). Sin embargo, en las células que expresan IL-7R $\alpha$ , los resultados indicaron que la actividad transcripcional de las construcciones que contienen E $\gamma$ 1 o E $\delta$  se indujo en presencia de IL-7 (Figura 33B). Estos resultados demuestran que la señalización de IL-7R activa la función de E $\gamma$ 1 y E $\delta$ , activando la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg*, respectivamente.





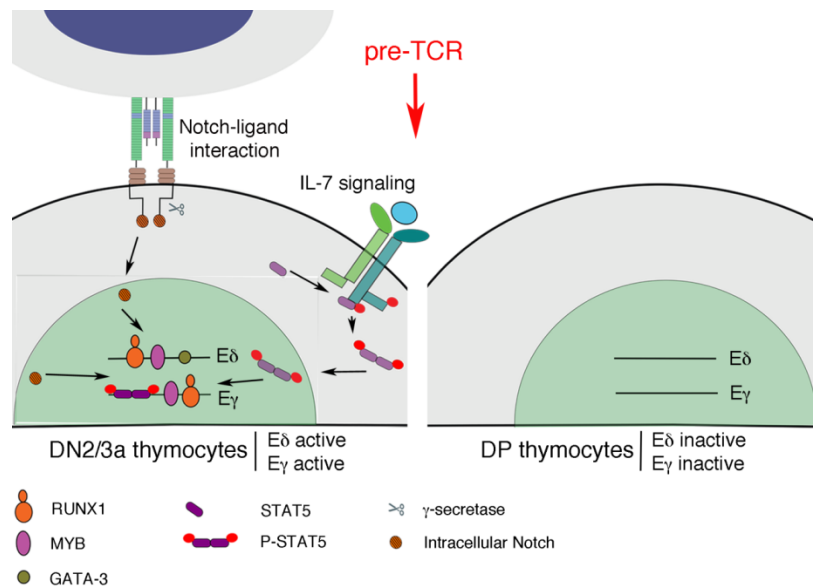
**Figura 33. La señalización mediada por IL-7R activa la función de E $\delta$ .** (A) Análisis transcripcional de *IL7RA* en células Jurkat que no expresan IL-7R (GFP) y en células Jurkat que expresan IL-7R (IL7R $\alpha$ ) (n=x). (B) Análisis de la actividad transcripcional de E $\delta$  y E $\gamma$ 1 en construcciones de LUC transfectadas células Jurkat GFP e IL7R $\alpha$  no estimuladas cultivadas en ausencia de IL-7 (-IL-7) o presencia de IL-7 (+IL-7) durante 48 horas (n=9). Los datos representan la media  $\pm$  SEM de los resultados obtenidos por duplicado de n experimentos independientes. La significancia entre los valores obtenidos está indicada.

Como se describe en la Introducción, la modificación covalente de los residuos de lisina de las histonas es determinante para activación e inhibición de la transcripción génica. Dentro de estas modificaciones, las marcas H3K27ac y H3K4me3 se relacionan con la activación de la transcripción, estando presentes en promotores y *enhancers* activos<sup>33,533,534,535</sup>. De hecho, los análisis de los patrones epigenéticos de los *enhancers* durante el desarrollo de células T apoyan que los *enhancers* activos implicados en el desarrollo de timocitos presentan estas dos marcas<sup>535</sup>. Con el fin de verificar la activación de E $\delta$  endógenamente por IL-7 analizamos la inducción de estas marcas mediante experimentos de qChIP en células SCID.adh tratadas o no con IL-7 durante 24 horas (Figura 34). Como control positivo y de acuerdo con análisis previos<sup>388,531</sup>, analizamos la inducción de estas marcas en E $\gamma$  (E $\gamma$ 4) (Figura 34). Nuestros resultados mostraron una clara inducción de H3K27ac y H3K4me3 por IL-7 tanto en E $\delta$  como en E $\gamma$ . También analizamos la inducción de estas marcas en E $\alpha$  y la secuencia control *Oct2*, evidenciándose bajos niveles de H3K27ac y H3K4me3 en estas regiones, indicando que su cromatina se encuentra menos accesible (Figura 34). Nuestros datos demuestran que la señalización mediada por IL-7R a través del reclutamiento de STAT5 y la inducción de H3K27ac y H3K4me3 a E $\gamma$  y E $\delta$  activa la función de estos *enhancers* para inducir la transcripción de los genes *Tcrg* y *Tcrd* en timocitos DN2-DN3a, cuando esta señalización está presente junto con la mediada por Notch.



**Figura 34. La señalización mediada por IL-7R activa Eδ de acuerdo con su patrón de H3K27ac y H3K4me3.** Análisis de la presencia de las marcas H3K27ac (panel izquierdo) y H3K4me3 (panel derecho) por qChIP en Eδ, Eγ, Eα y *Oct2* (n=4). Los datos representan la media ± SEM de los resultados obtenidos por duplicado obtenidos de n experimentos independientes. La significancia entre los valores obtenidos está indicada.

En resumen, nuestros datos revelan que la regulación transcripcional de los genes *Tcrd* y *Tcrg*, mediada por Eδ y Eγ respectivamente, está regulada por los mismos mecanismos moleculares, los cuales se activan de forma conjunta por las rutas de Notch e IL-7R (Figura 35). Además nuestros hallazgos revelan un nuevo mecanismo molecular de la regulación génica a través de la señalización de Notch, mediante el reclutamiento de RUNX1 y MYB a sus sitios de unión específicos.



**Figura 35. Efecto de las señalizaciones de Notch, IL-7 y pre-TCR sobre el reclutamiento de RUNX1, MYB, GATA3 y STAT5 Eδ y Eγ.** Representación de los FT RUNX1, MYB, GATA-3 y STAT-5 asociados a la cromatina de Eδ y Eγ en timocitos DN2/3a y DP bajo el efecto de las señalizaciones de Notch, IL-7 y del pre-TCR. RUNX1 se representa como dos círculos naranjas; MYB se representa como un círculo morado; GATA-3 se representa como un círculo verde; STAT-5 se representa como cilindros morados; STAT-5 fosforilado se representa como cilindros morados con círculos rojos; la γ-secretasa se representa como unas tijeras; ICN1 se representa como un círculo marrón. Las señalizaciones de Notch y de IL-7 aparecen representadas por la unión de sus ligandos a sus receptores excepto la señalización del pre-TCR que parece indicada en rojo.

## **Conclusiones**

1. RUNX1 y MYB se unen específicamente a E $\delta$  y E $\gamma$  en timocitos DN3a, y se disocian de estos *enhancers* en timocitos DP por lo que existe una correlación directa entre la unión de RUNX1 y MYB a E $\delta$  y E $\gamma$  y la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg* durante el desarrollo de los timocitos DN3a a DP.
2. La señalización mediada por el pre-TCR induce el silenciamiento estable de la transcripción de los genes *Tcrg* y *Tcrd*, con una cinética similar entre ambos, y una correlación con el reclutamiento de RUNX1 y MYB a E $\gamma$  y E $\delta$ .
3. La señalización mediada por el pre-TCR induce el silenciamiento estable de la transcripción de los genes *Notch1*, *Runx1* y *Myb*, con una cinética muy similar a la observada para los genes *Tcrg* y *Tcrd*.
4. La señalización de Notch, tanto inducida por sobre-expresión de ICN1 como a niveles fisiológicos en cultivos sobre células OP9-DL1, activa la transcripción de *Notch1*, *Runx1*, *Tcrd* y *Tcrg*, pero no de *Myb* en timocitos DN primarios de ratón.
5. Las células SCID.adh constituyen un modelo celular idóneo para el estudio del mecanismo molecular del efecto de las señalizaciones mediadas por el pre-TCR e IL-7R en la regulación transcripcional de los genes *Tcra*, *Tcrd* y *Tcrg* en la transición de los timocitos DN3a a DN4 durante el proceso de la selección- $\beta$ .
6. RUNX1 y MYB forman parte del CRC de las células SCID.adh, lo cual explica que no se pueda conseguir su total inhibición.
7. La inhibición de la transcripción de los genes *Runx1* y *Myb* en células SCID.adh inhibe la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg*, demostrando que RUNX1 y MYB son los FT de las familias RUNX y MYB implicados en la regulación de estos genes.
8. La señalización de Notch activa la transcripción de los genes *Hes11*, *Runx1*, *Myb*, *Tcrd* y *Tcrg* en células SCID.adh.
9. La señalización por Notch no activa la transcripción del gen *Il7r* en timocitos de ratón, pero sí en células SCID.adh.
10. La estimulación con P+I inhibe la actividad de E $\delta$  y E $\gamma$  en células Jurkat.
11. La señalización de Notch es capaz de activar la transcripción dependiente de E $\delta$  y E $\gamma$  en plásmidos transfectados y en cromatina nativa.
12. Tanto E $\delta$  como E $\gamma$  tienen un sitio conservado de unión a RBPJ $\kappa$ : sitios NF $\gamma$ 1/2 y  $\delta$ E5/6.
13. La activación de E $\delta$  por Notch ocurre en ausencia del sitio de unión de RBPJ $\kappa$ .

14. La señalización de Notch es necesaria para el eficiente reclutamiento de RUNX1 y MYB a E $\delta$  y E $\gamma$ , explicando el mecanismo molecular para el silenciamiento de los genes *Tcrd* y *Tcrg* durante la selección- $\beta$ .
15. La señalización mediada por IL-7R activa la transcripción del gen *Tcrd*, aunque de forma menos dependiente a la activación del gen *Tcrg*.
16. El tratamiento con IL-7 activa a E $\delta$  y E $\gamma$  de forma dependiente de la expresión de IL-7R.
17. Al igual que E $\gamma$ , E $\delta$  también tiene un sitio de unión conservado de STAT5:  $\delta$ E6/7.
18. STAT5 se une *in vivo* específicamente a E $\delta$  y E $\gamma$  de forma dependiente a la señalización por IL-7R.
19. La señalización mediada por IL-7R induce las marcas activadoras H3K27ac y H3K4me3 en E $\gamma$  y E $\delta$ .
20. Por tanto, la regulación transcripcional de los genes *Tcrg* y *Tcrd* a través de sus *enhancers* ocurre mediante un mecanismo paralelo controlado por las rutas de Notch e IL-7R, que controlan el reclutamiento de RUNX1, MYB y STAT5 durante la selección- $\beta$ .
21. Estos datos identifican una nueva vía de regulación de Notch a través del reclutamiento de RUNX1 y MYB a los *enhancers* de los genes diana de esta vía de señalización durante la selección- $\beta$ .

## **Discusión**

Los genes que codifican para las cadenas que forman los TCR están compuestos de segmentos génicos V, D y J que se reordenan durante el desarrollo de los timocitos dando lugar a la expresión de receptores funcionales TCR $\alpha\beta$  o TCR $\gamma\delta$  en la membrana celular de los linfocitos T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , respectivamente<sup>348,58</sup>. La recombinación V(D)J de los genes *Tcrg* y *Tcrd* ocurre en paralelo y se completa en timocitos DN2-DN3a dando lugar al ensamblaje del TCR $\gamma\delta$  y a la generación de los linfocitos T  $\gamma\delta$ , mientras que el gen *Tcra* reordena y se expresa en timocitos DP, dando lugar al ensamblaje del TCR $\alpha\beta$  y a la generación de los linfocitos T  $\alpha\beta$ . Los *enhancers* presentes en estos genes son esenciales para la regulaciones específicas de linaje y temporal de la transcripción germinal y recombinación V(D)J, siendo E $\alpha$ , E $\delta$  y E $\gamma$  los elementos responsables para que la recombinación V(D)J de los genes *Tcra*, *Tcrd* y *Tcrg* ocurra correctamente durante etapas precisas del desarrollo de los timocitos. Estos *enhancers* actúan mediante la regulación de múltiples promotores asociados a los segmentos génicos V, D y J con el fin de activar la transcripción germinal y la recombinación V(D)J. Estos tres *enhancers* actúan como un interruptor funcional compuesto por E $\delta$ /E $\gamma$ , por un lado, y E $\alpha$ , por otro, durante las diferentes etapas del desarrollo<sup>372,391</sup>: E $\delta$  y E $\gamma$  están activos y E $\alpha$  inactivo en timocitos DN2-DN3a, mientras que E $\delta$  y E $\gamma$  están desactivados y E $\alpha$  activado en timocitos DP. El estricto control temporal de la activación de estos *enhancers* es esencial para el correcto desarrollo de los linfocitos T. Por ejemplo, es crítico que E $\alpha$  no se active en timocitos anteriores a la selección- $\beta$  para evitar la delección prematura del gen *Tcrd* en etapas tempranas de los timocitos, lo cual impediría la generación de las células T  $\gamma\delta$ . Además la expresión prematura de la cadena TCR $\alpha$  en timocitos DN2-DN3a o la presencia de la cadena TCR $\gamma$  en timocitos DP interferiría con la generación de las células T  $\gamma\delta$  y  $\alpha\beta$ , respectivamente, por provocar el ensamblaje de complejos TCR $\alpha\gamma$  que permiten el desarrollo de los timocitos DN3a a timocitos DP, de forma independiente de la expresión del pre-TCR, que no pueden ser seleccionados y generar linfocitos T  $\gamma\delta$  y  $\alpha\beta$  funcionales<sup>396</sup>.

Las señales mediadas por Notch e IL-7R son muy fuertes en timocitos DN2-DN3a, y se inhiben durante la selección- $\beta$ , estando prácticamente ausentes en timocitos DP<sup>232</sup> (Figura 2). Estas señalizaciones, además de ser necesarias para el compromiso hacia el linaje T y la supervivencia y diferenciación celular de los timocitos<sup>232</sup>, tienen un papel esencial en los procesos de recombinación V $\beta$ -D $\beta$ J $\beta$  en el caso de Notch y V $\gamma$ -J $\gamma$  en el caso de IL-7R, siendo fundamentales, por tanto, para la generación de los linfocitos T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ <sup>153,294,296</sup>. Nuestros datos indican que la regulación transcripcional de los genes *Tcrd* y *Tcrg*, mediada por E $\delta$  y

E $\gamma$  respectivamente, ocurre a través de un mecanismo molecular común mediado por las rutas de Notch e IL-7R<sup>392</sup> (datos no publicados). Según nuestro modelo (Figura 35), las rutas de Notch e IL-7R activan la transcripción de los genes *Tcrd* y *Tcrg*: Notch es responsable del eficiente reclutamiento de RUNX1 y MYB a E $\delta$  y E $\gamma$ , mientras que la ruta de IL-7R induce la traslocación nuclear, dimerización y unión de STAT5 a estos *enhancers* en timocitos DN2-DN3a; la fuerte inhibición de ambas rutas durante la transición de los timocitos DN3a a DP es responsable de la disociación de estos TF de estos *enhancers* y, por tanto, del silenciamiento de los genes *Tcrd* y *Tcrg*<sup>392</sup>.

Datos previos mostraron que la actividad de E $\delta$  y E $\gamma$  depende de la ocupación de sitios esenciales para FT de la familia RUNX y MYB en timocitos DN3a, mientras que la selección- $\beta$  provoca la disociación de estos FT causando la inactivación de estos *enhancers* y el consecuente silenciamiento de los genes *Tcrd* y *Tcrg* en timocitos DP<sup>372,391,189,342,403,411,404,191,402</sup>. Nuestros experimentos de qChIP y silenciamiento génico de los genes *Runx1* y *Myb* identifican inequívocamente a RUNX1 y MYB como los FT responsables de la regulación de E $\delta$  y E $\gamma$  (Figuras 16, 19, 20 y 28). De hecho, el análisis de las bases de datos de experimentos de ChIP-seq de RUNX1 en timocitos de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup><sup>332</sup> confirman nuestros datos, ya que RUNX1 se une específicamente al sitio RUNX del elemento  $\delta$ E3 en E $\delta$  y del elemento NF $\gamma$ 3 en E $\gamma$ 1/E $\gamma$ 4 en timocitos DN3a.

RUNX1 y MYB forman parte de la red de FT implicados en el programa de diferenciación de los linfocitos T, por lo que su expresión está muy regulada<sup>522</sup>. Existe un eje RUNX1/MYB dependiente de la ruta de NOTCH1 que controla el desarrollo de las HSC en embriones de ratón, siendo menos evidente su prevalencia en etapas posteriores del desarrollo<sup>536</sup>. Sin embargo, nuestros datos indican que la ruta de Notch afecta positivamente a la expresión de *Runx1* y *Myb* en células SCID.adh (Figura 19F y 19H), en concordancia con datos previos obtenidos en estas células<sup>537,280,538</sup>. Sin embargo, en timocitos DN3a primarios cultivados *in vitro* hemos observado un efecto positivo de esta señalización sobre la transcripción de *Runx1* pero no de *Myb* (Figura 16B). Estos resultados indican que solo *Runx1* responde a la señalización de Notch en timocitos primarios, mientras que *Runx1* y *Myb* son activados por esta señalización en células SCID.adh. RUNX1 y MYB forman parte del CRC que define a las células T-ALL, actuando juntos en el control del programa de expresión génica responsable de la identidad de estas células<sup>485,477,484</sup>. Al estar inter-regulados transcripcionalmente a través de la regulación de sus respectivos *enhancers*, un descenso sutil en la transcripción de cualquiera de los TF que forma parte de un CRC inhibe la transcripción



de los genes de los otros TF que forman parte del mismo, afectando a la supervivencia e identidad celulares. De acuerdo con la posible existencia de un CRC similar al descrito en células T-ALL humanas en las células SCID.adh, nuestros datos muestran que un descenso sutil en la transcripción de *Runx1* o *Myb* tiene como resultado una inter-regulación transcripcional mutua entre estos dos genes (Figura 20). De esta manera, la regulación interdependiente entre la expresión de RUNX1 y MYB observada en células SCID.adh podría causar el descenso de la transcripción los genes de ambos FT observado en los tratamientos con DAPT y P+I. Estos datos sugieren que *Runx1* es una diana real de la señalización de Notch, mientras que la respuesta de *Myb* a la señalización de Notch y al tratamiento con P+I observada en células SCID.adh es la consecuencia de la participación de RUNX1 y MYB en el CRC de estas células.

La regulación de la transcripción de *Runx1* mediada por NOTCH1, junto con la inter-regulación de la transcripción de *Notch1* y *Myb* mediada por RUNX1 descrita recientemente<sup>521</sup>, sugieren que NOTCH1 pueda también ser un componente del CRC de las células T-ALL. De hecho, mutaciones en el gen *NOTCH1* que están implicadas en una activación intrínseca de esta ruta está presente en un alto porcentaje de los casos de T-ALL<sup>438</sup>. En favor de esta hipótesis, NOTCH1, RBPJ $\kappa$  y RUNX1 se unen simultáneamente a las regiones reguladoras de los genes *RUNX1*, *MYB* y *NOTCH1* en células T-ALL<sup>133</sup>.

Aunque los timocitos primarios y las células T-ALL comparten aspectos comunes de sus redes regulatorias de FT, también difieren en los mecanismos transcripcionales que controlan algunos genes específicos, como parece ser el caso de la regulación del gen que codifica para la cadena IL-7R $\alpha$ . El *IL-7R* humano es un gen diana de Notch en células T-ALL humanas, sin embargo no se ha encontrado un efecto dependiente de Notch a corto plazo en la transcripción de este gen en timocitos primarios humanos<sup>539,95,528,133</sup>. De forma similar, nuestros resultados indican que la señalización de Notch activa la transcripción de *Il7r* en células SCID.adh, pero no en timocitos primarios (Figura 23), sugiriendo una regulación diferencial conservada mediada por Notch de este gen en las células T-ALL y en timocitos primarios, tanto en humanos como en ratones.

Es de interés discutir el inesperado brusco descenso en la transcripción de *Myb* evidenciado tras la inyección del Ab para CD3 $\epsilon$  en los ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> (Figura 16D), ya que no se observa un descenso de estos transcritos durante la diferenciación de los timocitos DN3a a DP (Figuras 16B y 17). Se sabe que en etapas posteriores del desarrollo, en timocitos SP y

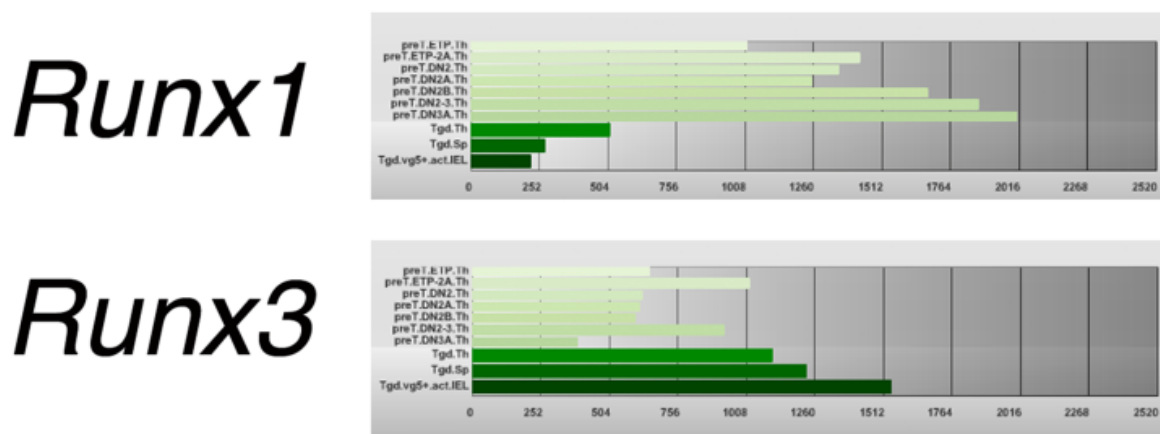
células T  $\alpha\beta$  periféricas, la transcripción de *Myb* se inhibe fuertemente (Figura 17), siendo activada cuando los linfocitos T  $\alpha\beta$  son estimulados por exposición a antígeno o mitógenos<sup>176,540</sup>. Aunque existen muchas similitudes en la activación e inhibición de la transcripción de genes específicos a través de la señalización mediada por los complejos pre-TCR, CD3 y TCR $\alpha\beta$ , también existen diferencias específicas en los efectos de cada uno de estos receptores que explican las distintas consecuencias observadas mediada por la señalización asociada a cada uno de estos complejos durante la selección- $\beta$ , la selección positiva y la estimulación de la células T  $\alpha\beta$ . Nuestros datos indican que una de estas diferencias incluye la regulación de la transcripción del gen *Myb*.

Nuestros datos indican que la ruta de Notch controla la expresión de los genes *Tcrd* y *Tcrg* a través de la regulación del reclutamiento de RUNX1 y MYB a E $\delta$  y E $\gamma$ , lo cual controla directamente la actividad de estos *enhancers* (Figuras 24 y 28). Este efecto de Notch podría ser directo, a través de la unión de RBPJ $\kappa$  a E $\delta$  y E $\gamma$ , o indirecto, como consecuencia de la activación de la transcripción de *Runx1*. Nuestros experimentos con genes reporteros apoyan la segunda opción porque el efecto activador derivado de la sobre-expresión de ICN1 en la actividad de E $\delta$  se observa cuando se analiza el fragmento E $\delta$ 35, el cual carece de sitios de unión para RBPJ $\kappa$  (Figuras 24 y 25). Además no se ha detectado la unión de ICN1 por ChIP-seq a E $\delta$  y E $\gamma$  en células T  $\gamma\delta$ <sup>528</sup>. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad que ICN1 sea reclutado a E $\delta$  y E $\gamma$ , a través de la unión de RBPJ $\kappa$  a los sitios  $\delta$ E5/6 y NF $\gamma$ 1/2 respectivamente (Figuras 25, 26 y 27), induciendo un cambio conformacional en sendos *enhanceosomas* que favorezca el reclutamiento de RUNX1 y MYB a  $\delta$ E3 y NF $\gamma$ 3, respectivamente. Este posible escenario dependiente de Notch y RUNX1 para la activación de E $\delta$  y E $\gamma$  se asemeja en algunos aspectos al mecanismo descrito para la regulación del gen *Bcl11b* durante el desarrollo de los timocitos, en el cual TCF1 y GATA3 controlan un estado de competencia para la activación de la transcripción dependiente de Notch, mientras que RUNX1 controla la magnitud de la expresión génica independientemente del reclutamiento de ICN1<sup>275</sup>. Tampoco es descartable una posible implicación de la ruta de Notch no canónica, independiente de RBPJ $\kappa$ , en la regulación de la actividad de E $\delta$  y E $\gamma$ <sup>541</sup>.

La regulación transcripcional mutua entre RUNX1 y MYB explicaría la disminución del reclutamiento de MYB a E $\delta$  y E $\gamma$  que se observa en respuesta a los tratamientos de DAPT y P+I en células SCID.adh, pero no explicaría la bajada del reclutamiento de MYB observada en timocitos primarios (Figuras 16, 19 y 28). Sin embargo, RUNX1 también ac-

túa como un FT estructural en cromatina, favoreciendo la unión de otros FT adyacentes<sup>542</sup>. De hecho, la unión de RUNX1 en  $\delta E3$  es necesaria para la subsecuente unión de MYB y GATA3 en  $\delta E3$  y  $\delta E4$ , respectivamente<sup>405</sup>. Es interesante que GATA3 constituye otro de los componentes del CRC de las células T-ALL<sup>485,477</sup>. Un mecanismo similar podría ocurrir en  $E\gamma$ , con una jerarquía de unión entre RUNX1 y MYB en NF $\gamma$ 3. Este papel estructural de RUNX1 explicaría el descenso del reclutamiento de MYB a  $E\delta$  y  $E\gamma$  observado en timocitos de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup> x  $\beta$ tg respecto a su unión a dichos *enhancers* de timocitos de ratones *Rag2*<sup>-/-</sup>, sin que haya un descenso detectable en la transcripción de *Myb* (Figuras 16B y 16C), y no es descartable que también contribuya al reclutamiento reducido de MYB a  $E\delta$  y  $E\gamma$  en respuesta a los tratamientos con DAPT y P+I en células SCID.adh.

Aunque RUNX1 es el FT de la familia RUNX dominante presente en timocitos DN2/3A, el ratio de los transcritos *Runx1/Runx3* presente en timocitos DN2 y DN3a se invierte en linfocitos T  $\gamma\delta$  (Figura 36), lo cual sugiere la posibilidad de que ocurra un intercambio entre RUNX1 y RUNX3 en el paso de timocitos DN2-DN3a a linfocitos T  $\gamma\delta$  para garantizar la actividad de  $E\delta$  y  $E\gamma$ . De hecho, RUNX3 puede sustituir a RUNX1 en la regulación de la transcripción transcripcional del gen *Tcrg*<sup>391</sup>.



**Figura 36. Niveles de transcripción génica de *Runx1/3* en timocitos DN3a y linfocitos T $\gamma\delta$  mostrados en la base de datos ImmGen.** Comparación de los niveles transcripcionales de *Runx1* y *Runx3* entre timocitos DN3a y células T $\gamma\delta$  obtenidos a partir de arrays de expresión de genes y RNA-seq realizados con poblaciones purificadas por citometría de flujo de ratones WT ([www.immgen.org](http://www.immgen.org)).

Se ha demostrado que la señalización de Notch es importante para la determinación de los linajes T $\alpha\beta$  y T $\gamma\delta$ , pero los resultados obtenidos son opuestos en humanos y en ratones, de forma que una señalización fuerte de Notch en precursores de células T promueve el desarrollo de células T  $\gamma\delta$  en humanos, mientras que promueve el desarrollo de células T  $\alpha\beta$

en ratones<sup>543</sup>. Los efectos opuestos de la señalización de Notch en la determinación de los linajes T  $\alpha\beta/\gamma\delta$  en humanos y ratones parecen ser una consecuencia de la etapa del desarrollo en que los timocitos reciben esa señalización en cada una de estas especies. Nuestros resultados muestran que la señalización de Notch activa la transcripción de los genes murinos *Tcrd* y *Tcrg*, tanto en timocitos primarios como en células SCID.adh, y del minilocus humano *TCRD* en células Jurkat humanas. El efecto positivo de Notch sobre la actividad de E $\delta$  y E $\gamma$  definido en esta tesis constituiría un primer nivel de regulación común entre humanos y ratones, mientras que un segundo nivel de regulación, con diferencias temporales entre las dos especies, operaría a través del sinergismo entre las señalizaciones de Notch y las mediadas por el pre-TCR y el TCR $\gamma\delta$  en etapas más tardías del desarrollo de los timocitos<sup>539</sup>.

La señalización de IL-7R, mediada por STAT5, juega un papel crítico en la supervivencia de los timocitos durante el desarrollo temprano de las células T, a través de la expresión de BCL2, y la diferenciación de las células T  $\gamma\delta$ , a través de la activación de la transcripción germinal y la recombinación del gen *Tcrg*<sup>65,296,129,294</sup>. De hecho, STAT5 es esencial para la regulación de la actividad de E $\gamma$ <sup>342</sup>. Nuestros datos corroboran esta dependencia de la actividad de E $\gamma$  en la transcripción del gen *Tcrg* en las células SCID.adh y demuestran que esta señalización es también relevante para la actividad de E $\delta$  y la transcripción del gen *Tcrd* (Figura 29). Nuestros datos muestran que STAT5 se recluta de forma similar a ambos *enhancers* en respuesta a IL-7, dando lugar a una activación funcional evidenciada en ensayos con genes reporteros y en la adquisición de marcas de histonas relacionadas con transcripción activa, como es el caso de H3K27ac y H3K4me3 (Figuras 32, 33 y 34).

Nuestros datos también revelaron una unión de RUNX1 y STAT5 a E $\alpha$  (Figuras 16 y 32), lo cual está en concordancia con el análisis de la bases de datos obtenida de experimentos de CHIP-seq en timocitos de ratón<sup>332,544</sup>. En el caso de RUNX1, este dato puede ser relevante para entender el mecanismo de inhibición de E $\alpha$  en timocitos DN3a y su activación en timocitos DP. En el caso de STAT5, no hay constancia de la presencia de sitios consenso para la unión dimérica de alta afinidad de este TF en este *enhancer*. Sin embargo, el reclutamiento de STAT5 a E $\alpha$  no tiene implicaciones funcionales sobre la transcripción del gen *Tcra*, ya que el tratamiento con IL-7 no afecta la transcripción de C $\alpha$  en células SCID.adh estimuladas con P+I (datos no publicados).

Aunque el nivel de actividad inducida por IL-7 es similar en E $\delta$  y E $\gamma$  (Figura 29), el hecho que E $\delta$  tenga mayor actividad basal en ausencia de IL-7 que E $\gamma$  indica que E $\delta$  es me-

nos dependiente de esta señalización que  $E\gamma$ . Como ambos *enhancers* dependen del reclutamiento de RUNX1 y MYB para su actividad, estos datos sugieren que la unión de otros FT a  $E\delta$ , no reclutados a  $E\gamma$ , compense por la ausencia de STAT5 en el *enhanceosoma* de  $E\delta$  en condiciones basales en ausencia de IL-7.

Nuestros datos, en conjunto, revelan una regulación común de  $E\delta$  y  $E\gamma$ , dependiente de las señalizaciones mediadas por Notch e IL-7R, a través de los FT RUNX1, MYB y STAT5 en timocitos DN2 y DN3a, siendo ambos *enhancers* inhibidos durante la selección- $\beta$  debido a la drástica bajada de estas señalizaciones. Estos hallazgos no solo han descifrado el mecanismo molecular para el silenciamiento de los genes *Tcrg* y *Tcrd* durante la selección- $\beta$  a través de la disociación de RUNX1 y MYB de sus respectivos *enhancers*, sino que han revelado una nueva vía para el control transcripcional mediada por la señalización de Notch a través de la regulación del reclutamiento de estos FT a *enhancers* durante el desarrollo de los timocitos.

## **Bibliografía**

1. Hübner, M. R., Eckersley-Maslin, M. A. & Spector, D. L. Chromatin organization and transcriptional regulation. *Current Opinion in Genetics and Development* (2013) doi:10.1016/j.gde.2012.11.006.
2. Tamaru, H. Confining euchromatin/heterochromatin territory: Jumonji crosses the line. *Genes and Development* (2010) doi:10.1101/gad.1941010.
3. Huisinga, K. L., Brower-Toland, B. & Elgin, S. C. R. The contradictory definitions of heterochromatin: Transcription and silencing. *Chromosoma* (2006) doi:10.1007/s00412-006-0052-x.
4. Mota-Gómez, I. & Lupiáñez, D. G. A (3D-nuclear) space odyssey: Making sense of Hi-C maps. *Genes* (2019) doi:10.3390/genes10060415.
5. van Steensel, B. & Belmont, A. S. Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression. *Cell* (2017) doi:10.1016/j.cell.2017.04.022.
6. Van Steensel, B. & Henikoff, S. Identification of in vivo DNA targets of chromatin proteins using tethered Dam methyltransferase. *Nat. Biotechnol.* (2000) doi:10.1038/74487.
7. Peric-Hupkes, D., Meuleman, W., Pagie, L., Bruggeman, S.W.M., Solovei, I., Brugman, W., Graf, S., Flicek, P. *et al.* Molecular Maps of the Reorganization of Genome-Nuclear Lamina Interactions during Differentiation. *Mol. Cell* (2010) doi:10.1016/j.molcel.2010.03.016.
8. Robson, M. I., De las Heras, J., Czapiewski, R., Sivakumar, A., Kerr, A.R. & Schirmer, E.C. Constrained release of lamina-associated enhancers and genes from the nuclear envelope during T-cell activation facilitates their association in chromosome compartments. *Genome Res.* (2017) doi:10.1101/gr.212308.116.
9. Hansen, A. S., Cattoglio, C., Darzacq, X. & Tjian, R. Recent evidence that TADs and chromatin loops are dynamic structures. *Nucleus* (2018) doi:10.1080/19491034.2017.1389365.
10. Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S. & Ren, B. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* (2012) doi:10.1038/nature11082.
11. Fraser, J., Ferrai, C., Chiariello, A.M., Schueler, M., Rito, T., Laudanno, G., Barbieri, M., Moore, B.L. *et al.* Hierarchical folding and reorganization of chromosomes are linked to transcriptional changes in cellular differentiation. *Mol. Syst. Biol.* (2015) doi:10.15252/msb.
12. Zhan, Y., Mariani, L., Barozzi, I., Schulz, E.G., Bluthgen, N., Stadler, M., Tiana, G. & Giorgetti, L. Reciprocal insulation analysis of Hi-C data shows that TADs represent a functionally but not structurally privileged scale in the hierarchical folding of chromosomes. *Genome Res.* (2017) doi:10.1101/gr.212803.116.
13. Yu, M. & Ren, B. The Three-Dimensional Organization of Mammalian Genomes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (2017) doi:10.1146/annurev-cellbio-100616-060531.
14. Pombo, A. & Dillon, N. Three-dimensional genome architecture: Players and mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2015) doi:10.1038/nrm3965.
15. Phillips, J. E. & Corces, V. G. CTCF: Master Weaver of the Genome. *Cell* (2009) doi:10.1016/j.cell.2009.06.001.
16. Dixon, J. R., Gorkin, D. U. & Ren, B. Chromatin Domains: The Unit of Chromosome Organization. *Molecular Cell* (2016) doi:10.1016/j.molcel.2016.05.018.
17. Wood, A. J., Severson, A. F. & Meyer, B. J. Condensin and cohesin complexity: The expanding repertoire of functions. *Nature Reviews Genetics* (2010)

- doi:10.1038/nrg2794.
18. Parelho, V., Hadjur, S., Spivakov, M., Leleu, M., Sauer, S., Gregson, H.C., Jarmuz, A., Conzonetta, C. *et al.* Cohesins Functionally Associate with CTCF on Mammalian Chromosome Arms. *Cell* (2008) doi:10.1016/j.cell.2008.01.011.
  19. Wendt, K. S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., Tsutsumi, S., Nagae, G. *et al.* Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature* (2008) doi:10.1038/nature06634.
  20. Rubio, E. D., Reiss, D.J., Welsh, P.L., Disteche, C.M., Filippova, G.N., Baliga, N.S., Aebersold, R., Ranish, J.A. & Krumm, A. CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2008) doi:10.1073/pnas.0801273105.
  21. Kim, T. H., Abdullaev, Z.K., Smith, A.D., Ching, K.A., Loukinov, D.I., Green, R.D., Zhang, M.Q., Lobanenko, V.V. & Bing, R. Analysis of the Vertebrate Insulator Protein CTCF-Binding Sites in the Human Genome. *Cell* (2007) doi:10.1016/j.cell.2006.12.048.
  22. Kagey, M. H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D.A., van Berkum, N.L., Ebmeier, C., Goossens, J. *et al.* Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature* (2010) doi:10.1038/nature09380.
  23. Cutter, A. R. & Hayes, J. J. A brief review of nucleosome structure. *FEBS Letters* (2015) doi:10.1016/j.febslet.2015.05.016.
  24. Waddington, C. H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature* (1942) doi:10.1038/150563a0.
  25. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* (2000) doi:10.1038/47412.
  26. Deaton, A. M. & Bird, A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* (2011) doi:10.1101/gad.2037511.
  27. Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* (2007) doi:10.1016/j.cell.2007.02.005.
  28. Zhang, Y. & Reinberg, D. Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes and Development* (2001) doi:10.1101/gad.927301.
  29. Zhang, J., Jackson, A.F., Naito, T., Dose, M., Seavitt, J., Liu, F., Heller, E., Kashiwagi, M., Yoshida, T., Gounari, F., Petrie, H.T. & Georgopoulos, K. Harnessing of the nucleosome-remodeling-deacetylase complex controls lymphocyte development and prevents leukemogenesis. *Nat. Immunol.* (2012) doi:10.1038/ni.2150.
  30. Mcgrath, J. & Trojer, P. Targeting histone lysine methylation in cancer. *Pharmacol. Ther. J.* (2015).doi:10.1016/j.pharmthera.2015.01.002
  31. Bedford, M. T. & Clarke, S. G. Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. *Molecular Cell* (2009) doi:10.1016/j.molcel.2008.12.013.
  32. Wang, G. G., Allis, C. D. & Chi, P. Chromatin remodeling and cancer, part I: covalent histone modifications. *Trends in Molecular Medicine* (2007) doi:10.1016/j.molmed.2007.07.003.
  33. Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J.A., Schones, D.E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T., Peng, W., Zhang, M.Q. & Zhao, K. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat. Genet.* (2008) doi:10.1038/ng.154.
  34. Clapier, C. R. & Cairns, B. R. The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* (2009) doi:10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223.
  35. Pennacchio, L. A., Bickmore, W., Dean, A., Nobrega, M. A. & Bejerano, G. Enhancers: Five essential questions. *Nature Reviews Genetics* (2013)



- doi:10.1038/nrg3458.
36. Shlyueva, D., Stampfel, G. & Stark, A. Transcriptional enhancers: From properties to genome-wide predictions. *Nature Reviews Genetics* (2014) doi:10.1038/nrg3682.
  37. Jin, F., Li, Y., Ren, B. & Natarajan, R. Enhancers: Multi-dimensional signal integrators. *Transcription* (2011) doi:10.4161/trns.2.5.17712.
  38. Bulger, M. & Groudine, M. Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell* (2011) doi:10.1016/j.cell.2011.01.024.
  39. Calo, E. & Wysocka, J. Modification of Enhancer Chromatin: What, How, and Why? *Molecular Cell* (2013) doi:10.1016/j.molcel.2013.01.038.
  40. Heintzman, N. D., Hon, G.C., Hawkins, R.D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L.F., Ye, Z., Lee, L.K. *et al.* Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* (2009) doi:10.1038/nature07829.
  41. Creighton, M. P., Cheng, A.W., Welstead, G.G., Kooistra, T., Carey, B.W., Steine, E.J., Hanna, J., Lodato, M.A. *et al.* Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2010) doi:10.1073/pnas.1016071107.
  42. Hu, Z. & Tee, W. W. Enhancers and chromatin structures: Regulatory hubs in gene expression and diseases. *Bioscience Reports* (2017) doi:10.1042/BSR20160183.
  43. Andersson, R. & Sandelin, A. Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. *Nature Reviews Genetics* (2020) doi:10.1038/s41576-019-0173-8.
  44. Haberle, V. & Stark, A. Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2018) doi:10.1038/s41580-018-0028-8.
  45. Soutourina, J. Transcription regulation by the Mediator complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2018) doi:10.1038/nrm.2017.115.
  46. Shrinivas, K., Sabari, B.R., Coffey, E.L., Klein, I.A., Boija, A., Zamudio, A.V, Schuijers, J., Hannett, N.M. *et al.* Enhancer Features that Drive Formation of Transcriptional Condensates. *Mol. Cell* (2019) doi:10.1016/j.molcel.2019.07.009.
  47. Orkin, S. H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nature Reviews Genetics* (2000) doi:10.1038/35049577.
  48. Galloway, J. L. & Zon, L. I. Ontogeny of hematopoiesis: Examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo BT - Current topics in developmental biology. in *Current topics in developmental biology* (2003).
  49. Orkin, S. H. & Zon, L. I. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* (2008) doi:10.1016/j.cell.2008.01.025.
  50. Laurenti, E. & Göttgens, B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* (2018) doi:10.1038/nature25022.
  51. Rothenberg, E. V., Moore, J. E. & Yui, M. A. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nature Reviews Immunology* (2008) doi:10.1038/nri2232.
  52. Łyszkiewicz, M., Zietara, N., Fohse, L., Puchalka, J., Diestelhorst, J., Witzlau, K., Prinz, I., Schambach, A. & Krueger, A. Limited niche availability suppresses murine intrathymic dendritic-cell development from noncommitted progenitors. *Blood* (2015) doi:10.1182/blood-2014-07-592667.
  53. Schwarz, B. A., Sambandam, A., Maillard, I., Harman, B.C., Love, P.E. & Bhandoola, A. Selective Thymus Settling Regulated by Cytokine and Chemokine Receptors. *J. Immunol.* (2007) doi:10.4049/jimmunol.178.4.2008.
  54. Ramond, C., Berthault, C., Burlen-Defranoux, O., De Sousa, A.P., Guy-Grand, D., Vieira, P., Pereira, P. & Cumano, A. Two waves of distinct hematopoietic progenitor cells colonize the fetal thymus. *Nat. Immunol.* (2014) doi:10.1038/ni.2782.

55. Serwold, T., Ehrlich, L. I. R. & Irving, L. W. Reductive isolation from bone marrow and blood implicates common lymphoid progenitors as the major source of thymopoiesis. *Blood* (2009) doi:10.1182/blood-2008-08-173682.
56. Lind, E. F., Prockop, S. E., Porritt, H. E. & Petrie, H. T. Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J. Exp. Med.* (2001) doi:10.1084/jem.194.2.127.
57. Hosokawa, H. & Rothenberg, E. V. Cytokines, transcription factors, and the initiation of T-cell development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* (2018) doi:10.1101/cshperspect.a028621.
58. del Blanco, B., Ú. Angulo, C. Hernández-Munain. 2014. Epigenetic control of T cell receptor locus rearrangements in normal and aberrant conditions. In *Epigenetic and Human Health Transcriptional and Epigenetic Mechanisms Regulating Normal and Aberrant Blood Cell Development*. C. Bonifer, P.N. Cockerill, eds. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany, p. 295-329.
59. Yui, M. A., Feng, N. & Rothenberg, E. V. Fine-Scale Staging of T Cell Lineage Commitment in Adult Mouse Thymus. *J. Immunol.* (2010) doi:10.4049/jimmunol.1000679.
60. Taghon, T., Yui, M. A., Pant, R., Diamond, R. A. & Rothenberg, E. V. Developmental and molecular characterization of emerging  $\beta$ - and  $\gamma\delta$ -selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* (2006) doi:10.1016/j.immuni.2005.11.012.
61. Seitan, V. C., Hao, B., Tachibana-Konwalski, K., Lavagnoli, T., MiraBontenbal, H., Brown, K.E., Teng, G., Carroll, T. *et al.* A role for cohesin in T-cell-receptor rearrangement and thymocyte differentiation. *Nature* (2011) doi:10.1038/nature10312.
62. Hernández-Munain, C. Recent insights into the transcriptional control of the Tcr $\alpha$ /Tcr $\beta$  locus by distant enhancers during the development of T-lymphocytes. *Transcription* (2015) doi:10.1080/21541264.2015.1078429.
63. Abramson, J. & Anderson, G. Thymic Epithelial Cells. *Annu. Rev. Immunol.* (2017) doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052320.
64. Liang, C. C., You, L., Yen, J., Liao, N., Yen, H. & Chen, C. Thymic epithelial  $\beta$ -catenin is required for adult thymic homeostasis and function. *Immunol. Cell Biol.* (2013) doi:10.1038/icb.2013.34.
65. Boudil, A., Matei, I.R., Shih, H., Bogdanoski, G., Yuan, J., Chang, S.G., Montpellier, B., Kowalski, P.E., Guidos, C.J. *et al.* IL-7 coordinates proliferation, differentiation and Tcr $\alpha$  recombination during thymocyte  $\beta$ -selection. *Nat. Immunol.* (2015) doi:10.1038/ni.3122.
66. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. & Lake, R. J. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* (1999) doi:10.1126/science.284.5415.770.
67. Felli, M. P., Maroder, M., Mitsiadis, T.A., Campese, A.F., Bellavia, D., Vacca, A., Mann, R.S., Frati, L., Lendahl, U., Gulino, A. & Screpanti, I. Expression pattern of Notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: Distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development. *Int. Immunol.* (1999) doi:10.1093/intimm/11.7.1017.
68. Koyanagi, A., Sekine, C. & Yagita, H. Expression of Notch receptors and ligands on immature and mature T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2012) doi:10.1016/j.bbrc.2012.01.106.
69. Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G. & Israel, A. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U. S. A.* (1998) doi:10.1073/pnas.95.14.8108.
70. Rand, M. D., Grimm, L.M., Artavanis-Tsakonas, S., Patriub, V., Blacklow, S.C., Sklar, J. & Aster, J.C. Calcium Depletion Dissociates and Activates Heterodimeric Notch Receptors. *Mol. Cell. Biol.* (2000) doi:10.1128/mcb.20.5.1825-1835.2000.
  71. Hambleton, S., Valeyev, N.V., Muranyi, A., Knott, V., Werner, J.M., McMichael, A.J., Handford, P.A. & Downing, A.K. Structural and functional properties of the human Notch-1 ligand binding region. *Structure* (2004) doi:10.1016/j.str.2004.09.012.
  72. Gordon, W. R., Vardar-Ulu, D., Histen, G., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J.C. & Blacklow, S.C. Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2007) doi:10.1038/nsmb1227.
  73. Sanchez-Irizarry, C., Carpenter, A.C., Weng, A.P., Pear, W.S., Aster, J.C. & Blacklow, S.C. Notch Subunit Heterodimerization and Prevention of Ligand-Independent Proteolytic Activation Depend, Respectively, on a Novel Domain and the LNR Repeats. *Mol. Cell. Biol.* (2004) doi:10.1128/mcb.24.21.9265-9273.2004.
  74. Bozkulak, E. C. & Weinmaster, G. Selective Use of ADAM10 and ADAM17 in Activation of Notch1 Signaling. *Mol. Cell. Biol.* (2009) doi:10.1128/mcb.00406-09.
  75. Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B. & Goldstein, J. L. Regulated intramembrane proteolysis: A control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* (2000) doi:10.1016/S0092-8674(00)80675-3.
  76. Struhl, G. & Adachi, A. Requirements for Presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol. Cell* (2000) doi:10.1016/S1097-2765(00)00061-7.
  77. D'Souza, B., Meloty-Kapella, L. & Weinmaster, G. *Canonical and non-canonical notch ligands. Current Topics in Developmental Biology* (2010). doi:10.1016/S0070-2153(10)92003-6.
  78. Jiang, R., Lan, Y., Chapman, H.D., Shawber, C., Norton, C.R., Serreze, D.V., Weinmaster, G. & Gridley, T. Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev.* (1998) doi:10.1101/gad.12.7.1046.
  79. Parreira, L., Neves, H. & Simões, S. Notch and lymphopoiesis: A view from the microenvironment. *Seminars in Immunology* (2003) doi:10.1016/S1044-5323(03)00004-6.
  80. Jaleco, A. C., Neves, H., Hooijberg, E., Gameiro, P., Clode, N., Haury, M., Henrique, D. & Parreira, L. Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation. *J. Exp. Med.* (2001) doi:10.1084/jem.194.7.991.
  81. Van de Walle, I., Waegemans, E., De Medts, J., De Smet, G., De Smedt, M., Snauwaert, S., Vandekerckhove, B., Taghon, T. *et al.* Specific notch receptor-ligand interactions control human TCR- $\alpha\beta/\gamma\delta$  development by inducing differential notch signal strength. *J. Exp. Med.* (2013) doi:10.1084/jem.20121798.
  82. Mohtashami, M., Shah, D. K., Kianizad, K., Awong, G. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Induction of T-cell development by delta-like 4-expressing fibroblasts. *Int. Immunol.* (2013) doi:10.1093/intimm/dxt027.
  83. Koch, U., Fiorini, E., Benedito, R., Besseyrias, V., Schuster-Gossler, K., Pierres, M., Manley, N., Duarte, A., Macdonald, H.R. & Radtke, F. Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J. Exp. Med.* (2008) doi:10.1084/jem.20080829.
  84. Tu, L. L., Fang, T., Artis, D., Shestova, O., Pross, S., Maillard, I. & Pear, W.S. Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *J. Exp. Med.* (2005) doi:10.1084/jem.20050923.
  85. Bray, S. J. Notch signalling: A simple pathway becomes complex. *Nature Reviews*

- Molecular Cell Biology* (2006) doi:10.1038/nrm2009.
86. Kovall, R. A. More complicated than it looks: Assembly of Notch pathway transcription complexes. *Oncogene* (2008) doi:10.1038/onc.2008.223.
  87. Furriols, M. & Bray, S. A model Notch response element detects suppressor of hairless-dependent molecular switch. *Curr. Biol.* (2001) doi:10.1016/S0960-9822(00)00044-0.
  88. Nam, Y., Sliz, P., Song, L., Aster, J. C. & Blacklow, S. C. Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. *Cell* (2006) doi:10.1016/j.cell.2005.12.037.
  89. Krejčí, A. & Bray, S. Notch activation stimulates transient and selective binding of Su(H)/CSL to target enhancers. *Genes Dev.* (2007) doi:10.1101/gad.424607.
  90. Lai, E. C. Keeping a good pathway down: Transcriptional repression of Notch pathway target genes by CSL proteins. *EMBO Reports* (2002) doi:10.1093/embo-reports/kvf170.
  91. Liefke, R., Oswald, F., Alvarado, C., Ferres-Marco, D., Mittler, G., Rodríguez, P., Dominguez, M. & Borggreffe, T. Histone demethylase KDM5A is an integral part of the core Notch-RBP-J repressor complex. *Genes Dev.* (2010) doi:10.1101/gad.563210.
  92. Fryer, C. J., Lamar, E., Turbachova, I., Kintner, C. & Jones, K. A. Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the notch enhancer complex. *Genes Dev.* (2002) doi:10.1101/gad.991602.
  93. Wallberg, A. E., Pedersen, K., Lendahl, U. & Roeder, R. G. p300 and PCAF Act Cooperatively To Mediate Transcriptional Activation from Chromatin Templates by Notch Intracellular Domains In Vitro. *Mol. Cell. Biol.* (2002) doi:10.1128/mcb.22.22.7812-7819.2002.
  94. Weerkamp, F., van Dongen, J. J. M. & Staal, F. J. T. Notch and Wnt signaling in T-lymphocyte development and acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* (2006) doi:10.1038/sj.leu.2404255.
  95. González-García, S., Garcia-Peydró, M., Martín-Gayo, E., Ballestar, E., Esteller, M., Bornstein, R., De la Pompa, J.L., Ferrando, A.A. & Toribio, M.L. CSL-MAML-dependent Notch1 signaling controls t lineage-specific IL-7R $\alpha$  gene expression in early human thymopoiesis and leukemia. *J. Exp. Med.* (2009) doi:10.1084/jem.20081922.
  96. Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R. & Aguet, M. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* (1999) doi:10.1016/S1074-7613(00)80054-0.
  97. Wilson, A., MacDonald, H. R. & Radtke, F. Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J. Exp. Med.* (2001) doi:10.1084/jem.194.7.1003.
  98. Han, H., Tanigaki, K., Yamamoto, N., Kuroda, K., Yoshimoto, M., Nakahata, T., Ikuta, K. & Honjo, T. Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int. Immunol.* (2002) doi:10.1093/intimm/dxf030.
  99. Koch, U., Lacombe, T.A., Holland, D., Bowman, J.L., Cohen, B.L., Egan, S.E. & Guidos, C.J. Subversion of the T/B lineage decision in the thymus by Lunatic Fringe-mediated inhibition of Notch-1. *Immunity* (2001) doi:10.1016/S1074-7613(01)00189-3.
  100. Maillard, I., Weng, A.P., Carpenter, A., Rodríguez, C., Sai, H., Xu, L., Allman, D., Aster, J.C. & Pear, W.S. *et al.* Mastermind critically regulates Notch-mediated lymphoid cell fate decisions. *Blood* (2004) doi:10.1182/blood-2004-02-0514.

101. De Smedt, M., Hoebeke, I., Reynvoet, K., Leclercq, G. & Plum, J. Different thresholds of Notch signaling bias human precursor cells toward B-, NK-, monocytic/dendritic-, or T-cell lineage in thymus microenvironment. *Blood* (2005) doi:10.1182/blood-2005-02-0496.
102. Maillard, I., Tu, L., Sambandam, A., Ohtani, Y., Millholland, J., Keeshan, K., Shestova, O., Xu, L., Bhandoola, A. & Pear, W.S. The requirement for Notch signaling at the  $\beta$ -selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor. *J. Exp. Med.* (2006) doi:10.1084/jem.20061020.
103. Yun, T. J. & Bevan, M. J. Notch-Regulated Ankyrin-Repeat Protein Inhibits Notch1 Signaling: Multiple Notch1 Signaling Pathways Involved In T Cell Development. *J. Immunol.* (2003) doi:10.4049/jimmunol.170.12.5834.
104. Jarrett, S. M., Seegar, T., Andrews, M., Adelmant, G., Marto, J., Aster, J.C. & Blacklow, S.C. Extension of the Notch intracellular domain ankyrin repeat stack by NRARP promotes feedback inhibition of Notch signaling. *Sci. Signal.* (2019) doi:10.1126/scisignal.aay2369.
105. Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F.G., Bakkour, S., Lee, J.Y., Kadesch, T., Hardy, R.R., Aster, J.C. & Pear, W.S. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* (1999) doi:10.1016/S1074-7613(00)80105-3.
106. Rothenberg, E. V. Negotiation of the T Lineage Fate Decision by Transcription-Factor Interplay and Microenvironmental Signals. *Immunity* (2007) doi:10.1016/j.immuni.2007.06.005.
107. García-Peydró, M., de Yébenes, V. G. & Toribio, M. L. Notch1 and IL-7 Receptor Interplay Maintains Proliferation of Human Thymic Progenitors while Suppressing Non-T Cell Fates. *J. Immunol.* (2006) doi:10.4049/jimmunol.177.6.3711.
108. Hozumi, K., Abe, N., Chiba, S., Hirai, H. & Habu, S. Active Form of Notch Members Can Enforce T Lymphopoiesis on Lymphoid Progenitors in the Monolayer Culture Specific for B Cell Development. *J. Immunol.* (2003) doi:10.4049/jimmunol.170.10.4973.
109. Kreslavsky, T. & von Boehmer, H.  $\gamma\delta$ TCR ligands and lineage commitment. *Seminars in Immunology* (2010) doi:10.1016/j.smim.2010.04.001.
110. Taghon, T. & Rothenberg, E. V. Molecular mechanisms that control mouse and human TCR- $\alpha\beta$  and TCR- $\gamma\delta$  T cell development. *Seminars in Immunopathology* (2008) doi:10.1007/s00281-008-0134-3.
111. Washburn, T., Schweighoffer, E., Gridley, T., Chang, D., Fowlkes, B., Cadi, D. & Robey, E. Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell* (1997).doi:10.1016/s0092-8674(00)81929-7.
112. Ciofani, M., Knowles, G. C., Wiest, D. L., von Boehmer, H. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Stage-Specific and Differential Notch Dependency at the  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T Lineage Bifurcation. *Immunity* (2006) doi:10.1016/j.immuni.2006.05.010.
113. Garbe, A. I., Krueger, A., Gounari, F., Zúñiga-Pflücker, J. C. & Von Boehmer, H. Differential synergy of Notch and T cell receptor signaling determines  $\alpha\beta$  versus  $\gamma\delta$  lineage fate. *J. Exp. Med.* (2006) doi:10.1084/jem.20060474.
114. Tanigaki, K., Tsuji, M., Yamamoto, N., Han, H., Tsukada, J., Inou, H., Kubo, M. & Honjo, T. Regulation of  $\alpha\beta/\gamma\delta$  T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity* (2004) doi:10.1016/S1074-7613(04)00109-8.
115. Ciofani, M., Schmitt, T., Ciofani, A., Michie, A., Cuburu, N., Aublin, A., Maryanski, J. & Zúñiga-Pflucker. Obligatory Role for Cooperative Signaling by Pre-TCR and Notch during Thymocyte Differentiation. *J. Immunol.* (2004)

- doi:10.4049/jimmunol.172.9.5230.
116. De Smedt, M., Reynvoet, K., Kerre, T., Taghon, T., Verhasselt, B., Vandekerckhove, B., Leclercq, G. & Plum, J. Active Form of Notch Imposes T Cell Fate in Human Progenitor Cells. *J. Immunol.* (2002) doi:10.4049/jimmunol.169.6.3021.
  117. García-Peydró, M., De Yébenes, V. G. & Toribio, M. L. Sustained Notch1 signaling instructs the earliest human intrathymic precursors to adopt a  $\gamma\delta$  T-cell fate in fetal thymus organ culture. *Blood* (2003) doi:10.1182/blood-2002-10-3261.
  118. Lin, J., Zhu, Z., Xiao, H., Wakefield, M., Ding, V., Bai, Q. & Fang, Y. The role of IL-7 in immunity and cancer. *Anticancer Research* (2017) doi:10.21873/anticancer.11405.
  119. Murakami, M., Narazaki, M., Hibi, M., Yawata, H., Yasukawa, K., Hamaguchi, M., Taga, T. & Kishimoto, T. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1991) doi:10.1073/pnas.88.24.11349.
  120. Jiang, Q., Li, W., Aiello, F., Mazzucchelli, R., Asefa, B., Khaled, A. & Durum, S. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine and Growth Factor Reviews* (2005) doi:10.1016/j.cytogfr.2005.05.004.
  121. Leonard, W. J. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nature Reviews Immunology* (2001) doi:10.1038/35105066.
  122. Swainson, L., Kinet, S., Mongellaz, C., Sourisseau, M., Henriques, T. & Taylor, N. IL-7-induced proliferation of recent thymic emigrants requires activation of the PI3K pathway. *Blood* (2007) doi:10.1182/blood-2006-06-027912.
  123. Barata, J. T., Silva, A., Brandao, J., Nadler, L.M., Cardoso, A.A. & Boussiotis, V. Activation of PI3K is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *J. Exp. Med.* (2004) doi:10.1084/jem.20040789.
  124. Vicente, R., Swainson, L., Marty-Grés, S., De Barros, S., Kinet, S., Zimmermann, V. & Taylor, N. Molecular and cellular basis of T cell lineage commitment. *Seminars in Immunology* (2010) doi:10.1016/j.smim.2010.04.016.
  125. Mazzucchelli, R. & Durum, S. K. Interleukin-7 receptor expression: Intelligent design. *Nature Reviews Immunology* (2007) doi:10.1038/nri2023.
  126. Grabstein, K. H., Waldschmidt, T.J., Finkelman, F.D., Hess, B.W., Alpert, A.R., Boiani, N.E., Namen, A.E. & Morrissey, P.J. Inhibition of murine B and T lymphopoiesis in vivo by an anti-interleukin 7 monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* (1993) doi:10.1084/jem.178.1.257.
  127. Bhatia, S. K., Tygrett, L. T., Grabstein, K. H. & Waldschmidt, T. J. The effect of in vivo IL-7 deprivation on T cell maturation. *J. Exp. Med.* (1995) doi:10.1084/jem.181.4.1399.
  128. Sudo, T., Nishikawa, S., Ohno, N., Akiyama, N., Tamakoshi, M., Yoshida, H. & Nishikawa, S. Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1993) doi:10.1073/pnas.90.19.9125.
  129. Maki, K., Sunaga, S., Komogata, Y., Kodaira, Y., Mabuchi, A., Karasuyama, H., Yokomuro, K., Miyazaki, J. & Ikuta, K. Interleukin 7 receptor-deficient mice lack gammadelta T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1996). doi:10.1073/pnas.93.14.7172.
  130. Schlenner, S. M., Madan, V., Busch, K., Tietz, A., Laufle, C., Costa, C., Blum, C., Fehling, H. & Rodewald, H. Fate Mapping Reveals Separate Origins of T Cells and Myeloid Lineages in the Thymus. *Immunity* (2010) doi:10.1016/j.immuni.2010.03.005.
  131. Maillard, I., Koch, U., Dumortier, A., Shestova, O., Xu, L., Sai, H., Pross, S., Aster,

- J.C., Bhandoola, A., Radtke, F. & Pear, W.S. Canonical Notch Signaling Is Dispensable for the Maintenance of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* (2008) doi:10.1016/j.stem.2008.02.011.
132. Weng, A. P., Nam, Y., Wolfe, M.S., Pear, W.S., Griffin, J.D., Blacklow, S.C. & Aster, J.C. Growth Suppression of Pre-T Acute Lymphoblastic Leukemia Cells by Inhibition of Notch Signaling. *Mol. Cell. Biol.* (2003) doi:10.1128/mcb.23.2.655-664.2003.
  133. Wang, H., Zang, C., Taing, L., Arnett, K., Wong, Y., Pear, W.S., Blacklow, S.C., Liu, X. & Aster, J.C. NOTCH1-RBPJ complexes drive target gene expression through dynamic interactions with superenhancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2014) doi:10.1073/pnas.1315023111.
  134. DeKoter, R. P., Lee, H. J. & Singh, H. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* (2002) doi:10.1016/S1074-7613(02)00269-8.
  135. Park, J. H., Yu, Q., Erman, B., Appelbaum, J., Montoya-Durango, D., Grimes, H. & Singer, A. Suppression of IL7R $\alpha$  transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: A novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* (2004) doi:10.1016/j.immuni.2004.07.016.
  136. Kim, G. Y., Hong, C. & Park, J.-H. Seeing Is Believing: Illuminating the Source of In Vivo Interleukin-7. *Immune Netw.* (2011) doi:10.4110/in.2011.11.1.1.
  137. Fluor, C., De Milito, A., Fry, T., Vivar, N., Eidsmo, L., Atlas, A., Federici, C., Matarrese, P., Logozzi, M. *et al.* Potential Role for IL-7 in Fas-Mediated T Cell Apoptosis During HIV Infection. *J. Immunol.* (2007) doi:10.4049/jimmunol.178.8.5340.
  138. van Loosdregt, J. & Coffey, P. J. The Role of WNT Signaling in Mature T Cells: T Cell Factor Is Coming Home. *J. Immunol.* (2018) doi:10.4049/jimmunol.1800633.
  139. Staal, F. J. T. & Luis, T. C. Wnt signaling in hematopoiesis: Crucial factors for self-renewal, proliferation, and cell fate decisions. *Journal of Cellular Biochemistry* (2010) doi:10.1002/jcb.22467.
  140. Xu, M., Sharma, A., Wiest, D. L. & Sen, J. M. Pre-TCR-Induced  $\beta$ -Catenin Facilitates Traversal through  $\beta$ -Selection. *J. Immunol.* (2009) doi:10.4049/jimmunol.182.2.751.
  141. Yamasaki, S. & Saito, T. Molecular basis for pre-TCR-mediated autonomous signaling. *Trends in Immunology*. (2007) doi:10.1016/j.it.2006.11.006.
  142. Michie, A. M. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Regulation of thymocyte differentiation: Pre-TCR signals and  $\beta$ -selection. *Semin. Immunol.* (2002) doi:10.1016/S1044-5323(02)00064-7.
  143. Panigada, M., Porcellini, S., Barbier, E., Hoeflinger, S., Cazenave, P., Gu, H., Band, H., von Boehmer, H. & Grassi, F. Constitutive endocytosis and degradation of the pre-T cell receptor. *J. Exp. Med.* (2002) doi:10.1084/jem.20020047.
  144. Norment, A. M., Forbush, K. A., Nguyen, N., Malissen, M. & Perlmutter, R. M. Replacement of pre-T cell receptor signaling functions by the CD4 coreceptor. *J. Exp. Med.* (1997) doi:10.1084/jem.185.1.121.
  145. Balagopalan, L., Kortum, R. L., Coussens, N. P., Barr, V. A. & Samelson, L. E. The linker for activation of T Cells (LAT) signaling hub: From signaling complexes to microclusters. *Journal of Biological Chemistry*. (2015) doi:10.1074/jbc.R115.665869.
  146. López-Rodríguez, C., Aramburu, J. & Berga-Bolaños, R. Transcription factors and target genes of pre-TCR signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* (2015) doi:10.1007/s00018-015-1864-8.
  147. Juntilla, M. M., Wofford, J. A., Birnbaum, M. J., Rathmell, J. C. & Koretzky, G. A.

- Akt1 and Akt2 are required for  $\alpha\beta$  thymocyte survival and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2007) doi:10.1073/pnas.0705285104.
148. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. & Greenberg, M.E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell.* (1999) doi:10.1016/S0092-8674(00)80595-4.
  149. Sue Goo Rhee & Yun Soo Bae. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *Journal of Biological Chemistry.* (1997) doi:10.1074/jbc.272.24.15045.
  150. Berga-Bolaños, R., Alberdi, M., Buxadé, M., Aramburu, J. & López-Rodríguez, C. NFAT5 induction by the pre-T-cell receptor serves as a selective survival signal in T-lymphocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2013) doi:10.1073/pnas.1215934110.
  151. Kortum, R. L., Rouquette-Jazdanian, A. K. & Samelson, L. E. Ras and extracellular signal-regulated kinase signaling in thymocytes and T cells. *Trends in Immunology.* (2013) doi:10.1016/j.it.2013.02.004.
  152. Koltsova, E. K., Ciofani, M., Benezra, R., Miyazaki, T., Clipstone, N., Zúñiga-Pflucker, J.C. & Wiest, D. Early Growth Response 1 and NF-ATc1 Act in Concert to Promote Thymocyte Development beyond the  $\beta$ -Selection Checkpoint. *J. Immunol.* (2007) doi:10.4049/jimmunol.179.7.4694.
  153. Wolfer, A., Wilson, A., Nemir, M., MacDonald, H. R. & Radtke, F. Inactivation of Notch1 impairs VDJ $\beta$  rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early  $\alpha\beta$  lineage thymocytes. *Immunity.* (2002) doi:10.1016/S1074-7613(02)00330-8.
  154. Ciofani, M. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Notch promotes survival of pre-T cells at the  $\beta$ -selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nat. Immunol.* (2005) doi:10.1038/ni1234.
  155. Weng, A. P., Millholland, J., Ohtani, Y., Arcangeli, M., Lau, A., Wai, C., Del Bianco, C., Rodríguez, C., Sai, H. *et al.* c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev.* (2006) doi:10.1101/gad.1450406.
  156. Deftos, M. L., Huang, E., Ojala, E. W., Forbush, K. A. & Bevan, M. J. Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes. *Immunity.* (2000) doi:10.1016/S1074-7613(00)00009-1.
  157. Von Freeden-Jeffry, U., Solvason, N., Howard, M. & Murray, R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity.* (1997) doi:10.1016/S1074-7613(00)80517-8.
  158. Akashi, K., Kondo, M., Von Freeden-Jeffry, U., Murray, R. & Weissman, I. L. Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in Interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell.* (1997) doi:10.1016/S0092-8674(00)80291-3.
  159. Yu, Q., Erman, B., Bhandoola, A., Sharrow, S. O. & Singer, A. In vitro evidence that cytokine receptor signals are required for differentiation of double positive thymocytes into functionally mature CD8 + T cells. *J. Exp. Med.* (2003) doi:10.1084/jem.20021765.
  160. Yu, Q., Erman, B., Park, J. H., Feigenbaum, L. & Singer, A. IL-7 receptor signals inhibit expression of transcription factors TCF-1, LEF-1, and ROR $\gamma$ t: Impact on thymocyte development. *J. Exp. Med.* (2004) doi:10.1084/jem.20032183.
  161. Yu, Q., Park, J., Doan, L., Erman, B., Feigenbaum, L. & Singer, A. Cytokine signal transduction is suppressed in preselection double-positive thymocytes and restored by positive selection. *J. Exp. Med.* (2006) doi:10.1084/jem.20051836.
  162. Park, J. H., Adoro, S., Guintier, T., Erman, B., Alag, A., Catalfamo, M., Kimura, M.,



- Cui, Y. *et al.* Signaling by intrathymic cytokines, not T cell antigen receptors, specifies CD8 lineage choice and promotes the differentiation of cytotoxic-lineage T cells. *Nat. Immunol.* (2010) doi:10.1038/ni.1840.
163. Ma, A., Koka, R. & Burkett, P. DIVERSE FUNCTIONS OF IL-2, IL-15, AND IL-7 IN LYMPHOID HOMEOSTASIS. *Annu. Rev. Immunol.* (2006) doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090727.
  164. Ganter, B. & Lipsick, J. S. Myb and oncogenesis. *Adv. Cancer Res.* (1999) doi:10.1016/s0065-230x(08)60773-3.
  165. Oh, I. H. & Reddy, E. P. The myb gene family in cell growth, differentiation and apoptosis. *Oncogene.* (1999) doi:10.1038/sj.onc.1202839.
  166. Nomura, T., Sakai, N., Sarai, A., Sudo, T., Kanei-Ishii, C., Ramsay, R.G., Favier, D., Gonda, T.J., Ishii, S. Negative autoregulation of c-Myb activity by homodimer formation through the leucine zipper. *J. Biol. Chem.* (1993). 268:21914-21923.
  167. Baker, S. J., Kumar, A. & Reddy, E. P. p89c-Myb is not required for fetal or adult hematopoiesis. *Genesis.* (2010) doi:10.1002/dvg.20619.
  168. Brown, R. B., Madrid, N. J., Suzuki, H. & Ness, S. A. Optimized approach for Ion Proton RNA sequencing reveals details of RNA splicing and editing features of the transcriptome. *PLoS One* .(2017) doi:10.1371/journal.pone.0176675.
  169. Gewirtz, A. M. & Calabretta, B. A c-myb antisense oligodeoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis in vitro. *Science* . (1988) doi:10.1126/science.2461588.
  170. Mucenski, M. L., McLain, K., Kier, A.B., Swerdlow, S.H., Schreiner, C., Miller, T., Pietryga, D., Scott, W. & Potter, S. A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* .(1991) doi:10.1016/0092-8674(91)90099-K.
  171. Allen, R. D., Bender, T. P. & Siu, G. c-Myb is essential for early T cell development. *Genes Dev.* (1999) doi:10.1101/gad.13.9.1073.
  172. Lieu, Y. K. & Reddy, E. P. Conditional c-myb knockout in adult hematopoietic stem cells leads to loss of self-renewal due to impaired proliferation and accelerated differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2009) doi:10.1073/pnas.0907623106.
  173. Shikatani, E. A., Chandy, M., Besla, R., Li, C., Momen, A., El-Mounayri, O., Robbins, C. & Husain, M. c-Myb Regulates Proliferation and Differentiation of Adventitial Sca1+ Vascular Smooth Muscle Cell Progenitors by Transactivation of Myocardin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2016) doi:10.1161/ATVBAHA.115.307116.
  174. Westin, E. H., Wong-Staal, F., Gelmann, E.P., Dalla-Favera, R., Papas, T.S., Lautenberger, J.A., Eva, A., Reddy, E.P. *et al.* Expression of cellular homologues of retroviral onc genes in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1982) doi:10.1073/pnas.79.8.2490.
  175. Yanagisawa, H., Nagasawa, T., Kuramochi, S., Abe, T., Ikawa, Y. & Todokoro, K. Constitutive expression of exogenous C-Myb gene causes maturation block in monocyte-macrophage differentiation. *BBA - Gene Struct. Expr.* (1991) doi:10.1016/0167-4781(91)90128-9.
  176. Bender, T. P., Kremer, C. S., Kraus, M., Buch, T. & Rajewsky, K. Critical functions for c-Myb at three checkpoints during thymocyte development. *Nat. Immunol.* (2004) doi:10.1038/ni1085.
  177. Gimferrer, I., Hu, T., Simmons, A., Wang, C., Souabni, A., Busslinger, M., Bender, T., Hernández-Hoyos, G. & Alberola-Ila, J. Regulation of GATA-3 Expression during CD4 Lineage Differentiation. *J. Immunol.* (2011) doi:10.4049/jimmunol.1003505.
  178. Maurice, D., Hooper, J., Lang, G. & Weston, K. c-Myb regulates lineage choice in developing thymocytes via its target gene Gata3. *EMBO J.* (2007)

- doi:10.1038/sj.emboj.7601801.
179. Hu, T., Simmons, A., Yuan, J., Bender, T. P. & Alberola-Ila, J. The transcription factor c-Myb primes CD4 + CD8 + immature thymocytes for selection into the iNKT lineage. *Nat. Immunol.* (2010) doi:10.1038/ni.1865.
  180. Churilla, A. M., Braciale, T. J. & Braciale, V. L. Regulation of T lymphocyte proliferation. Interleukin 2-mediated induction of c-myb gene expression is dependent on T lymphocyte activation state. *J. Exp. Med.* (1989) doi:10.1084/jem.170.1.105.
  181. Ito, Y. RUNX Genes in Development and Cancer: Regulation of Viral Gene Expression and the Discovery of RUNX Family Genes. *Advances in Cancer Research*. (2008) doi:10.1016/S0065-230X(07)99002-8.
  182. De Bruijn, M. & Dzierzak, E. Runx transcription factors in the development and function of the definitive hematopoietic system. *Blood*. (2017) doi:10.1182/blood-2016-12-689109.
  183. Huang, G., Shigesada, K., Ito, K., Wee, H., Yokomizo, T. & Ito, Y. Dimerization with PEBP2 $\beta$  protects RUNX1/AML1 from ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *EMBO J.* (2001) doi:10.1093/emboj/20.4.723.
  184. Tripathi, R. K., Mathieu, N., Spicuglia, S., Payet, D., Verthuy, C., Bouvier, G., Depetris, D., Mattei, M.G., Hmpel, W.M. & Ferrier, P. Definition of a T-Cell Receptor beta Gene Core Enhancer of V(D)J Recombination by Transgenic Mapping. *Mol. Cell. Biol.* (2000) doi:10.1128/mcb.20.1.42-53.2000.
  185. Busse, C. E., Krotkova, A. & Eichmann, K. The TCR $\beta$  Enhancer Is Dispensable for the Expression of Rearranged TCR $\beta$  Genes in Thymic DN2/DN3 Populations but Not at Later Stages. *J. Immunol.* (2005) doi:10.4049/jimmunol.175.5.3067.
  186. Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J. R. & Grosschedl, R. 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) doi:10.1101/gad.9.8.995.
  187. Wotton, D., Ghysdael, J., Wang, S., Speck, N. A. & Owen, M. J. Cooperative binding of Ets-1 and core binding factor to DNA. *Mol. Cell. Biol.* (1994) doi:10.1128/mcb.14.1.840.
  188. Hollenhorst, P. C., Shah, A. A., Hopkins, C. & Graves, B. J. Genome-wide analyses reveal properties of redundant and specific promoter occupancy within the ETS gene family. *Genes Dev.* (2007) doi:10.1101/gad.1561707.
  189. Hernandez-Munain, C. & Krangel, M. S. Regulation of the T-cell receptor delta enhancer by functional cooperation between c-Myb and core-binding factors. *Mol. Cell. Biol.* (1994) doi:10.1128/mcb.14.1.473.
  190. Hernandez-Munain, C. & Krangel, M. S. 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) doi:10.1128/mcb.15.6.3090.
  191. Hsiang, Y. H., Spencer, D., Wang, S., Speck, N. A. & Raulet, D. H. The role of viral enhancer 'core' motif-related sequences in regulating T cell receptor-gamma and -delta gene expression. *J. Immunol.* (1993).doi:10.1128/mcb.20.1.42-53.2000
  192. Nieke, S., Yasmin, N., Kakugawa, K., Yokomizo, T., Muroi, S. & Taniuchi, I. Unique N-terminal sequences in two Runx1 isoforms are dispensable for Runx1 function. *BMC Dev. Biol.* (2017) doi:10.1186/s12861-017-0156-y.
  193. Challen, G. A. & Goodell, M. A. Runx1 isoforms show differential expression patterns during hematopoietic development but have similar functional effects in adult hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* (2010) doi:10.1016/j.exphem.2010.02.011.
  194. Bee, T., Liddiard, K., Swiers, G., Bickley, S.R.B., Vink, C., Jarrat, A., Hughes, J.R., Medvinsky, A. & de Bruijn, M. Alternative Runx1 promoter usage in mouse

- developmental hematopoiesis. *Blood Cells, Mol. Dis.* (2009) doi:10.1016/j.bcmd.2009.03.011.
195. Draper, J. E., Sroczynska, P., Tsoulaki, O., Leong, H.S., Fadlullah, M., Miller, C., Kouskoff, V. & Lacaud, G. RUNX1B Expression Is Highly Heterogeneous and Distinguishes Megakaryocytic and Erythroid Lineage Fate in Adult Mouse Hematopoiesis. *PLoS Genet.* (2016) doi:10.1371/journal.pgen.1005814.
  196. Taniuchi, I., Sunshine, M. J., Festenstein, R. & Littman, D. R. Evidence for distinct CD4 silencer functions at different stages of thymocyte differentiation. *Mol. Cell.* (2002) doi:10.1016/S1097-2765(02)00735-9.
  197. Egawa, T., Tillman, R. E., Naoe, Y., Taniuchi, I. & Littman, D. R. The role of the Runx transcription factors in thymocyte differentiation and in homeostasis of naive T cells. *J. Exp. Med.* (2007) doi:10.1084/jem.20070133.
  198. Belle, I. & Zhuang, Y. E proteins in lymphocyte development and lymphoid diseases. in *Current Topics in Developmental Biology*. (2014). doi:10.1016/B978-0-12-405943-6.00004-X.
  199. Sawada, S. & Littman, D. R. A heterodimer of HEB and an E12-related protein interacts with the CD4 enhancer and regulates its activity in T-cell lines. *Mol. Cell. Biol.* (1993) doi:10.1128/mcb.13.9.5620.
  200. Kee, B. L. E and ID proteins branch out. *Nature Reviews Immunology*. (2009) doi:10.1038/nri2507.
  201. Ohtani, Y., He, Y., Ohtani, T., Jones, M., Shestova, O., Xu, L., Fang, T., Chiang, M., Pear, W.S. *et al.* Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A. *Genes Dev.* (2009) doi:10.1101/gad.1793709.
  202. Takeuchi, A., Yamasaki, S., Takase, K., Nakatsu, F., Arase, H., Onodera, M. & Saito, T. E2A and HEB Activate the Pre-TCR $\alpha$  Promoter During Immature T Cell Development. *J. Immunol.* (2001) doi:10.4049/jimmunol.167.4.2157.
  203. Xu, W., Carr, T., Ramírez, K., McGregor, S., Sigvardsson, M. & Kee, B. E2A transcription factors limit expression of Gata3 to facilitate T lymphocyte lineage commitment. *Blood*. (2013) doi:10.1182/blood-2012-08-449447.
  204. Kim, D., Peng, X.-C. & Sun, X.-H. Massive Apoptosis of Thymocytes in T-Cell-Deficient Id1 Transgenic Mice. *Mol. Cell. Biol.* (1999) doi:10.1128/mcb.19.12.8240.
  205. Engel, I. & Murre, C. E2A proteins enforce a proliferation checkpoint in developing thymocytes. *EMBO J.* (2004) doi:10.1038/sj.emboj.7600017.
  206. Wojciechowski, J., Lai, A., Kondo, M. & Zhuang, Y. E2A and HEB Are Required to Block Thymocyte Proliferation Prior to Pre-TCR Expression. *J. Immunol.* (2007) doi:10.4049/jimmunol.178.9.5717.
  207. Bain, G., Engel, I., Maandag, E.C., te Riele, H.P., Volland, J.R., Sharp, L.L., Chun, J., Huey, B., Pinkel, D. & Murre, C. E2A deficiency leads to abnormalities in alphabeta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol. Cell. Biol.* (1997) doi:10.1128/mcb.17.8.4782.
  208. Yan, W., Young, A.Z., Soares, V.C., Kelley, R., Benezra, R. & Zhuang, Y. High incidence of T-cell tumors in E2A-null mice and E2A/Id1 double-knockout mice. *Mol. Cell. Biol.* (1997) doi:10.1128/mcb.17.12.7317.
  209. Jones, M. E. & Zhuang, Y. Stage-specific functions of E-proteins at the  $\beta$ -selection and T-cell receptor checkpoints during thymocyte development. *Immunologic Research*. (2011) doi:10.1007/s12026-010-8182-x.
  210. Jones-Mason, M. E., Zhao, X., Kappes, D., Lasorella, A., Iavarone, A. & Zhuang, Y. E Protein Transcription Factors Are Required for the Development of CD4 + Lineage T Cells. *Immunity*. (2012) doi:10.1016/j.immuni.2012.02.010.
  211. Heemskerk, M. H. M., Blom, B., Nolan, G., Stegmann, A.P., Bakker, A.Q., Weijer,

- K., Res, P.C. & Spits, H. Inhibition of T cell and promotion of natural killer cell development by the dominant negative helix loop helix factor Id3. *J. Exp. Med.* (1997) doi:10.1084/jem.186.9.1597.
212. Roy, S. & Zhuang, Y. Orchestration of invariant natural killer T cell development by E and id proteins. *Crit. Rev. Immunol.* (2015) doi:10.1615/CritRevImmunol.2015012207.
  213. Roy, S., Moore, A., Love, C., Reddy, A., Rajagopalan, D., Dave, S., Li, L., Murre, C. & Zhuang, Y. Id proteins suppress E2A-driven invariant natural killer T cell development prior to TCR selection. *Front. Immunol.* (2018) doi:10.3389/fimmu.2018.00042.
  214. Cotres, M., Wong, E., Koipally, J. & Georgopoulos, K. Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Curr. Opin. Immunol.* (1999) doi:10.1016/S0952-7915(99)80028-4.
  215. Schmitt, C., Tonnelle, C., Dalloul, A., Chabannon, C., Debré, P. & Rebollo, A. Aiolos and Ikaros: Regulators of lymphocyte development, homeostasis and lymphoproliferation. *Apoptosis.* (2002) doi:10.1023/A:1015372322419.
  216. Perdomo, J., Holmes, M., Chong, B. & Crossley, M. Eos and Pegasus, two members of the Ikaros family of proteins with distinct DNA binding activities. *J. Biol. Chem.* (2000) doi:10.1074/jbc.M005457200.
  217. Schjerven, H., McLaughlin, J., Arenzana, T., Frieze, S., Cheng, D., Wadsworth, S., Lawson, G., Bensinger, S. *et al.* Selective regulation of lymphopoiesis and leukemogenesis by individual zinc fingers of Ikaros. *Nat. Immunol.* (2013) doi:10.1038/ni.2707.
  218. Sun, L., Liu, A. & Georgopoulos, K. Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J.* (1996) doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00920.x.
  219. Mitchell, J. L., Seng, A. & Yankee, T. M. Expression and splicing of Ikaros family members in murine and human thymocytes. *Mol. Immunol.* (2017) doi:10.1016/j.molimm.2017.03.014.
  220. Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J.H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S. & Sharpe, A. *et al.* The ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell.* (1994) doi:10.1016/0092-8674(94)90407-3.
  221. Wang, J. H., Nichogiannopoulou, A., Wu, L., Sun, L., Sharpe, A.H., Bigby & M., Georgopoulos, K. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity.* (1996) doi:10.1016/S1074-7613(00)80269-1.
  222. Tinsley, K. W., Hong, C., Luckey, M.A., Park, J., Kim, G., Yoon, H., Keller, H., Sacks, A., Feigenbaum, L. & Park, J. Ikaros is required to survive positive selection & to maintain clonal diversity during T-cell development in the thymus. *Blood.* (2013) doi:10.1182/blood-2012-12-472076.
  223. Le Lay, A. S. G., Oravecz, A., Mastio, J., Jung, C., Marchal, P., Ebel, C., Dembélé, D., Jost, B. *et al.* The tumor suppressor Ikaros shapes the repertoire of Notch target genes in T cells. *Sci. Signal.* (2014) doi:10.1126/scisignal.2004545.
  224. Kleinmann, E., Geimer Le Lay, A.-S., Sellars, M., Kastner, P. & Chan, S. Ikaros Represses the Transcriptional Response to Notch Signaling in T-Cell Development. *Mol. Cell. Biol.* (2008) doi:10.1128/mcb.00715-08.
  225. Xiong, J., Armato, M. A. & Yankee, T. M. Immature single-positive CD8+ thymocytes represent the transition from Notch-dependent to Notch-independent T-cell development. *Int. Immunol.* (2011) doi:10.1093/intimm/dxq457.
  226. Van Der Meer, L. T., Jansen, J. H. & Van Der Reijden, B. A. Gfi1 and Gfi1b: Key

- regulators of hematopoiesis. *Leukemia*. (2010) doi:10.1038/leu.2010.195.
227. Phelan, J. D., Saba, I., Zeng, H., Kosan, C., Messer, M.S., Andre-Olsson, H., Fraszczak, J., Hildeman, D.A., Aronow, B.J., Moroy, T. & Grimes, H.L. Growth factor independent-1 Maintains Notch1-Dependent Transcriptional Programming of Lymphoid Precursors. *PLoS Genet*. (2013) doi:10.1371/journal.pgen.1003713.
  228. Shi, L. Z., Saravia, J., Zeng, H., Kalupahana, N., Guy, C., Neale, G. & Chi, H. Gfi1-Foxo1 axis controls the fidelity of effector gene expression and developmental maturation of thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*(2017) doi:10.1073/pnas.1617669114.
  229. Suzuki, J., Maruyama, S., Tamauchi, H., Kuwahara, M., Horiuchi, M., Mizuki, M., Ochi, M., Sawasaki, T. *et al.* Gfi1, a transcriptional repressor, inhibits the induction of the T helper type 1 programme in activated CD4 T cells. *Immunology*.(2016) doi:10.1111/imm.12580.
  230. Schmitt, T. M., Ciofani, M., Petrie, H. T. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent Notch receptor-ligand interactions. *J. Exp. Med.* (2004) doi:10.1084/jem.20040394.
  231. Taghon, T. N., David, E. S., Zúñiga-Pflücker, J. C. & Rothenberg, E. V. Delayed, asynchronous, and reversible T-lineage specification induced by Notch/Delta signaling. *Genes Dev.* (2005) doi:10.1101/gad.1298305.
  232. Rothenberg, E. V. Programming for T-lymphocyte fates: Modularity and mechanisms. *Genes and Development*. (2019) doi:10.1101/gad.327163.119.
  233. García-Ojeda, M. E., Wolterink, R.G., Lemaitre, F., Richard-Le Goff, O., Hasan, M., Hendriks, R., Cumano, A. & Di Santo, J.P. GATA-3 promotes T-cell specification by repressing B-cell potential in pro-T cells in mice. *Blood*.(2013) doi:10.1182/blood-2012-06-440065.
  234. Scripture-Adams, D. D., Damle, S.S., Li, L., Elihu, K.J., Qin, S., Arias, A.M., Butler, R., Champhekar, A., Zhang, J.A. & Rothenberg, E.V. GATA-3 Dose-Dependent Checkpoints in Early T Cell Commitment. *J. Immunol.*(2014) doi:10.4049/jimmunol.1301663.
  235. Ikawa, T., Hirose, S., Masuda, K., Kakugawa, K., Satoh, R., Shibano-Satoh, A., Kominami, R., Katsura, Y. & Kawamoto, H. An essential developmental checkpoint for production of the T cell lineage. *Science* . (2010) doi:10.1126/science.1188995.
  236. Van De Walle, I., De Smet, G., Gartner, M., De Smedt, M., Waegemans, E., Vandekerckhove, B., Leclercq, G., Plum, J., Aster, J.C., Bernstein, I.D., Guidos, C.J., Kyewski, B. & Taghon, T. Jagged2 acts as a Delta-like Notch ligand during early hematopoietic cell fate decisions. *Blood* .(2011) doi:10.1182/blood-2010-06-290049.
  237. Ikawa, T., Kawamoto, H., Goldrath, A. W. & Murre, C. E proteins and Notch signaling cooperate to promote T cell lineage specification and commitment. *J. Exp. Med.* (2006) doi:10.1084/jem.20060268.
  238. Wang, D., Claus, C.L., Vaccarelli, G., Braunstein, M., Schmitt, T., Zúñiga-Pflucker, J.C., Rothenberg, E.V. & Anderson, M.K. The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor HEBA1 Is Expressed in Pro-T Cells and Enhances the Generation of T Cell Precursors. *J. Immunol.* (2006) doi:10.4049/jimmunol.177.1.109.
  239. Rani, A., Greenlaw, R., Smith, R. A. & Galustian, C. HES1 in immunity and cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. (2016) doi:10.1016/j.cytogfr.2016.03.010.
  240. Tomita, K., Hattori, M., Nakamura, E., Nakanishi, S., Minato, S. & Kageyama, R. The bHLH gene *Hes1* is essential for expansion of early T cell precursors. *Genes Dev.* (1999) doi:10.1101/gad.13.9.1203.
  241. Kaneta, M., Osawa, M., Sudo, K., Nakauchi, H., Farr, A.G. & Takahama, Y. A Role for Pref-1 and HES-1 in Thymocyte Development. *J. Immunol.*(2000)

- doi:10.4049/jimmunol.164.1.256.
242. Wendorff, A. A., Koch, U., Wunderlich, F.T., Wirth, S., Dubey, C., Bruning, J.C. & MacDonald, H.R. Hes1 is a critical but context-dependent mediator of canonical notch signaling in lymphocyte development and transformation. *Immunity*.(2010) doi:10.1016/j.immuni.2010.11.014.
  243. Kunisato, A., Chiba, S., nakagami-Yamaguchi, E., Kumano, K., Saito, T., Masuda, S., Yamaguchi, T., Osawa, M. *et al.* HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells *ex vivo* and accumulates side population cells *in vivo*. *Blood*.(2003) doi:10.1182/blood-2002-07-2051.
  244. Murata, K., Hattori, M., Hirai, N., Shinozuka, Y., Hirata, H., Kageyama, R., Sakai, T. & Minato, N. Hes1 Directly Controls Cell Proliferation through the Transcriptional Repression of p27Kip1. *Mol. Cell. Biol.* (2005)doi:10.1128/mcb.25.10.4262-4271.2005.
  245. Wong, G. W., Knowles, G. C., Mak, T. W., Ferrando, A. A. & Zúñiga-Pflücker, J. C. HES1 opposes a PTEN-dependent check on survival, differentiation, and proliferation of TCR $\beta$ -selected mouse thymocytes. *Blood*. (2012) doi:10.1182/blood-2011-12-395319.
  246. Allen, R. D., Kim, H. K., Sarafova, S. D. & Siu, G. Negative Regulation of CD4 Gene Expression by a HES-1-c-Myb Complex. *Mol. Cell. Biol.* (2001) doi:10.1128/mcb.21.9.3071-3082.2001.
  247. Shibata, K., Yamada, H., Sato, T., Dejima, T., Nakamura, M., Ikawa, T., Hara, H., Yamasaki, S *et al.* Notch-Hes1 pathway is required for the development of IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells. *Blood*. (2011) doi:10.1182/blood-2011-02-334995.
  248. De Obaldia, M. E., Bell, J., Wang, X., Harly, C., Ohtani, Y., DeLong, J., Zlotoff, D., Sultana, D.A., Pear, W.S. & Bhandoola, A. T cell development requires constraint of the myeloid regulator C/EBP- $\alpha$  by the Notch target and transcriptional repressor Hes1. *Nat. Immunol.* (2013) doi:10.1038/ni.2760.
  249. Tiemessen, M. M., Baert, M.R., Schonewille, T., Brugman, M.H., Famili, F., Salvatori, D.C., Meijerink, J.P., Ozbek, U., Clevers, H., van Dongen, J. & Staal, F.T. The Nuclear Effector of Wnt-Signaling, Tcf1, Functions as a T-Cell-Specific Tumor Suppressor for Development of Lymphomas. *PLoS Biol.*(2012) doi:10.1371/journal.pbio.1001430.
  250. Germar, K., Dose, M., Konstantinou, T., Zhang, J., Wang, H., Lobry, C., Arnett, K.L., Blacklow, S., Aifantis, I., Aster, J.C. & Gounari, F. T-cell factor 1 is a gatekeeper for T-cell specification in response to Notch signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2011) doi:10.1073/pnas.1110230108.
  251. Verbeek, S., Izon, D., Hofhuis, F., Maandag, E., Riele, H., Van de Watering, M., Oosterwegel, M., Wilson, A. *et al.* An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* .(1995) doi:10.1038/374070a0.
  252. Van Genderen, C., Okamura, R.M., Fariñas, I., Quo, R.G., Parslow, T.G., Brhun, L. & Grosschedl. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev.* (1994) doi:10.1101/gad.8.22.2691.
  253. Weber, B. N., Chi, A.W., Chavez, A., Ohtani, Y., Yang, Q., Shestova, O. & Bhandoola, A. A critical role for TCF-1 in T-lineage specification and differentiation. *Nature* .(2011) doi:10.1038/nature10279.
  254. Yu, S., Zhou, X., Steinke, F.C., Liu, C., Chen, S., Zagorodna, O., Jing, X., Yokota, Y. *et al.* The TCF-1 and LEF-1 Transcription Factors Have Cooperative and Opposing Roles in T Cell Development and Malignancy. *Immunity*. (2012) doi:10.1016/j.immuni.2012.08.009.

255. Okamura, R. M., Sigvardsson, M., Galceran, J., Verbeek, S., Clevers, H. & Grosschedl, R. Redundant regulation of T cell differentiation and TCR $\alpha$  gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity*.(1998) doi:10.1016/S1074-7613(00)80454-9.
256. Johnson, J. L., Georgakilas, G., Petrovic, J., Kurachi, M., Cai, S., Harly, C., Pear, W.S., Bhandoola, A., Wherry, E.J. & Vahedi, G. Lineage-Determining Transcription Factor TCF-1 Initiates the Epigenetic Identity of T Cells. *Immunity*.(2018) doi:10.1016/j.immuni.2018.01.012.
257. Emmanuel, A. O., Arnovitz, S., Haghi, L., Mathur, P.S., Mondal, S., Quandt, J., Okoreeh, M.K., Maienschein-Cline, M., Khazaie, K., Dose, M. & Gounari, F. TCF-1 and HEB cooperate to establish the epigenetic and transcription profiles of CD4 + CD8 + thymocytes. *Nat. Immunol.* (2018) doi:10.1038/s41590-018-0254-4.
258. Xing, S., Li, F., Zeng, Z., Zhao, Y., Yu, S., Shan, Q., Li, Y., Phillips, F. *et al.* Tcf1 and Lef1 transcription factors establish CD8+ T cell identity through intrinsic HDAC activity. *Nat. Immunol.* (2016) doi:10.1038/ni.3456.
259. Jeevan-Raj, B., Gehrig, J., Charmoy, M., Chnnupati, V., Grandclément, C., Angelino, P., Delorenzi, M. & Held, W. The Transcription Factor Tcf1 Contributes to Normal NK Cell Development and Function by Limiting the Expression of Granzymes. *Cell Rep.* (2017) doi:10.1016/j.celrep.2017.06.071.
260. Merika, M. & Orkin, S. H. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* (1993) doi:10.1128/mcb.13.7.3999.
261. Oosterwegel, M., Timmerman, J., Clevers, H. & Leiden, J. Expression of Gata-3 During Lymphocyte Differentiation and Mouse Embryogenesis. *Dev. Immunol.* (1992) doi:10.1155/1992/27903.
262. Samson, S. I., Richard, O., Tavian, M., Ranson, T., Vosshenrich, C.A., Colucci, J., Buer, J., Grosveld, F., Godín, I. & Di Santo, J. GATA-3 promotes maturation, IFN- $\gamma$  production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity*.(2003) doi:10.1016/S1074-7613(03)00294-2.
263. Pandolfi, P. P., Roth, M.E., Karis, A., Leonard, M.W., Dzierzak, E., Grosveld, F.G., Engel, J.D. & Lindenbaum, M.H. Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat. Genet.* (1995) doi:10.1038/ng0995-40.
264. Ting, C. N., Olson, M. C., Barton, K. P. & Leiden, J. M. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature*.(1996) doi:10.1038/384474a0.
265. Taghon, T., De Smedt, M., Stolz, F., Cnockaert, M., Plum, J. & Leclercq, G. Enforced Expression of GATA-3 Severely Reduces Human Thymic Cellularity. *J. Immunol.* (2001) doi:10.4049/jimmunol.167.8.4468.
266. Hendriks, R. W., Nawijn, M.C., Engel, J.D., van Doorninck, H., Grosveld, F. & Karis, A. 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) doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199906)29:06<1912::AID-IMMU1912>3.0.CO;2-D.
267. Pai, S. Y., Truitt, M.L., Ting, C., Leiden, J.M., Glimcher, L.H. & Ho, C. Critical Roles for Transcription Factor GATA-3 in Thymocyte Development. *Immunity*. (2003) doi:10.1016/S1074-7613(03)00328-5.
268. Hernández-Hoyos, G., Anderson, M. K., Wang, C., Rothenberg, E. V. & Alberola-Ila, J. GATA-3 expression is controlled by TCR signals and regulates CD4/CD8 differentiation. *Immunity* .(2003) doi:10.1016/S1074-7613(03)00176-6.
269. Zheng, W. P. & Flavell, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and

- sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*.(1997) doi:10.1016/S0092-8674(00)80240-8.
270. Nakata, Y., Brignier, A., Jin, S., Shen, Y., Rudnick, S., Sugita, M. & Gewirtz, A.M. c-Myb, Menin, GATA-3, and MLL form a dynamic transcription complex that plays a pivotal role in human T helper type 2 cell development. *Blood*.(2010) doi:10.1182/blood-2009-05-223255.
  271. Nakata, Y., Jin, S., Shen, Y. & Gewirtz, A. M. GATA-3 Requires C-Myb to Auto-Regulate Its Own Expression in Normal Human Peripheral Blood Lymphocytes Undergoing T Helper Type 2 (Th2) Cell Development. *Blood*.(2008) doi:10.1182/blood.v112.11.2575.2575.
  272. Kominami, R. Role of the transcription factor Bcl11b in development and lymphomagenesis. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*. (2012) doi:10.2183/pjab.88.72.
  273. Li, P., Burke, S., Wang, J., Chen, X., Ortiz, M., Lee, S., Lu, D., Campos, L. *et al*. Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. *Science*. (2010) doi:10.1126/science.1188063.
  274. Liu, P., Li, P. & Burke, S. Critical roles of Bcl11b in T-cell development and maintenance of T-cell identity. *Immunol. Rev.* (2010) doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00953.x.
  275. Kueh, H. Y., Yui, M.A., Ng, K., Pease, S., Zhang, J., Damle, S., Freedman, G., Rothenberg, E.V. *et al*. Asynchronous combinatorial action of four regulatory factors activates Bcl11b for T cell commitment. *Nat. Immunol.* (2016) doi:10.1038/ni.3514.
  276. Wang, D., Claus, C.L., Rajkumar, P., Braunstein, M., Moore, A.J., Sigvardsson & Anderson, M.K. Context-Dependent Regulation of Hematopoietic Lineage Choice by HEBAlT. *J. Immunol.* (2010) doi:10.4049/jimmunol.0901783.
  277. Braunstein, M. & Anderson, M. K. HEB in the spotlight: Transcriptional regulation of T-cell specification, commitment, and developmental plasticity. *Clinical and Developmental Immunology* .(2012) doi:10.1155/2012/678705.
  278. Rothenberg, E. V., Hosokawa, H. & Ungerback, J. Mechanisms of action of hematopoietic transcription factor PU.1 in initiation of T-cell development. *Front. Immunol.* (2019) doi:10.3389/fimmu.2019.00228.
  279. David-Fung, E. S., Yui, M., Morales, M., Wang, H., Taghon, T., Diamond, R. & Rothenberg, E.V. Progression of regulatory gene expression states in fetal and adult pro-T-cell development. *Immunological Reviews*. (2006) doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00355.x.
  280. Del Real, M. M. & Rothenberg, E. V. Architecture of a lymphomyeloid developmental switch controlled by PU.1, notch and Gata3. *Dev.* (2013) doi:10.1242/dev.088559.
  281. Carotta, S., Dakic, A., D'Amico, A., Pang, S.H., Greig, K., Nutt, S. & Wu, L. The transcription factor PU.1 controls dendritic cell development and Flt3 cytokine receptor expression in a dose-dependent manner. *Immunity*.(2010) doi:10.1016/j.immuni.2010.05.005.
  282. Thoms, J. A. I., Beck, D. & Pimanda, J. E. Transcriptional networks in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes and Cancer* .(2019) doi:10.1002/gcc.22794.
  283. Schmidt, L., Heyes, E., Scheiblecker, L., Eder, T., Volpe, G., Frampton, J., Nerlov, C., Valent, P., Grembecka, J. & Grebien, F. CEBPA-mutated leukemia is sensitive to genetic and pharmacological targeting of the MLL1 complex. *Leukemia*.(2019) doi:10.1038/s41375-019-0382-3.
  284. Leutz, A., Pless, O., Lappe, M., Dittmar, G. & Kowenz-Leutz, E. Crosstalk between phosphorylation and multi-site arginine/lysine methylation in C/EBPs. *Transcription*.



- (2011) doi:10.4161/trns.2.1.13510.
285. Cirovic, B., Schonheit, J., Kowenz-Leutz, E., Ivanovska, J., Klement, C., Pronina, N., Bégay, V. & Leutz, A. C/EBP-Induced Transdifferentiation Reveals Granulocyte-Macrophage Precursor-like Plasticity of B Cells. *Stem Cell Reports*.(2017) doi:10.1016/j.stemcr.2016.12.015.
  286. Avellino, R. & Delwel, R. Expression and regulation of C/EBP $\alpha$  in normal myelopoiesis and in malignant transformation. *Blood*.(2017) doi:10.1182/blood-2016-09-687822.
  287. Villarino, A., Laurence, A., Robinson, G., Bonelli, M., Dema, B., Afzali, B., Shih, H., Sun, H., Brooks, S. *et al.* Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) paralog dose governs T cell effector and regulatory functions. *Elife*.(2016) doi:10.7554/eLife.08384.
  288. Wang, Y. & Levy, D. E. Comparative evolutionary genomics of the STAT family of transcription factors. *JAK-STAT*. (2012) doi:10.4161/jkst.19418.
  289. Rani, A. & Murphy, J. J. STAT5 in Cancer and Immunity. *J. Interf. Cytokine Res*. (2016) doi:10.1089/jir.2015.0054.
  290. Heltemes-Harris, L. M., Willette, M. J. L., Vang, K. B. & Farrar, M. A. The role of STAT5 in the development, function, and transformation of B and T lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2011) doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05907.x.
  291. Kanai, T., Seki, S., Jenks, J., Kohli, A., Kawli, T., Martin, D.P., Snyder, M., Bacchetta, R. & Nadeau, K. Identification of STAT5A and STAT5B target genes in human T cells. *PLoS One*. (2014) doi:10.1371/journal.pone.0086790.
  292. Buitenhuis, M., Coffey, P. J. & Koenderman, L. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. (2004) doi:10.1016/j.biocel.2003.11.008.
  293. Farrar, M. A. & Owen, D. L. STAT5 and CD4<sup>+</sup> T Cell Immunity. *F1000Research*. (2017) doi:10.12688/f1000research.9838.1.
  294. Maki, K., Sunaga, S. & Ikuta, K. The V-J recombination of T cell receptor- $\gamma$  genes is blocked in interleukin-7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* (1996) doi:10.1084/jem.184.6.2423.
  295. Candéias, S., Peschon, J. J., Muegge, K. & Durum, S. K. Defective T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangement in interleukin-7 receptor knockout mice. in *Immunology Letters*. (1997). doi:10.1016/S0165-2478(97)00062-X.
  296. Kang, J., Coles, M. & Raulet, D. H. Defective development of  $\gamma/\delta$  T cells in interleukin 7 receptor- deficient mice is due to impaired expression of T cell receptor  $\gamma$  genes. *J. Exp. Med.* (1999) doi:10.1084/jem.190.7.973.
  297. Xi, H., Schwartz, R., Engel, I., Murre, C. & Kersh, G. J. Interplay between ROR $\gamma$ t, Egr3, and E Proteins Controls Proliferation in Response to Pre-TCR Signals. *Immunity*. (2006) doi:10.1016/j.immuni.2006.03.023.
  298. Li, Z., Dordai, D. I., Lee, J. & Desiderio, S. A conserved degradation signal regulates RAG-2 accumulation during cell division and links V(D)J recombination to the cell cycle. *Immunity* .(1996) doi:10.1016/S1074-7613(00)80272-1.
  299. Kim, D., Xu, M., Nie, L., Peng, X., Jimi, E., Voll, R., Nguyen, T., Ghosh, S. & Sun, X. Helix-loop-helix proteins regulate pre-TCR and TCR signaling through modulation of Rel/NF- $\kappa$ B activities. *Immunity* (2002) doi:10.1016/S1074-7613(02)00264-9.
  300. Macian, F. NFAT proteins: Key regulators of T-cell development and function. *Nature Reviews Immunology* (2005) doi:10.1038/nri1632.
  301. Aifantis, I., Gounari, F., Scorrano, L., Borowski, C. & Von Boehmer, H. Constitutive pre-TCR signaling promotes differentiation through Ca<sup>2+</sup> mobilization and activation

- of NF- $\kappa$ B and NFAT. *Nat. Immunol.* (2001) doi:10.1038/87704.
302. Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes and Development.* (2003) doi:10.1101/gad.1102703.
  303. Canté-Barrett, K., Winslow, M. M. & Crabtree, G. R. Selective Role of NFATc3 in Positive Selection of Thymocytes. *J. Immunol.* (2007) doi:10.4049/jimmunol.179.1.103.
  304. Bueno, O. F., Brandt, E. B., Rothenberg, M. E. & Molkentin, J. D. Defective T cell development and function in calcineurin A $\beta$ -deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2002) doi:10.1073/pnas.152665399.
  305. Neilson, J. R., Winslow, M. M., Hur, E. M. & Crabtree, G. R. Calcineurin B1 is essential for positive but not negative selection during thymocyte development. *Immunity.* (2004) doi:10.1016/S1074-7613(04)00052-4.
  306. Oukka, M., Ho, I.C., de la Brousse, F.C., Hoey, T., Grusby, M.J. & Glimcher, L.H. The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity* .(1998) doi:10.1016/S1074-7613(00)80612-3.
  307. Yoshida, H., Nishina, H., Takimoto, H., Merengère, L.E., Wakeham, A.C., Bouchard, D., Kong, Y., Ohteki, T. *et al.* The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity.*(1998) doi:10.1016/S1074-7613(00)80464-1.
  308. Hayden-Martinez, K., Kane, L. P. & Hedrick, S. M. Effects of a Constitutively Active Form of Calcineurin on T Cell Activation and Thymic Selection. *J. Immunol.* (2000) doi:10.4049/jimmunol.165.7.3713.
  309. López-Rodríguez, C., Aramburu, J., Rakeman, A. S. & Rao, A. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1999) doi:10.1073/pnas.96.13.7214.
  310. Patra, A. K., Avots, A., Zahedi, R.P., Schuler, T., Sickmann, A., Bommhardt, U. & Serfling. An alternative NFAT-activation pathway mediated by IL-7 is critical for early thymocyte development. *Nat. Immunol.* (2013) doi:10.1038/ni.2507.
  311. Taefeshokr, S., Key, Y. A., Khakpour, M., Dadebighlu, P. & Oveisi, A. Early growth response 2 and Egr3 are unique regulators in immune system. *Central European Journal of Immunology* .(2017) doi:10.5114/ceji.2017.69363.
  312. Poirier, R. Distinct functions of Egr gene family members in cognitive processes. *Front. Neurosci.* (2008) doi:10.3389/neuro.01.002.2008.
  313. Carleton, M., Haks, M., Smeele, S.A.A., Jones, A., Belkowski, S., Berger, M., Linsley, P., Kruisbeek, A. & Wiest, D.L. Early Growth Response Transcription Factors Are Required for Development of CD4 – CD8 – Thymocytes to the CD4 + CD8 + Stage . *J. Immunol.* (2002) doi:10.4049/jimmunol.168.4.1649.
  314. del Blanco, B., García-Mariscal, A., Wiest, D. L. & Hernández-Munain, C. Tcr Enhancer Activation by Inducible Transcription Factors Downstream of Pre-TCR Signaling . *J. Immunol.* (2012) doi:10.4049/jimmunol.1100271.
  315. 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) doi:10.1084/jem.186.6.877.
  316. Xi, H. & Kersh, G. J. Early Growth Response Gene 3 Regulates Thymocyte Proliferation during the Transition from CD4 – CD8 – to CD4 + CD8 +1 . *J. Immunol.* (2004) doi:10.4049/jimmunol.172.2.964.
  317. Lawson, V. J., Weston, K. & Maurice, D. Early growth response 2 regulates the survival of thymocytes during positive selection. *Eur. J. Immunol.* (2010) doi:10.1002/eji.200939567.

318. Carter, J. H., Lefebvre, J. M., Wiest, D. L. & Tourtellotte, W. G. Redundant Role for Early Growth Response Transcriptional Regulators in Thymocyte Differentiation and Survival. *J. Immunol.* (2007) doi:10.4049/jimmunol.178.11.6796.
319. Li, S., Symonds, A., Zhu, B., Liu, M., Raymond, M., Miao, T. & Wang, P. Early growth response gene-2 (*egr-2*) regulates the development of b and t cells. *PLoS One.* (2011) doi:10.1371/journal.pone.0018498.
320. Rutz, S., Eidenschenk, C., Kiefer, J. R. & Ouyang, W. Post-translational regulation of ROR $\gamma$ t—A therapeutic target for the modulation of interleukin-17-mediated responses in autoimmune diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews.*(2016) doi:10.1016/j.cytogfr.2016.07.004.
321. Guo, Y., Maclsaac, K.D., Chen, Y., Miller, R.J., Jain, R., Joyce-Shaikh, B., Ferguson, H., Wang, I. *et al.* Inhibition of ROR $\gamma$ T Skews TCR $\alpha$  Gene Rearrangement and Limits T Cell Repertoire Diversity. *Cell Rep.* (2016) doi:10.1016/j.celrep.2016.11.073.
322. Sun, Z., Unutmaz, D., Zou, R., Sunshine, M.J., Pierani, A., Brenner-Morton, S., Mebius, R.E. & Littman, D.R. Requirement for ROR $\gamma$  in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* . (2000) doi:10.1126/science.288.5475.2369.
323. Bezbradica, J. S., Hill, T., Stanic, A. K., Van Kaer, L. & Joyce, S. Commitment toward the natural T (iNKT) cell lineage occurs at the CD4 +8+ stage of thymic ontogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2005) doi:10.1073/pnas.0408449102.
324. Sawa, S., Lochner, M., Takayama, N., Dulauroy, S., Bérard, M., Kleinschek, M., Cua, D., Di Santo, J. & Eberl, G. ROR $\gamma$ t+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nat. Immunol.* (2011) doi:10.1038/ni.2002.
325. Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mac, K., Pauli, F., Agarwall, A., Huang, W. *et al.* A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell.* (2012) doi:10.1016/j.cell.2012.09.016.
326. Nunomura, S., Sato, T. & Habu, S. Molecular Basis for Functional Maturation of Thymocytes: Increase in c- fos Translation with Positive Selection . *J. Immunol.* (2000) doi:10.4049/jimmunol.164.11.5590.
327. Johnson, R. S., Van Lingen, B., Papaioannou, V. E. & Spiegelman, B. M. A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev.* (1993) doi:10.1101/gad.7.7b.1309.
328. Chen, J., Stewart, V., Spyrou, G., Hilberg, F., Wagner, E. & Alt, F. Generation of normal T and B lymphocytes by c-jun deficient embryonic stem cells. *Immunity.* (1994) doi:10.1016/1074-7613(94)90010-8.
329. Riera-Sans, L. & Behrens, A. Regulation of  $\alpha\beta/\gamma\delta$  T Cell Development by the Activator Protein 1 Transcription Factor c-Jun. *J. Immunol.* (2007) doi:10.4049/jimmunol.178.9.5690.
330. Rincon, M. & Flavell, R. A. Regulation of AP-1 and NFAT transcription factors during thymic selection of T cells. *Mol. Cell. Biol.* (1996) doi:10.1128/mcb.16.3.1074.
331. Gerondakis, S., Fulford, T. S., Messina, N. L. & Grumont, R. J. NF- $\kappa$ B control of T cell development. *Nature Immunology.* (2014) doi:10.1038/ni.2785.
332. Cauchy, P., Maqbool, M., Zacarias-Cabeza, J., Vanhille, L., Koch, F., Fenouil, R., Gut, M. & Gut, I. Dynamic recruitment of Ets1 to both nucleosome-occupied and -depleted enhancer regions mediates a transcriptional program switch during early T-cell differentiation. *Nucleic Acids Res.* (2016) doi:10.1093/nar/gkv1475.
333. Zamisch, M., Tian, L., Grenningloh, R., Xiong, Y., Wildt, K., Ehlers, M., Ho, I. & Bosselut, R. The transcription factor Ets1 is important for CD4 repression and Runx3

- up-regulation during CD8 T cell differentiation in the thymus. *J. Exp. Med.* (2009) doi:10.1084/jem.20092024.
334. Wucherpfennig, K. W., Gagnon, E., Call, M. J., Huseby, E. S. & Call, M. E. Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* (2010) doi:10.1101/cshperspect.a005140.
  335. Birnbaum, M. E., Berry, R., Hsiao, Y., Chen, Z., Shingu-Vazquez, M.A., Yu, X., Waghray, D. & Fischer, S. Molecular architecture of the  $\alpha\beta$  T cell receptor-CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2014) doi:10.1073/pnas.1420936111.
  336. Kuhns, M. S., Davis, M. M. & Garcia, K. C. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity.* (2006) doi:10.1016/j.immuni.2006.01.006.
  337. Cobb, R. M., Oestreich, K. J., Osipovich, O. A. & Oltz, E. M. Accessibility Control of V(D)J Recombination. *Advances in Immunology.* (2006) doi:10.1016/S0065-2776(06)91002-5.
  338. Glusman, G., Rowen, L., Lee, I., Boysen, C., Roach, J.C., Smit, A.F., Wang, K., Koop, B.F. & Hood, L. Comparative genomics of the human and mouse T cell receptor loci. *Immunity.* (2001) doi:10.1016/S1074-7613(01)00200-X.
  339. Fischer, C., Bouneau, L., Ozouf-Costaz, C., Crnogorac-Jurcevic, T., Weissenbach, J. & Bernot, A. Conservation of the T-cell receptor  $\alpha/\delta$  linkage in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis*. *Genomics.* (2002) doi:10.1006/geno.2002.6688.
  340. Koop, B. F., Rowen, L., Wang, K., Kuo, C.L., Seto, D., Lenstra, J.A., Howard, S., Shan, W., Deshpande, P. & Hood, L. The human T-cell Receptor TRAC/TCRDC (*Ca/Cdelta*;) region: Organization, sequence, and evolution of 97.6 kb of dna. *Genomics.* (1994) doi:10.1006/geno.1994.1097.
  341. Kubota, T., Wang, J., Gobel, T.W., Hockett, R.D., Cooper, M.D. & Chen, C.H. Characterization of an avian (*Gallus gallus domesticus*) TCR alpha delta gene locus. *J. Immunol.* (1999).163:3858-3866.
  342. Tani-Ichi, S., Satake, M. & Ikuta, K. Activation of the mouse TCR $\gamma$  enhancers by STAT5. *Int. Immunol.* (2009) doi:10.1093/intimm/dxp073.
  343. Majumder, K., Rupp, L.J., Yang-lott, K.S., Koues, O.I., Kyle, K.E., Bassing, C.H. & Oltz, E.M. Domain-Specific and Stage-Intrinsic Changes in *Tcrb* Conformation during Thymocyte Development. *J. Immunol.* (2015) doi:10.4049/jimmunol.1500692.
  344. Little, A. J., Matthews, A., Oettinger, M., Roth, D. B. & Schatz, D. G. The Mechanism of V(D)J Recombination. in *Molecular Biology of B Cells: Second Edition.* (2015). doi:10.1016/B978-0-12-397933-9.00002-3.
  345. Warmflash, A., Weigert, M. & Dinner, A. R. Control of Genotypic Allelic Inclusion through TCR Surface Expression. *J. Immunol.* (2005) doi:10.4049/jimmunol.175.10.6412.
  346. Vettermann, C. & Schlissel, M. S. Allelic exclusion of immunoglobulin genes: Models and mechanisms. *Immunological Reviews.* (2010) doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00935.x.
  347. Yancopoulos, G. D. & Alt, F. W. Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell.* (1985) doi:10.1016/0092-8674(85)90141-2.
  348. García-Mariscal, A., del Blanco, B. & Hernández-Munain, C. Generación de diversidad de los receptores de antígeno en linfocitos: validación del «modelo de accesibilidad» en el control de la recombinación V(D)J. *Inmunología.* (2013) doi:10.1016/j.inmuno.2012.07.003.
  349. Carico, Z. & Krangel, M. S. Chromatin Dynamics and the Development of the TCR $\alpha$

- and TCR $\delta$  Repertoires. in *Advances in Immunology*. (2015). doi:10.1016/bs.ai.2015.07.005.
350. Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C. & Baltimore, D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*. (1990) doi:10.1126/science.2360047.
  351. Schlissel, M., Constantinescu, A., Morrow, T., Baxter, M. & Peng, A. Double-strand signal sequence breaks in V(D)J recombination are blunt, 5'-phosphorylated, RAG-dependent, and cell cycle regulated. *Genes Dev*. (1993) doi:10.1101/gad.7.12b.2520.
  352. Liu, Y., Subrahmanyam, R., Chakraborty, T., Sen, R. & Desiderio, S. A Plant Homeodomain in Rag-2 that Binds Hypermethylated Lysine 4 of Histone H3 Is Necessary for Efficient Antigen-Receptor-Gene Rearrangement. *Immunity*.(2007) doi:10.1016/j.immuni.2007.09.005.
  353. Matthews, A. G., Kuo, A.J., Ramón-Maiques, S., Han, S., Champagne, K.S., Ivanov, D., Gallardo, M., Carney, D. *et al*. RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature*. (2007) doi:10.1038/nature06431.
  354. Schatz, D. G. & Ji, Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nature Reviews Immunology* .(2011) doi:10.1038/nri2941.
  355. Ji, Y., Resch, W., Corbett, E., Yamane, A., Casellas, R. & Schatz, D. The in vivo pattern of binding of RAG1 and RAG2 to antigen receptor loci. *Cell*.(2010) doi:10.1016/j.cell.2010.03.010.
  356. Morshead, K. B., Ciccone, D. N., Taverna, S. D., Allis, C. D. & Oettinger, M. A. 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) doi:10.1073/pnas.1932643100.
  357. Johnson,, Pflugh, D., Yu, D., Hesslein, D., Lin, K., Bothwell, A., Thomas-Tikhonenko, A., Schatz, D. & Calame, K. B cell-specific loss of histone 3 lysine 9 methylation in the VH locus depends on Pax5. *Nat. Immunol.* (2004) doi:10.1038/ni1099.
  358. McMurry, M. T. & Krangel, M. S. A role for histone acetylation in the developmental regulation of VDJ recombination [see comments]. *Science*. (2000).doi:10.1126/science.287.5452.495.
  359. Kwon, J., Morshead, K. B., Guyon, J. R., Kingston, R. E. & Oettinger, M. A. Histone acetylation and hSWI/SNF remodeling act in concert to stimulate V(D)J cleavage of nucleosomal DNA. *Mol. Cell* .(2000) doi:10.1016/S1097-2765(00)00102-7.
  360. Patenge, N., Elkin, S. K. & Oettinger, M. A. ATP-dependent remodeling by SWI/SNF and ISWI proteins stimulates V(D)J cleavage of 5 S arrays. *J. Biol. Chem*. (2004) doi:10.1074/jbc.M405790200.
  361. Osipovich, O., Cobb, R.M., Oestreich, K.J., Pierce, S., Ferrier, P. & Oltz, E.M. Essential function for SWI-SNF chromatin-remodeling complexes in the promoter-directed assembly of Tcrb genes. *Nat. Immunol.* (2007) doi:10.1038/ni1481.
  362. Pulivarthy, S. R., Lion, M., Kuzu, G., Matthews, A., Borowsky, M., Morris, J., Kingston, R. & Dennis, J. Regulated large-scale nucleosome density patterns and precise nucleosome positioning correlate with V(D)J recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2016) doi:10.1073/pnas.1605543113.
  363. Abarrategui, I. & Krangel, M. S. Regulation of T cell receptor-alpha gene recombination by transcription. *Nat. Immunol.* (2006) doi:10.1038/ni1379.
  364. Schwabish, M. A. & Struhl, K. Asf1 Mediates Histone Eviction and Deposition during Elongation by RNA Polymerase II. *Mol. Cell*. (2006) doi:10.1016/j.molcel.2006.03.014.
  365. Sikes, M. L., Meade, A., Tripathi, R., Krangel, M. S. & Oltz, E. M. Regulation of V(D)J recombination: A dominant role for promoter positioning in gene segment

- accessibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2002) doi:10.1073/pnas.182166699.
366. Oestreich, K. J., Cobb, R.M., Pierce, S., Chen, J., Ferrier, P. & Oltz, E.M. Regulation of TCR $\beta$  Gene Assembly by a Promoter/Enhancer Holocomplex. *Immunity.*(2006) doi:10.1016/j.immuni.2006.02.009.
  367. Spicuglia, S., Kumar, S., Yeh, J., Vachez, E., Chasson, L., Gorbach, S., Cautres, J. & Ferrier, P. Promoter activation by enhancer-dependent and -independent loading of activator and coactivator complexes. *Mol. Cell.*(2002) doi:10.1016/S1097-2765(02)00791-8.
  368. Schlingens, R. J., Reddy, K. L., Singh, H. & Krangel, M. S. Initiation of allelic exclusion by stochastic interaction of Tcrb alleles with repressive nuclear compartments. *Nat. Immunol.* (2008) doi:10.1038/ni.1624.
  369. Zhang, Y., Zhang, X., Ba, Z., Liang, Z., Dring, E., Hu, H., Lou, J., Kyritsis, N. *et al.* The fundamental role of chromatin loop extrusion in physiological V(D)J recombination. *Nature.* (2019) doi:10.1038/s41586-019-1547-y.
  370. Lin, S. G., Ba, Z., Alt, F. W. & Zhang, Y. RAG Chromatin Scanning During V(D)J Recombination and Chromatin Loop Extrusion are Related Processes. in *Advances in Immunology.* (2018). doi:10.1016/bs.ai.2018.07.001.
  371. Munain, C. H. Insights into the Transcriptional Regulation of the Unrearranged and Rearranged Tcra and Tcrd Genes. *J. Clin. Cell. Immunol.* (2016) doi:10.4172/2155-9899.1000415.
  372. Hernández-Munain, C., Sleckman, B. P. & Krangel, M. S. A developmental switch from TCR $\delta$  enhancer to TCR $\alpha$  enhancer function during thymocyte maturation. *Immunity.* (1999) doi:10.1016/S1074-7613(00)80071-0.
  373. Sleckman, B. P., Bardon, C. G., Ferrini, R., Davidson, L. & Alt, F. W. Function of the TCR alpha enhancer in alphabeta and gammadelta T cells. *Immunity* .(1997).doi:10.1016/s1074-7613(00)80372-6.
  374. Monroe, R. J., Sleckman, B., Monroe, B.C., Khor, B., Claypool, S., Ferrini, R., Davidson, L. & Alt, F.W. Developmental regulation of TCR $\delta$  locus accessibility and expression by the TCR $\delta$  enhancer. *Immunity.* (1999) doi:10.1016/S1074-7613(00)80050-3.
  375. Shih, H.-Y. & Krangel, M. S. Chromatin Architecture, CCCTC-Binding Factor, and V(D)J Recombination: Managing Long-Distance Relationships at Antigen Receptor Loci. *J. Immunol.* (2013) doi:10.4049/jimmunol.1300218.
  376. Hawwari, A., Bock, C. & Krangel, M. S. Regulation of T cell receptor  $\alpha$  gene assembly by a complex hierarchy of germline J $\alpha$  promoters. *Nat. Immunol.* (2005) doi:10.1038/ni1189.
  377. Abarrategui, I. & Krangel, M. S. Noncoding transcription controls downstream promoters to regulate T-cell receptor  $\alpha$  recombination. *EMBO J.* (2007) doi:10.1038/sj.emboj.7601866.
  378. Hawwari, A. & Krangel, M. S. Regulation of TCR  $\delta$  and  $\alpha$  repertoires by local and long-distance control of variable gene segment chromatin structure. *J. Exp. Med.* (2005) doi:10.1084/jem.20050680.
  379. Carico, Z. M., Roy Choudhury, K., Zhang, B., Zhuang, Y. & Krangel, M. S. Tcrd Rearrangement Redirects a Processive Tcra Recombination Program to Expand the Tcra Repertoire. *Cell Rep.* (2017) doi:10.1016/j.celrep.2017.05.045.
  380. Shih, H. Y., Verma-Gaur, J., Torkamani, A., Feeney, A.J., Galjart, N. & Krangel, M.S. Tcra gene recombination is supported by a Tcra enhancer- and CTCF-dependent chromatin hub. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2012) doi:10.1073/pnas.1214131109.
  381. Ji, Y., Little, A., Banerjee, J., Hao, B., Oltz, E.M., Krangel, M.S. & Schatz, D. Promoters, enhancers, and transcription target RAG1 binding during V(D)J

- recombination. *J. Exp. Med.* (2010) doi:10.1084/jem.20101136.
382. Hawwari, A. & Krangel, M. S. Role for rearranged variable gene segments in directing secondary T cell receptor  $\alpha$  recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2007) doi:10.1073/pnas.0608248104.
  383. Shih, H. Y. & Krangel, M. S. Distinct contracted conformations of the Tcr $\alpha$ /Tcr $\delta$  locus during Tcr $\alpha$  and Tcr $\delta$  recombination. *J. Exp. Med.* (2010) doi:10.1084/jem.20100772.
  384. Chen, L., Carico, Z., Shih, H. Y. & Krangel, M. S. A discrete chromatin loop in the mouse Tcr $\alpha$ -Tcr $\delta$  locus shapes the TCR $\delta$  and TCR $\alpha$  repertoires. *Nat. Immunol.* (2015) doi:10.1038/ni.3232.
  385. Loguercio, S., Barajas-Mora, E. M., Shih, H. Y., Krangel, M. S. & Feeney, A. J. Variable extent of lineage-specificity and developmental stage-specificity of cohesin and CCCTC-binding factor binding within the immunoglobulin and cell receptor loci. *Front. Immunol.* (2018) doi:10.3389/fimmu.2018.00425.
  386. Ye, S. K., Maki, K., Kitamura, T., Sunaga, S., Akashi, K., Domen, J., Weissman, I.L., Honjo, T. & Ikuta, K. Induction of germline transcription in the TCR $\gamma$  locus by Stat5: Implications for accessibility control by the IL-7 receptor. *Immunity.* (1999) doi:10.1016/S1074-7613(00)80096-5.
  387. Masui, N., Tani-ichi, S., Maki, K. & Ikuta, K. Transcriptional activation of mouse TCR J $\gamma$ 4 germline promoter by STAT5. *Mol. Immunol.* (2008) doi:10.1016/j.molimm.2007.06.157.
  388. Ye, S. K., Agata, Y., Lee, H., Kurooka, H., Kitamura, T., Shimizu, A., Honjo, T., Ikuta, K. The IL-7 receptor controls the accessibility of the TCR $\gamma$  locus by Stat5 and histone acetylation. *Immunity.* (2001) doi:10.1016/S1074-7613(01)00230-8.
  389. Lee, H.-C., Ye, S.-K., Honjo, T. & Ikuta, K. Induction of Germline Transcription in the Human TCR $\gamma$  Locus by STAT5. *J. Immunol.* (2001) doi:10.4049/jimmunol.167.1.320.
  390. Ferrero, I., Mancini, S., Grosjean, F., Wilson, A., Otten, L. & MacDonald, H. TCR $\gamma$  Silencing during  $\alpha\beta$  T Cell Development Depends upon Pre-TCR-Induced Proliferation. *J. Immunol.* (2006) doi:10.4049/jimmunol.177.9.6038.
  391. Tani-ichi, S., Satake, M. & Ikuta, K. The pre-TCR signal induces transcriptional silencing of the TCR $\gamma$  locus by reducing the recruitment of STAT5 and Runx to transcriptional enhancers. *Int. Immunol.* (2011) doi:10.1093/intimm/dxr055.
  392. Rodríguez-Caparrós, A., García, V., Casal, Á., López-Ros, J., García-Mariscal, A., Tani-Ichi, S., Ikuta, K. & Hernández-Munain, C. Notch Signaling Controls Transcription via the Recruitment of RUNX1 and MYB to Enhancers during T Cell Development. *J. Immunol.* (2019) doi:10.4049/jimmunol.1801650.
  393. Brady, B. L., Steinel, N. C. & Bassing, C. H. Antigen Receptor Allelic Exclusion: An Update and Reappraisal. *J. Immunol.* (2010) doi:10.4049/jimmunol.1001158.
  394. Chan, E. A. W., Teng, G., Corbett, E., Choudhury, R., Bassing, C., Schatz, D. & Krangel, M.S. Peripheral subnuclear positioning suppresses Tcrb recombination and segregates Tcrb alleles from RAG2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2013) doi:10.1073/pnas.1310846110.
  395. Chen, S., Luperchio, T., Wong, X., Doan, E., Byrd, A., Choudhury, K., Reddy, K. & Krangel, M.S. A Lamina-Associated Domain Border Governs Nuclear Lamina Interactions, Transcription, and Recombination of the Tcrb Locus. *Cell Rep.* (2018) doi:10.1016/j.celrep.2018.10.052.
  396. Erman, B., Feigenbaum, L., Coligan, J. E. & Singer, A. Early tcr $\alpha$  expression generates tcr $\alpha\gamma$  complexes that signal the dn-to-dp transition and impair development. *Nat. Immunol.* (2002) doi:10.1038/ni800.

397. Del Blancoa, B., Angulo, Ú., Krangel, M. S. & Hernández-Munain, C. T-cell receptor  $\alpha$  enhancer is inactivated in  $\alpha\beta$  T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2015) doi:10.1073/pnas.1406551112.
398. Taniuchi, I. & Ellmeier, W. Transcriptional and epigenetic regulation of CD4/CD8 lineage choice. in *Advances in Immunology* (2011). doi:10.1016/B978-0-12-387663-8.00003-X.
399. Redondo, J. M., Hata, S., Brocklehurst, C. & Krangel, M. S. A T cell-specific transcriptional enhancer within the human T cell receptor  $\delta$  locus. *Science.* (1990) doi:10.1126/science.2156339.
400. Lauzurica, P. & Krangel, M. S. 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).doi:10.1084/jem.179.6.1913.
401. Lauzurica, P. & Krangel, M. S. Enhancer-dependent and -independent steps in the rearrangement of a human T cell receptor  $\delta$  transgene. *J. Exp. Med.* (1994) doi:10.1084/jem.179.1.43.
402. Redondo, J. M., Pfohl, J. L. & Krangel, M. S. Identification of an essential site for transcriptional activation within the human T-cell receptor delta enhancer. *Mol. Cell. Biol.* (1991) doi:10.1128/mcb.11.11.5671.
403. Hernández-Munain, C., Lauzurica, P. & Krangel, M. S. Regulation of T cell receptor delta gene rearrangement by c-Myb. *J. Exp. Med.* (1996).doi:10.1084/jem.183.1.289.
404. Lauzurica, P., Zhong, X. P., Krangel, M. S. & Roberts, J. L. Regulation of T cell receptor  $\delta$  gene rearrangement by CBF/PEBP2. *J. Exp. Med.* (1997) doi:10.1084/jem.185.7.1193.
405. Hernández-Munain, C. & Krangel, M. S. 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) doi:10.4049/jimmunol.169.8.4362.
406. Roberts, J. L., Lauzurica, P. & Krangel, M. S. Developmental regulation of VDJ recombination by the core fragment of the T cell receptor  $\alpha$  enhancer. *J. Exp. Med.* (1997) doi:10.1084/jem.185.1.131.
407. Zhong, X. P., Carabaña, J. & Krangel, M. S. 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) doi:10.1073/pnas.96.21.11970.
408. Kappes, D. J., Browne, C. P. & Tonegawa, S. Identification of a T-cell-specific enhancer at the locus encoding T-cell antigen receptor  $\gamma$  chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1991) doi:10.1073/pnas.88.6.2204.
409. Baker, J. E., Kang, J., Xiong, N., Chen, T., Cado, D. & Raulet, D. A novel element upstream of the V $\gamma$ 2 gene in the murine T cell receptor  $\gamma$  locus cooperates with the 3' enhancer to act as a locus control region. *J. Exp. Med.* (1999) doi:10.1084/jem.190.5.669.
410. Xiong, N., Kang, C. & Raulet, D. H. Redundant and unique roles of two enhancer elements in the TCR $\gamma$  locus in gene regulation and  $\gamma\delta$  T cell development. *Immunity.* (2002) doi:10.1016/S1074-7613(02)00285-6.
411. Hsiang, Y. H. H., Goldman, J. P. & Raulet, D. H. The role of c-myb or a related factor in regulating the T cell receptor  $\gamma$  gene enhancer. *J. Immunol.* (1995).154:5195-5204.
412. Hettmann, T. & Cohen, A. Identification of an ionomycin/cyclosporin A - responsive element within the human T cell receptor gamma enhancer. *Eur. J. Immunol.* (1995) doi:10.1002/eji.1830251223.
413. Ho, I. C., Yang, L. H., Morle, G. & Leiden, J. M. 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) doi:10.1073/pnas.86.17.6714.
414. Winoto, A. & Baltimore, D. A novel, inducible and T cell-specific enhancer located at the 3' end of the T cell receptor alpha locus. *EMBO J.* (1989) doi:10.1002/j.1460-2075.1989.tb03432.x.
  415. Hernandez-Munain, C., Roberts, J. L. & Krangel, M. S. Cooperation among Multiple Transcription Factors Is Required for Access to Minimal T-Cell Receptor  $\alpha$ -Enhancer Chromatin In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* (1998) doi:10.1128/mcb.18.6.3223.
  416. Spicuglia, S. TCRalpha enhancer activation occurs via a conformational change of a pre-assembled nucleo-protein complex. *EMBO J.* (2000) doi:10.1093/emboj/19.9.2034.
  417. del Blanco, B., Roberts, J. L., Zamarreño, N., Balmelle-Devaux, N. & Hernández-Munain, C. Flexible Stereospecific Interactions and Composition within Nucleoprotein Complexes Assembled on the TCR $\alpha$  Gene Enhancer. *J. Immunol.* (2009) doi:10.4049/jimmunol.0803351.
  418. Collins, B., Clambey, E.T., Scott- Browne, E., White, J., Marrack, P., Hagman, J. & Kappler, J. Ikaros promotes rearrangement of TCR  $\alpha$  genes in an Ikaros null thymoma cell line. *Eur. J. Immunol.* (2013) doi:10.1002/eji.201242757.
  419. Giese, K., Cox, J. & Grosschedl, R. The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell.* (1992) doi:10.1016/0092-8674(92)90129-Z.
  420. Ho, I. C., Bhat, N.K., Gottschalk, L., Lindsten, T., Thompson, C., Papas, T. & Leiden, J.M. Sequence-specific binding of human Ets-1 to the T cell receptor  $\alpha$  gene enhancer. *Science* . (1990) doi:10.1126/science.2237431.
  421. Mayall, T. P., Sheridan, P. L., Montminy, M. R. & Jones, K. A. Distinct roles for P-CREB and LEF-1 in TCR $\alpha$  enhancer assembly and activation on chromatin templates in vitro. *Genes Dev.* (1997) doi:10.1101/gad.11.7.887.
  422. Travis, A., Amsterdam, A., Belanger, C. & Grosschedl, R. LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific with protein, an HMG domain, regulates T-cell receptor  $\alpha$  enhancer function. *Genes Dev.* (1991) doi:10.1101/gad.5.5.880.
  423. Waterman, M. L., Fischer, W. H. & Jones, K. A. A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor  $\alpha$  enhancer. *Genes Dev.* (1991) doi:10.1101/gad.5.4.656.
  424. Balmelle, N., Zamarreño, N., Krangel, M. S. & Hernández-Munain, C. Developmental Activation of the TCR  $\alpha$  Enhancer Requires Functional Collaboration among Proteins Bound Inside and Outside the Core Enhancer. *J. Immunol.* (2004) doi:10.4049/jimmunol.173.8.5054.
  425. Diaz, P., Cado, D. & Winoto, A. A locus control region in the T cell receptor  $\alpha/\delta$  locus. *Immunity.* (1994) doi:10.1016/1074-7613(94)90099-X.
  426. Ortiz, B. D., Cado, D. & Winoto, A. A New Element within the T-Cell Receptor  $\alpha$  Locus Required for Tissue-Specific Locus Control Region Activity. *Mol. Cell. Biol.* (1999) doi:10.1128/mcb.19.3.1901.
  427. Bassing, C. H., Tillman, R.E., Woodman, B., Canty, D., Monroe, R., Sleckman, B. & Alt, F. T cell receptor (TCR)  $\alpha/\delta$  locus enhancer identity and position are critical for the assembly of TCR  $\delta$  and a variable region genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2003) doi:10.1073/pnas.0437943100.
  428. Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, M. *et al.* RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell.*(1992) doi:10.1016/0092-8674(92)90029-C.

429. Shinkai, Y., Koyasu, S., Nakayama, K., Murphy, K., Loh, D., Reinherz, E. & Alt, F. Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science*. (1993) doi:10.1126/science.8430336.
430. Shinkai, Y. & Alt, F. W. CD3 $\epsilon$ -mediated signals rescue the development of CD4+CD8+ thymocytes in RAG-2<sup>-/-</sup> mice in the absence of TCR  $\beta$  chain expression. *Int. Immunol.* (1994) doi:10.1093/intimm/6.7.995.
431. Porcellini, S., Panigada, M. & Grassi, F. Molecular and cellular aspects of induced thymus development in recombinae-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* (1999) doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199908)29:08<2476::AID-IMMU2476>3.0.CO;2-1.
432. Murphy, K. M., Heimberger, A. B. & Loh, D. Y. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8<sup>+</sup>TCR<sup>lo</sup> thymocytes in vivo. *Science*. (1990) doi:10.1126/science.2125367.
433. Seder, R. A., Paul, W. E., Davis, M. M. & Fazekas de St. Groth, B. 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) doi:10.1084/jem.176.4.1091.
434. Hogquist, K. A., Jameson, S., Heath, W., Howard, J., Bevan, M. & Carbone, F. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*. (1994) doi:10.1016/0092-8674(94)90169-4.
435. Bouvier, G., Watrin, F., Naspetti, M., Verthuy, C., Naquet, P. & Ferrier, P. Deletion of the mouse T-cell receptor beta gene enhancer blocks alphabeta T-cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1996).doi:10.1073/pnas.93.15.7877.
436. Zacarías-Cabeza, J., Belhocine, M., Vanhille, L., Cauchy, P., Koch, F., Pekowska, A., Fenouil, R., Spicuglia, S. *et al.* Transcription-Dependent Generation of a Specialized Chromatin Structure at the TCR $\beta$  Locus. *J. Immunol.* (2015) doi:10.4049/jimmunol.1400789.
437. Zhao, J., Osipovich, O., Koues, O. I., Majumder, K. & Oltz, E. M. Activation of Mouse Tcrb : Uncoupling RUNX1 Function from Its Cooperative Binding with ETS1 . *J. Immunol.* (2017) doi:10.4049/jimmunol.1700146.
438. Ferrando, A. A., Neuberg, D., Staunton, J., Loh, M., Huard, C., Raimondi, S., Behm, F., Pui, C. *et al.* Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. (2002) doi:10.1016/S1535-6108(02)00018-1.
439. Van Vlierberghe, P. & Ferrando, A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Investigation*. (2012) doi:10.1172/JCI61269.
440. Haydu, J. E. & Ferrando, A. A. Early T-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (ETP-ALL/LBL) in adolescents and adults: a high-risk subtype. *Curr. Opin. Hematol.* (2013) doi:10.1097/MOH.0b013e3283623c61.Early.
441. Pear, W. S., Aster, J.C., Scott, M.L., Hasserjian, R.P., Soffer, B., Sklar, J. & Baltimore, D. Exclusive development of T cell neoplasms in mice transplanted with bone marrow expressing activated Notch alleles. *J. Exp. Med.* (1996) doi:10.1084/jem.183.5.2283.
442. Bellavia, D., Campese, A., Checquolo, S., Balestri, A., Biondi, A., Cazzaniga, G., Lendahl, U., Fehling, H. *et al.* Combined expression of pT $\alpha$  and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2002) doi:10.1073/pnas.062050599.
443. Weng, A. P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J., Silverman, L., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S., Look, T. & Aster, J.C. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* . (2004) doi:10.1126/science.1102160.

444. Thompson, B. J., Buonamici, S., Sulis, M.L., Palomero, T., Vilimas, T., Basso, G., Ferrando, A. & Aifantis, I. The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia. *J. Exp. Med.* (2007) doi:10.1084/jem.20070872.
445. Beverly, L. J., Felsher, D. W. & Capobianco, A. J. Suppression of p53 by Notch in lymphomagenesis: Implications for initiation and regression. *Cancer Res.* (2005) doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1664.
446. Li, X., Gounari, F., Protopopov, A., Khazaie, K. & Von Boehmer, H. Oncogenesis of T-ALL and nonmalignant consequences of overexpressing intracellular NOTCH1. *J. Exp. Med.* (2008) doi:10.1084/jem.20081561.
447. García-Peydró, M., Fuentes, P., Mosquera, M., García-León, M., Alcain, J., Rodríguez, A., García de Miguel, P., Menéndez, P *et al.* The NOTCH1/CD44 axis drives pathogenesis in a T cell acute lymphoblastic leukemia model. *J. Clin. Invest.* (2018) doi:10.1172/JCI92981.
448. Allman, D., Karnell, F.G., Punt, J.A., Bakkour, S., Xu, L., Myung, P., Koretzky, G., Pui, J.C., Aster, J.C. & Pear, W.S. Separation of Notch1 promoted lineage commitment and expansion/transformation in developing T cells. *J. Exp. Med.* (2001) doi:10.1084/jem.194.1.99.
449. González-García, S., Mosquera, M., Fuentes, P., Palumbo, T., Escudero, A., Pérez-Martínez, A., Ramírez, M., Corcoran, A. & Toribio, M. IL-7R is essential for leukemia-initiating cell activity of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* .(2019) doi:10.1182/blood.2019000982.
450. Oliveira, M. L., Akkapeddi, P., Ribeiro, D., Melão, A. & Barata, J. T. IL-7R-mediated signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia: An update. *Advances in Biological Regulation.* (2019) doi:10.1016/j.jbior.2018.09.012.
451. González-García, S., García-Peydró, M., Alcain, J. & Toribio, M. L. Notch1 and IL-7 receptor signalling in early T-cell development and leukaemia. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (2012) doi:10.1007/82-2012-231.
452. Canté-Barrett, K., Spijkers-Hagelstein, J., Buijs-Gladdines, J., Uitdehaag, J., Smits, W.K., van der Zwet, J., Buijsman, R., Zaman, G., Pieters, R. & Meijerink, J. MEK and PI3K-AKT inhibitors synergistically block activated IL7 receptor signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* (2016) doi:10.1038/leu.2016.83.
453. Vicente, C., Shwab, C., Broux, M., Geerdens, E., Degryse, S., Demeyer, S., Lahortiga, I., Elliott, A. *et al.* Targeted sequencing identifies associations between IL7R-JAK mutations and epigenetic modulators in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* .(2015) doi:10.3324/haematol.2015.130179.
454. Barata, J. T., Cardoso, A. A., Nadler, L. M. & Boussiotis, V. A. Interleukin-7 promotes survival and cell cycle progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by down-regulating the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1. *Blood* .(2001) doi:10.1182/blood.V98.5.1524.
455. Scupoli, M. T., Perbellini, O., Krampera, M., Vinante, F., Cioffi, F. & Pizzolo, G. Interleukin 7 requirement for survival of T-cell acute lymphoblastic leukemia and human thymocytes on bone marrow stroma. *Haematologica*.(2007) doi:10.3324/haematol.10356.
456. Barata, J. T., Silva, A., Abecasis, M., Carlesso, N., Cumano, A. & Cardoso, A. *et al.* Molecular and functional evidence for activity of murine IL-7 on human lymphocytes. *Exp. Hematol.* (2006) doi:10.1016/j.exphem.2006.05.001.
457. Osborne, L. C., Duthie, K. A., Seo, J. H., Gascoyne, R. D. & Abraham, N. Selective ablation of the YxxM motif of IL-7R $\alpha$  suppresses lymphomagenesis but maintains lymphocyte development. *Oncogene.* (2010) doi:10.1038/onc.2010.133.
458. Laouar, Y., Crispe, I. N. & Flavell, R. A. Overexpression of IL-7R $\alpha$  provides a

- competitive advantage during early T-cell development. *Blood*.(2004) doi:10.1182/blood-2003-06-2126.
459. Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S., Payne-Turner, D., Easton, J., Chen, X. *et al.* The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. (2012) doi:10.1038/nature10725.
460. Ridder, A., Skupjen, P., Unterreitmeier, S. & Langosch, D. Tryptophan supports interaction of transmembrane helices. *J. Mol. Biol.* (2005) doi:10.1016/j.jmb.2005.09.084.
461. Yokoyama, K. Yokoyama, N., Izawa, K., Kotani, A., Harashima, A., Hozumi, K. & Tojo, A. Lymphoid neoplasia: In vivo leukemogenic potential of an interleukin 7 receptor a chain mutant in hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* .(2013) doi:10.1182/blood-2012-08-451278.
462. Zenatti, P. P., Ribeiro, D., Li, W., Zuurbier, L., Silva, M., Paganin, M., Tritapoe, J., Hixon, J., Silveira, A., Cardoso, B., Sarmiento, L., Correia, N., Toribio, M.L., Kobarg, J., Horstmann, Pieters, R., Brandalise, S., Ferrando, A.A., Meijerink, J.P., Durum, S., Yunes & A., Barata, J. Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* (2011) doi:10.1038/ng.924.
463. Bornschein, S., Demeyer, S., Stirparo, R., Gielen, O., Vicente, C., Geerdens, E., Ghesquière, B., Aerts, S., Cools, J. & de Bock, C. Defining the molecular basis of oncogenic cooperation between TAL1 expression and Pten deletion in T-ALL using a novel pro-T-cell model system. *Leukemia*. (2018) doi:10.1038/leu.2017.328.
464. Hebert, J., Cayuela, J. M., Berkeley, J. & Sigaux, F. Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16(INK4A)) and MTS2 (p15(INK4B)) display frequent homozygous deletions in primary cells from T-but not from B- cell lineage acute lymphoblastic leukemias. *Blood*. (1994).84:4038-4044.
465. Treanor, L. M., Zhou, S., Janke, L., Churchman, M., Ma, Z., Lu, T., Chen, S.C., Mullighan, C. & Sorrentino, B. Interleukin-7 receptor mutants initiate early t cell precursor leukemia in murine thymocyte progenitors with multipotent potential. *J. Exp. Med.* (2014) doi:10.1084/jem.20122727.
466. Girardi, T., Verecke, S., Sulima, S., Khan, Y., Fancello, L., Briggs, J.W., Schwab, C., Beeck, O., Verbeeck, J., Royaert, J., Geerdens, E., Vicente, C., Bornschein, S., Harrison, C.J., Meijerink, J.P., Cools, J., Dinman, J.D., Kampen, K.R. & Keersmaecker, K. The T-cell leukemia-associated ribosomal RPL10 R98S mutation enhances JAK-STAT signaling. *Leukemia* .(2018) doi:10.1038/leu.2017.225.
467. Germain, R. N. & Stefanová, I. THE DYNAMICS OF T CELL RECEPTOR SIGNALING: Complex Orchestration and the Key Roles of Tempo and Cooperation. *Annu. Rev. Immunol.* (1999) doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.467.
468. Kawamura, M., Ohnishi, H., Guo, X., Sheng, M., Minegishi, M., Hanada, R., Horibe, K., Hongo, T., Kaneko, Y., Bessho, F., Yanagisawa, M., Sekiya, T. & Hayashi, Y. Alterations of the p53, p21, p16, p15 and RAS genes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* (1999) doi:10.1016/S0145-2126(98)00146-5.
469. Medyouf, H. & Ghysdael, J. The calcineurin/NFAT signaling pathway: A novel therapeutic target in leukemia and solid tumors. *Cell Cycle*.(2008) doi:10.4161/cc.7.3.5357.
470. Chervinsky, D. S., Lam, D. H., Melman, M. P., Gross, K. W. & Aplan, P. D. Scid thymocytes with TCR $\beta$  gene rearrangements are targets for the oncogenic effect of SCL and LMO1 transgenes. *Cancer Res.* (2001).61:6382-6387.
471. Aifantis, I., Raetz, E. & Buonamici, S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nature Reviews Immunology* .(2008) doi:10.1038/nri2304.
472. Le Noir, S., Abdelali, R., Lelorch, m., Bergeron, J., Sungalee, S., Payet-Bornet, D.,

- Villarèse, P., Petit, A., Callens, C., Lhermitte, L., Baranger, L., Radford-Weiss, I., Grégoire, M., Dombret, H., Ifrah, N., Spicuglia, S., Romana, S., Soulier, J., Nadel, B., Macintyre, E. & Asnafi, V. Extensive molecular mapping of TCR $\alpha/\delta$ - and TCR $\beta$ -involved Chromosomal translocations reveals distinct mechanisms of oncogene activation in T-ALL. *Blood*. (2012) doi:10.1182/blood-2012-04-425488.
473. Tan, T. K., Zhang, C. & Sanda, T. Oncogenic transcriptional program driven by TAL1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Hematology* .(2019) doi:10.1007/s12185-018-2518-z.
474. Begley, C. G., Aplan, P.D., Davey, M.P., Nakahara, K., Tchorz, K., Kurtzberg, J., Hershfield, M.S., Haynes, B.F., Cohen, D.I. & Waldmann, T.A. Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor  $\delta$ -chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1989) doi:10.1073/pnas.86.6.2031.
475. Janssen, J. W. G., Ludwig, W. D., Sterry, W. & Bartram, C. R. SIL-TAL1 deletion in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* (1993).7:1204-1210.
476. Breit, T. M., Mol, E.J., Wolvers, I.L, Ludwig, W.D., van Wering, E.R. & van Dongen, J.J. Site-specific deletions involving the tal-1 and sil genes are restricted to cells of the T cell receptor  $\alpha/\beta$  lineage: T cell receptor  $\delta$  gene deletion mechanism affects multiple genes. *J. Exp. Med.* (1993) doi:10.1084/jem.177.4.965.
477. Mansour, M. R., Abraham, B., Anders, L., Berezovskaya, A., Gutierrez, A., Durbin, A., Etchin, J., Lawton, L., Sallan, S., Silverman, L., Loh, M., Hunger, S., Sanda, T., Young, R. & Look, A. An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a non coding intergenic element. *Science*. (2014) doi:10.1126/science.1259037.
478. Navarro, J. M., Touzart, A., Pradel, L., Loosveld, M., Kouby, M., Fenouil, R., Le Noir, S., Maqbool, M. *et al.* Site- and allele-specific polycomb dysregulation in T-cell leukaemia. *Nat. Commun.* (2015) doi:10.1038/ncomms7094.
479. Park, S. T. & Sun, X. H. The Tall1 oncoprotein inhibits E47-mediated transcription. Mechanism of inhibition. *J. Biol. Chem.* (1998) doi:10.1074/jbc.273.12.7030.
480. O'Neil, J., Shank, J., Cusson, N., Murre, C. & Kelliher, M. TAL1/SCL induces leukemia by inhibiting the transcriptional activity of E47/HEB. *Cancer Cell*. (2004) doi:10.1016/j.ccr.2004.05.023.
481. O'Neil, J., Calvo, J., McKenna, K., Krishnamoorthy, Aster, J.C., Bassing, C.H., Alt, F.W., Kelliher, M. & Look, T. Activating Notch1 mutations in mouse models of T-ALL. *Blood* .(2006) doi:10.1182/blood-2005-06-2553.
482. Brayer, K. J., Frerich, C. A., Kang, H. & Ness, S. A. Recurrent fusions in MYB and MYBL1 define a common, transcription factor-driven oncogenic pathway in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Cancer Discov.* (2016) doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0859.
483. Boyer, L. A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S., Zucker, J., Guenther, M., Kumar, R., Murray, H., Jenner, R., Gifford, D., Melton, D., Jaenisch, R. & Young, R. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* .(2005) doi:10.1016/j.cell.2005.08.020.
484. Saint-André, V., Federation, A.J., Lin, C., Abraham, B.J., Reddy, J., Lee, T.I., Bradner, J.E. & Young, R. Models of human core transcriptional regulatory circuitries. *Genome Res.* (2016) doi:10.1101/gr.197590.115.
485. Sanda, T., Lawton, L.N., Barrasa, M.I., Fan, Z.P., Kohlhammer, H., Gutierrez, A., Ma, W., Tatarek, J., Ahn, Y., Kelliher, M.A., Jamieson, C., Staudt, L., Young, R. & Look, A.T. Core Transcriptional Regulatory Circuit Controlled by the TAL1 Complex in Human T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*.(2012)

- doi:10.1016/j.ccr.2012.06.007.
486. Califano, A. & Alvarez, M. J. The recurrent architecture of tumour initiation, progression and drug sensitivity. *Nature Reviews Cancer*.(2017) doi:10.1038/nrc.2016.124.
487. Parker, S. C. J., Stitzel, M., Taylor, D.L., Orozco, J.M., Erdos, M.R., Akiyama, J.A., van Bueren, K.L., Chines, P.S., Narisu, N., Black, B., Visel, A., Pennacchio, L. & Collins, F.S. Chromatin stretch enhancer states drive cell-specific gene regulation and harbor human disease risk variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2013) doi:10.1073/pnas.1317023110.
488. Whyte, W. A., Orlando, D.A., Hnisz, D., Rahl, P.B., Lee, T.I. & Young, R.A. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* .(2013) doi:10.1016/j.cell.2013.03.035.
489. Nottingham, W. T., Jarrat, A., Burgess, M., Speck, C.L., Cheng, J.F., Prabhakar, S., Rubin, E.M., Li, P., Sloane-Stanley, J., Kong-A-San, J. & de Bruijn, M. Runx1-mediated hematopoietic stem-cell emergence is controlled by a Gata/Ets/SCL-regulated enhancer. *Blood* .(2007) doi:10.1182/blood-2007-07-100883.
490. Thoms, J. A. I., Birger, Y., Foster, S., Knezevic, K., Kirschenbaum, Y., Chandrakanthan, V., Jonquieres, G., Spensberger, D., Wong, J., Oram, H., Kinston, S., Groner, Y., Lock, R., MacKenzie, K.L., Gottgens, B., Izraeli, S. & Pimanda, J.E.. ERG promotes T-acute lymphoblastic leukemia and is transcriptionally regulated in leukemic cells by a stem cell enhancer. *Blood*.(2011) doi:10.1182/blood-2010-12-317990.
491. Novershtern, N., Subramanian, A., Lawton, L.N., Golub, T., Regev, A. & Ebert, B. Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. *Cell*. (2011) doi:10.1016/j.cell.2011.01.004.
492. Wilson, N. K., Miranda-Saavedra, D., Kinston, S., Bonadies, N., Foster, S., Calero-Nieto, F., Dawson, M., Donaldson, I., Dumon, S., Frampton, J., Janky, R., Sun, X., Teichmann, S., Bannister, A. & Gottgens, B. The transcriptional program controlled by the stem cell leukemia gene *Scl* /*Tal1* during early embryonic hematopoietic development. *Blood*. (2009) doi:10.1182/blood-2009-01-200048.
493. Patrick, K., Wade, R., Goulden, N., Mitchel, C., Rowntree, C., Hancock, J., Hough, R.E. & Vora, A. Improved Outcome for Children and Young People with T-Acute Lymphoblastic Leukaemia: Results of the UKALL 2003 Trial. *Blood* .(2014).124:3702
494. Vora, A., Goulden, N., Wade, R., Mitchell, C., Hancock, J., Hough, R., Rowntree, C. & Richards, S. Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): A randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. (2013) doi:10.1016/S1470-2045(12)70600-9.
495. Berg, S. L., Blaney, S.M., Devidas, M., Lampkin, T.A., Murgu, A., Bernstein, M., Billet, A., Kurtzberg, J., Reaman, G., Gaynon, P., Whitlock, J., Krailo, M. & Harris, M.B.. Phase II study of nelarabine (compound 506U78) in children and young adults with refractory T-cell malignancies: A report from the children's oncology group. *J. Clin. Oncol*. (2005) doi:10.1200/JCO.2005.03.426.
496. Cooper, T. M. Role of nelarabine in the treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia and T-cell lymphoblastic lymphoma. *Therapeutics and Clinical Risk Management* (2007).3:1135-1141.
497. Palomero, T., Barnes, K.C., Real, P.J., Glade-Bender, J.L., Sulis, M.L., Murty, V.V., Colovai, A.I., Balbin, M. & Ferrando, A.A. CUTLL1, a novel human T-cell lymphoma cell line with t(7;9) rearrangement, aberrant NOTCH1 activation and high

- sensitivity to  $\gamma$ -secretase inhibitors. *Leukemia* .(2006) doi:10.1038/sj.leu.2404258.
498. Armstrong, F., Brunet, G., Gerby, B., Rouyez, M.C., Calvo, J., Fontenay, M., Boissel, N., Dombret, H., Baruchel, A., Landman-Parker, J., R  meo, P.H., Ballerini, P. & Pflumio, F. NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity. *Blood* .(2009) doi:10.1182/blood-2008-02-138172.
  499. Hernandez Tejada, F. N., Galvez Silva, J. R. & Zweidler-McKay, P. A. The challenge of targeting Notch in hematologic malignancies. *Frontiers in Pediatrics*.(2014) doi:10.3389/fped.2014.00054.
  500. Real, P. J., Tosello, V., Palomero T., Castillo, M., Hernando, E., de Stanchina, E., Sulis, M.L., Barnes, K. *et al.*  $\gamma$ -secretase inhibitors reverse glucocorticoid resistance in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Med.* (2009) doi:10.1038/nm.1900.
  501. Aste-Am  zaga, M., Zhang, N., Lineberger, J.E., Arnold, B.A., Toner, T.J., Gu, M., Huang, L., Vitelli, S. *et al.* Characterization of notch1 antibodies that inhibit signaling of both normal and mutated notch1 receptors. *PLoS One*.(2010) doi:10.1371/journal.pone.0009094.
  502. Sulis, M. L., Saftig, P. & Ferrando, A. A. Redundancy and specificity of the metalloprotease system mediating oncogenic NOTCH1 activation in T-ALL. *Leukemia* .(2011) doi:10.1038/leu.2011.130.
  503. Moellering, R. E., Cornejo, M., Davis, T.N., Del Bianco, C., Aster, J.C., Blacklow, S.C., Kung, A., Gilliland, D.G., Verdine, G.L. & Bradner, J.E. Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature*. (2009) doi:10.1038/nature08543.
  504. Tasian, S. K., Teachey, D. T. & Rheingold, S. R. Targeting the PI3K/mTOR pathway in pediatric hematologic malignancies. *Frontiers in Oncology*.(2014) doi:10.3389/fonc.2014.00108.
  505. Irving, J. A. E. Towards an understanding of the biology and targeted treatment of paediatric relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. (2016) doi:10.1111/bjh.13852.
  506. Aleem, E. & Arceci, R. J. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. (2015) doi:10.3389/fcell.2015.00016.
  507. Peirs, S., Van der Meulen, J., Van de Walle, I., Taghon, T., Speleman, F., Poppe, B. & Van Vlierberghe, P. Epigenetics in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Immunol. Rev.* (2015) doi:10.1111/imr.12237.
  508. Cramer, S. D., Aplan, P. D. & Durum, S. K. Therapeutic targeting of IL-7R $\alpha$  signaling pathways in ALL treatment. *Blood*. (2016) doi:10.1182/blood-2016-03-679209.
  509. Yasunaga, M., Manabe, S. & Matsumura, Y. Immunoregulation by IL-7R-targeting antibody-drug conjugates: Overcoming steroid-resistance in cancer and autoimmune disease. *Sci. Rep.* (2017) doi:10.1038/s41598-017-11255-4.
  510. Portell, C. A. & Advani, A. S. Novel targeted therapies in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma* .(2014) doi:10.3109/10428194.2013.823493.
  511. Mamonkin, M., Rouce, R. H., Tashiro, H. & Brenner, M. K. A T-cell-directed chimeric antigen receptor for the selective treatment of T-cell malignancies. *Blood*. (2015) doi:10.1182/blood-2015-02-629527.
  512. Carleton, M., Ruetsch, N.R., Berger, M.A., Rhodes, M., Kaptik, S., & Wiest, D.L. Signals transduced by CD3 $\epsilon$ , but not by surface pre-TCR complexes, are able to induce maturation of an early thymic lymphoma in vitro. *J. Immunol.* (1999). 163:2576-2585.
  513. Schneider, U., Schwenk, H. - U & Bornkamm, G. Characterization of EBV - genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute

- lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non - Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* .(1977) doi:10.1002/ijc.2910190505.
514. DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. & Calos, M.P. *et al.* Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* (1987) doi:10.1128/mcb.7.1.379.
  515. Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L. & Baltimore, D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1993) doi:10.1073/pnas.90.18.8392.
  516. Nakano, T., Kodama, H. & Honjo, T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* . (1994) doi:10.1126/science.8066449.
  517. Aruffo, A. Transient Expression of Proteins Using COS Cells. *Curr. Protoc. Neurosci.* (1998) doi:10.1002/0471142301.ns0407s02.
  518. Aster, J. C., Robertson, E.S., Hasserjian, R.P., Turner, J.R., Kieff, E. & Sklar, J. Oncogenic forms of NOTCH1 lacking either the primary binding site for RBP-J $\kappa$  or nuclear localization sequences retain the ability to associate with RBP-J $\kappa$  and activate transcription. *J. Biol. Chem.* (1997) doi:10.1074/jbc.272.17.11336.
  519. David-Fung, E. S., Butler, R, Buzi, G., Yui, M.A., Diamond, R.A., Anderson, M.K., Rowen, L. & Rothenberg, E.V. Transcription factor expression dynamics of early T-lymphocyte specification and commitment. *Dev. Biol.* (2009) doi:10.1016/j.ydbio.2008.10.021.
  520. Dionne, C. J., Tse, K., Weiss, A.H., Franco, C.B., Wiest, D.L., Anderson, M.K. & Rothenberg, E.V. Subversion of T lineage commitment by PU.1 in a clonal cell line system. *Dev. Biol.* (2005) doi:10.1016/j.ydbio.2005.01.027.
  521. Choi, Ah., Illendula, A., Pulikkan, J., Roderick, J., Tesell, J., Yu, J., Hermance, N., Zhu, L.J., Castilla, L., Bushweller, J. & Kelliher, M. RUNX1 is required for oncogenic Myb and Myc enhancer activity in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* .(2017) doi:10.1182/blood-2017-03-775536.
  522. Yui, M. A. & Rothenberg, E. V. Developmental gene networks: A triathlon on the course to T cell identity. *Nature Reviews Immunology* .(2014) doi:10.1038/nri3702.
  523. Schmitt, T. M. & Zúñiga-Pflücker, J. C. Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro. *Immunity*.(2002) doi:10.1016/S1074-7613(02)00474-0.
  524. Aster, J. C., Xu, L., Karnell, F.G., Patriub, V., Pui, J.C. & Pear, W.S . Essential Roles for Ankyrin Repeat and Transactivation Domains in Induction of T-Cell Leukemia by Notch1. *Mol. Cell. Biol.* (2000) doi:10.1128/mcb.20.20.7505-7515.2000.
  525. Abraham, R. T. & Weiss, A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nature Reviews Immunology* .(2004) doi:10.1038/nri1330.
  526. Brignall, R., Cauchy, P., Bevington, S., Gorman, B., Pisco, A., Bagnall, J., Boddington, C., Rowe. *et al.* Integration of Kinase and Calcium Signaling at the Level of Chromatin Underlies Inducible Gene Activation in T Cells. *J. Immunol.* (2017) doi:10.4049/jimmunol.1602033.
  527. O'Neil, J., Grim, J., Strack, P., Rao, S., Tibbitts, D., Winter, C., Hardwick, J., Welcker, A. *et al* . FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to  $\gamma$ -secretase inhibitors. *J. Exp. Med.* (2007) doi:10.1084/jem.20070876.
  528. Magri, M., Yatim, A., Benne, C., Balbo, M., Henry, A., Serraf, A., Sakano, S., Gazzolo, L., Lévy, Y. & Lelièvre, J.D. Notch ligands potentiate IL-7-driven proliferation and survival of human thymocyte precursors. *Eur. J. Immunol.* (2009) doi:10.1002/eji.200838765.
  529. Durum, S. K., Candéias, S., Nakajima, H., Leonard, W.J., Baird, A.M., Berg, L.J. &



- Muegge, K. Interleukin 7 receptor control of T cell receptor  $\gamma$  gene rearrangement: Role of receptor-associated chains and locus accessibility. *J. Exp. Med.* (1998) doi:10.1084/jem.188.12.2233.
530. Tani-Ichi, S., Lee, H. C., Ye, S. K. & Ikuta, K. Accessibility control of TCR V $\gamma$  region by STAT5. *Int. Immunol.* (2010) doi:10.1093/intimm/dxq054.
531. Wagatsuma, K., Tani-Ichi, S., Liang, B., Shitara, S., Ishihara, K., Abe, M., Miyachi, H., Kitano, S., Hara, T., Nanno, M., Ishikawa, H., Sakimura, K., Nakao, M., Kimura, H. & Ikuta, K *et al.* STAT5 Orchestrates Local Epigenetic Changes for Chromatin Accessibility and Rearrangements by Direct Binding to the TCR $\gamma$  Locus. *J. Immunol.* (2015) doi:10.4049/jimmunol.1302456.
532. Ghazawi, F. M., Faller, E. M., Sugden, S. M., Kakal, J. A. & MacPherson, P. A. IL-7 downregulates IL-7R $\alpha$  expression in human CD8 T cells by two independent mechanisms. *Immunol. Cell Biol.* (2013) doi:10.1038/icb.2012.69.
533. Cui, K., Zang, C., Roh, T.Y., Schones, D.E., Childs, R., Peng, W. & Zhao, K. Chromatin Signatures in Multipotent Human Hematopoietic Stem Cells Indicate the Fate of Bivalent Genes during Differentiation. *Cell Stem Cell.* (2009) doi:10.1016/j.stem.2008.11.011.
534. Selth, L. A. & Sigurdsson, S. Transcript elongation by RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* (2010). doi: 10.1146/annurev.biochem.78.062807.091425.
535. Pekowska, A., Benoukraf, T., Zacarias-Cabeza, J., Belhocine, M., Koch, F., Holota, H., Imbert, J., Andrau, J.C., Ferrier, P. & Spicuglia, S. H3K4 tri-methylation provides an epigenetic signature of active enhancers. *EMBO J.* (2011) doi:10.1038/emboj.2011.295.
536. Tober, J., Maijenburg, M. W. & Speck, N. A. Taking the Leap: Runx1 in the Formation of Blood from Endothelium. in *Current Topics in Developmental Biology.* (2016). doi:10.1016/bs.ctdb.2016.01.008.
537. Chari, S. & Winandy, S. Ikaros Regulates Notch Target Gene Expression in Developing Thymocytes. *J. Immunol.* (2008) doi:10.4049/jimmunol.181.9.6265.
538. Franco, C. B., Scripture-Adams, D., Proekt, I., Taghon, T., Weiss, A., Yui, M., Adams, S., Diamond, R. & Rothenberg, E.V. Notch/Delta signaling constrains reengineering of pro-T cells by PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2006) doi:10.1073/pnas.0601188103.
539. Taghon, T., Waegemans, E. & Van De Walle, I. Notch signaling during human T cell development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (2012) doi:10.1007/82-2012-230.
540. Yuan, J., Crittenden, R. B. & Bender, T. P. c-Myb Promotes the Survival of CD4 + CD8 + Double-Positive Thymocytes through Upregulation of Bcl-xL. *J. Immunol.* (2010) doi:10.4049/jimmunol.0902846.
541. Andersen, P., Uosaki, H., Shenje, L. T. & Kwon, C. Non-canonical Notch signaling: Emerging role and mechanism. *Trends in Cell Biology.* (2012) doi:10.1016/j.tcb.2012.02.003.
542. Lichtinger, M., Hoogenkamp, M., Krysinska, H., Ingram, R. & Bonifer, C. Chromatin regulation by RUNX1. *Blood Cells, Mol. Dis.* (2010) doi:10.1016/j.bcmd.2010.02.009.
543. Van De Walle, I., Dolens, A.C., Durinck, K., De Mulder, K., Van Looche, W., Damle, D., Waegemans, E., De Medts, J., Velghe, I., De Smedt, M., Taghon, T *et al.* GATA3 induces human T-cell commitment by restraining Notch activity and repressing NK-cell fate. *Nat. Commun.* (2016) doi:10.1038/ncomms11171.
544. Lin, J. X., Li, P., Liu, D., Jin, H.T., He, J., Rasheed, M.A., Rochman, Y., Wang, L., Cui, K., Liu, C., Kelsall, B., Ahmed, R. & Leonard, W. Critical Role of STAT5 Transcription Factor Tetramerization for Cytokine Responses and Normal Immune

Function. *Immunity*. (2012) doi:10.1016/j.immuni.2012.02.017.

## **Publicaciones**

**Insights into the transcriptional regulation of the unrearranged and rearranged *Tcra* and *Tcrd* genes**

**Running title: Regulation of *Tcra/Tcrd* transcription**

*Cristina Hernández-Munain\**, *Áurea Casal*, *Belén Juanes*, *Jennifer López-Ros*, and *Alonso Rodríguez-Caparrós*

Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPBLN-CSIC), Avenida del Conocimiento s/n, 18016-Armillá, Granada, Spain; [chmunain@ipb.csic.es](mailto:chmunain@ipb.csic.es); Telephone: 34-958-181646; Fax: 34-958-181632

\*Corresponding autor

**Keywords:** Transcription, T-cell receptor, V(D)J recombination, enhancer

**Abbreviations:** A-T, ataxia-telangiectasia; ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM); C $\alpha$ , *Tcra* constant region; C $\delta$ , *Tcrd* constant region; chromosome conformation capture experiments, 3C and 4C; CTCF, CTCF-binding factor; D, diversity; DN, double negative; DP, double positive; E $\alpha$ , *Tcra* enhancer; E $\delta$ , *Tcrd* enhancer; eDP, early DP; ETP, early T-cell progenitor; HS, DNaseI hypersensitivity site; IL-7R, interleukin-7 receptor; ISP, immature single positive; J, joining; LCR, locus control region; IDP, late DP; *Rag*, recombinaise activating gene; SP, single positive; T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia; TEAp; T early  $\alpha$  promoter; TCR, T-cell receptor; TCR $\alpha$ , T-cell receptor  $\alpha$ ; *Tcra*, T-cell receptor  $\alpha$  gene; TCR $\alpha\beta$ ,  $\alpha\beta$  T-cell receptor; T-cell receptor TCR $\beta$ , T-cell receptor  $\beta$  chain; *Tcrb*, T-cell receptor  $\beta$  gene; TCR $\delta$ , T-cell receptor  $\delta$ ;

*Tcrd*, T cell receptor  $\delta$  gene; TCR $\gamma$ , T-cell receptor  $\gamma$  chain; *Tcrg*, T-cell receptor  $\gamma$  gene; TCR $\gamma\delta$ ,  $\gamma\delta$  T-cell receptor; TF, transcription factor; *Traj*, T-cell receptor  $\alpha$  J; *Trav*, T-cell receptor  $\alpha$  V; *Trdd*, T-cell receptor  $\delta$  D; *Trdj*, T-cell receptor  $\delta$  J; *Trdv*, T-cell receptor  $\delta$  V; V, variable.

## ABSTRACT

The combined T-cell receptor  $\alpha$  and  $\delta$  locus, *Tcra/Tcrd*, encodes the TCR $\alpha$  and TCR $\delta$  chains of the  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$  T-cell receptors (TCR $\alpha\beta$  and TCR $\gamma\delta$ ), respectively, which define the two distinct T-cell lineages,  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T lymphocytes. Like other antigen receptor loci, this locus must recombine its variable (V), diversity (D), and joining (J) gene segments to generate a diverse range of TCR that allow vertebrates to respond to an unlimited number of antigens. The *Tcra/Tcrd* germline transcription and subsequent V(D)J gene segment rearrangements are strictly regulated by two distant transcriptional enhancers,  $E\alpha$  and  $E\delta$ , respectively, during thymocyte development. Once the *Tcra* locus is productively rearranged, it is assumed  $E\alpha$  remains active for the transcription of the rearranged locus and the expression of the functional TCR $\alpha$  chain in  $\alpha\beta$  T lymphocytes. However, our recent experiments have shown  $E\alpha$  is significantly inhibited during the final stage of thymocyte development, concomitantly with the expression of the rearranged *Tcra* locus, and remains inhibited in  $\alpha\beta$  T lymphocytes. These results imply the existence of an  $E\alpha$ -independent mechanism to activate transcription of the rearranged *Tcra* locus in  $\alpha\beta$  T lymphocytes. Interestingly,  $E\alpha$  is essential for the normal expression of the rearranged *Tcrd* locus in  $\gamma\delta$  T lymphocytes. In this review, the current knowledge about the regulation of *Tcra/Tcrd* germline transcription and gene segment rearrangement during thymocyte development and the possible mechanisms for transcription of the rearranged *Tcra* locus in mature  $\alpha\beta$  T lymphocytes are discussed. The knowledge of the detailed mechanisms involved in the regulation of transcription at the *Tcra/Tcrd* locus by distant enhancers is important to understand the cases in which deregulation this process results in disease.

## Temporal control of TCR gene rearrangements

During thymic T-cell development (Fig. 1), early T-cell progenitors (ETP) arising from fetal liver or bone marrow enter to the thymus, where they mature progressively through different stages that can be distinguished based on the expression of the CD4 and CD8 surface markers: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative (DN) thymocytes, immature single-positive (ISP) CD8<sup>+</sup> thymocytes, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive (DP) thymocytes, and CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> single-positive (SP) thymocytes (1). Among the DN thymocyte population, four subpopulations can be further distinguished based on the expression of CD25 and CD44 surface markers: DN1 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), DN2 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), DN3 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>), and DN4 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) thymocytes. In addition, two DN3 subpopulations can be distinguished based on the expression of CD27: DN3a (CD27<sup>low</sup>) and DN3b (CD27<sup>high</sup>) thymocytes (1). Furthermore, two DP thymocyte populations can be distinguished based on the expression of CD71: early DP (eDP) (CD71<sup>+</sup>) and late DP (lDP) (CD71<sup>-</sup>) thymocytes (2). For  $\alpha\beta$  T-cell development, thymocytes transition from DN1 to SP thymocytes by maturing successively through the following populations: DN1, DN2, DN3a, DN3b, DN4, ISP, eDP, lDP, and SP thymocytes; whereas for  $\gamma\delta$  T-cell development, thymocytes transit only from DN1 to DN2 or DN3a before becoming mature cells (3).

The loci that encode for the TCR chains are composed of dispersed variable (V), diversity (D), and joining (J) gene segments that are rearranged during thymocyte development by a process known as V(D)J recombination to generate a gene configuration capable of expressing the functional receptors, TCR $\alpha\beta$  or TCR $\gamma\delta$ , on the cell membrane (4, 5). The V(D)J recombination is completed in DN2 and DN3a thymocytes at the *Tcr $\alpha$*  and *Tcr $\delta$*  loci, in DN3a thymocytes at the *Tcr $\beta$*  locus, and in DP

thymocytes at the *Tcra* locus (4). A successful *Tcrg* VJ and *Tcrd* VDJ recombination permits the expression of a TCR $\gamma\delta$ , which drives cell differentiation to  $\gamma\delta$  T lymphocytes in a process known as  $\gamma\delta$ -selection (4). A successful *Tcrb* VDJ recombination in DN3a thymocytes permits the expression of a functional TCR $\beta$  chain that assembles with the invariant pre-T $\alpha$  chain to form a pre-TCR, which drives cell differentiation to DP thymocytes in a process known as  $\beta$ -selection (1, 4). A successful *Tcra* VJ recombination in eDP and IDP thymocytes permits the expression of a TCR $\alpha$  chain that associates with the previously expressed TCR $\beta$  chain to form a TCR $\alpha\beta$  (1, 4). The antigen affinity of the TCR $\alpha\beta$  in IDP thymocytes will determine the positive selection of a few DP thymocytes that will survive and differentiate into CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> SP thymocytes (3). SP thymocytes migrate to the periphery as mature  $\alpha\beta$  T lymphocytes (3).

In addition to the essential roles for pre-TCR- and TCR-mediated signaling on thymocyte development, signals mediated by Notch and interleukin-7 receptor (IL-7R) are required for T-cell commitment, survival, and differentiation (6-10). Each of these signals has a pivotal role in controlling the process of V(D)J recombination at the different TCR loci (3). In DN2/3a thymocytes, signaling mediated by IL-7R is essential for the *Tcrg* germline transcription and VJ recombination, as well as for  $\gamma\delta$  T lymphocyte development (11), whereas signaling mediated by Notch is essential for *Tcrb* gene VDJ recombination and  $\alpha\beta$  T lymphocyte development (12). During  $\beta$ -selection, pre-TCR-mediated signaling triggers the *Tcra* germline transcription and VJ recombination and the development of  $\alpha\beta$  T lymphocytes, and inhibits the transcription of the *Tcrg* and *Tcrd* loci (13-15). The molecular targets of those signaling pathways are genomic regulatory sequences capable of controlling chromatin structure of the loci, such as the enhancers



associated with the *Tcrg*, *Tcrd*, and *Tcra* loci, and the silencer and promoters associated with the *Tcrg* and *Tcrb* loci (11, 13, 14, 16-25).

### **Regulatory cis-elements present at the *Tcra/Tcrd* locus**

The *Tcra* and *Tcrd* genes are linked in a single genetic locus, *Tcra/Tcrd*, which spans 1.8-Mb with a conserved genomic structure and a location between the olfactory receptor genes and the *Dad1* gene on chromosome 14 in humans and mice (4, 5, 26). The 1.7-Mb 5'-locus region includes 132 *Tcra* and *Tcrd* V (*Trav* and *Trdv*) gene segments, while the remaining 0.1-Mb 3'-locus region contains the *Tcrd* D and J (*Trdd* and *Trdj*) gene segments, the *Tcrd* constant region (C $\delta$ ), the *Trdv5* gene segment, the *Tcra* J (*Traj*) gene segments, and the *Tcra* constant region (C $\alpha$ )(Fig. 2). Among the *Trav/Trdv* gene segments, some only rearrange with the *Trdd* gene segments, some only with the *Traj* gene segments, and some can rearrange with either *Trdd* or *Traj* gene segments, contributing to both the TCR $\delta$  and TCR $\alpha$  chain repertoires (5). The nested organization of these genes prevents the occurrence of the *Tcrd* and *Tcra* gene segment rearrangements on the same chromosome, because the *Tcra* VJ recombination results in the deletion of the *Tcrd* locus in an extra-chromosomal circle (4) (Fig. 2).

Each *Tcra* and *Tcrd* locus is equipped with one transcriptional enhancer, E $\alpha$  and E $\delta$ , located at the 3'-end of C $\alpha$  and at the 5'-end of C $\delta$ , respectively, and the numerous promoters that associated with the V, D, and J gene segments along the locus, including the T early  $\alpha$  promoter, TEAp, associated with the most 5'-*Traj* gene segment, *Traj61* (4) (Fig. 2). TEAp orchestrates different chromatin loops at the 3'-end of the locus during T-cell development (5, 27, 28) (see below). E $\alpha$  is part of a previously described locus control region (LCR) located between C $\alpha$  and the ubiquitously expressed *Dad1* gene (29). The *Tcra* LCR spans approximately 7.4-kb, with seven DNase I-hypersensitivity

sites (HS): HS1, HS1', HS2, HS3, HS4, HS5, and HS6 (30). The most 5'-1.4-kb LCR fragment contains HS1 and HS1' (30, 31). HS1 contains E $\alpha$  whereas the 3'-contiguous HS1' contains two binding sites for the CTCCC-binding factor (CTCF) involved in the *Tcra/Tcrd* locus chromatin organization and E $\alpha$  function during thymocyte development (27, 30-33). E $\alpha$  is responsible for activating the endogenous locus germline transcription and the *Tcra* VJ recombination, as well as the generation of  $\alpha\beta$  T lymphocytes (34). E $\alpha$  can also activate transcription and the V(D)J recombination of transgenic reporter constructs in a temporally regulated manner during thymocyte development (29, 35-38). In addition, E $\alpha$  is required for the normal expression of the rearranged *Tcrd* locus in  $\gamma\delta$  T lymphocytes (34). CTCF binding to HS1', TEAp, and proximal *Trav/Trdv* promoters is important to generate a functional chromatin hub among E $\alpha$ , TEAp, and proximal *Trav/Trdv* promoters to promote the endogenous *Tcra* VJ recombination in eDP thymocytes (27) (see below). CTCF binding to HS1' also collaborates with E $\alpha$  for the expression of transgenic reporter constructs in thymocytes and splenocytes (30). The 3'-6-kb LCR fragment contains HS2-6 (29). HS2-6 is transcriptionally active in non T-lineage cells and collaborates with E $\alpha$  to confer a high-level, position-independent and copy number-dependent transgene expression in T-lineage cells by acting as an insulator that blocks E $\alpha$  activity to maintain the distinct regulatory programs of the neighboring *Tcra/Tcrd* and *Dad1* genes (29, 30, 39). The HS4-HS6 fragment contains the greatest enhancer blocking activity (39), with HS4 and HS6 being the major contributors that confer E $\alpha$ -dependent high-level, position-independent and copy number-dependent transgene expression in T-lineage cells in a CTCF-independent manner (32, 40, 41). In addition, two other *Tcra/Tcrd* regulatory elements have been recently described (Fig. 2): 1) two binding sites for CTCF located upstream of the *Trdv4* gene segment, INT1/2, that creates a functionally relevant chromatin loop with TEAp in DN2/3a thymocytes to

increase the *Tcrd* and *Tcra* repertoires (see below), and 2) a new transcriptional enhancer located between the *Traj3* gene segment and  $C\alpha$ , called E3'-J $\alpha$ , that is active in thymic and peripheral  $\alpha\beta$  T cells as assessed using transgenic mice (28, 42).

### **Developmental control of the *Tcra/Tcrd* locus recombination by E $\alpha$ and E $\delta$**

E $\delta$  is essential for normal *Tcrd* V(D)J recombination and generation of  $\gamma\delta$  T lymphocytes (43). E $\delta$  functions as a local enhancer important to confer the accessibility of the *Trdv5*, *Trdd*, and *Trdj* gene segments to the recombinase machinery in a 10-20-kb region of adult DN3a thymocytes, while E $\alpha$  influences a 500-kb region including the proximal 1/3 of the *Trav/Trdv* (3'-*Trav/Trdv*) and *Traj* gene segments in DP thymocytes (44, 45) (Fig. 2). E $\delta$  and E $\alpha$  are responsible for the specificity of the *Tcrd* and *Tcra* gene segment rearrangement, respectively, across the developmental stages by regulating the germline transcription and chromatin structure that mediates the accessibility of the recombinase machinery to each specific gene (46). To permit the generation of functional *Tcrd* VDJ recombination and expression of the TCR $\delta$  chain in DN2/3a, E $\delta$  is active whereas E $\alpha$  remains inactive in these cells (14, 46). *Tcrd* VDJ recombination is accomplished through the activation of the E $\delta$ -dependent promoters associated with the *Trdd* and *Trdj* gene segments, which opens up the chromatin structure to provide accessibility for the recombination machinery in DN2/3a thymocytes (43, 47) (Fig. 2). During  $\beta$ -selection, E $\alpha$  is activated to induce the *Tcra* VJ recombination in DP thymocytes whereas E $\delta$  becomes inactivated (14, 34, 46). During  $\gamma\delta$ -selection, E $\alpha$  is also activated to contribute to the transcription of the rearranged *Tcrd* locus, being required for normal expression of the TCR $\delta$  chain in  $\gamma\delta$  T lymphocytes (34). Interestingly, E $\delta$  is inactivated during  $\beta$ -selection but presumably not during  $\gamma\delta$ -selection (14, 43). Therefore, both E $\delta$  and E $\alpha$  are relevant enhancers to dictate the patterns of the *Tcrd* and

*Tcra* gene germline transcription and V(D)J recombination during thymocyte development (14, 34, 43, 46).

The *Tcra* VJ rearrangements are accomplished through activation of germline transcription, which is initiated at E $\alpha$ -dependent promoters associated with the most 3'-*Trav/Trdv* and 5'-*Traj* gene segments and opens up the chromatin structure to provide accessibility for the recombination machinery in eDP thymocytes (48-50) (Fig. 2). These initial *Tcra* VJ gene segment rearrangements occur in eDP thymocytes and are known as primary *Tcra* VJ recombination (50) (Fig. 2). As a consequence of the nested organization of the *Tcra/Tcrd* locus, the primary *Tcra* VJ recombination results in the deletion of the rearranged *Tcrd* locus in an extra-chromosomal circle (4) (Fig. 2). These extra-chromosomal circles will remain present in all DP and SP thymocytes, as well as in naïve  $\alpha\beta$  T lymphocytes (4). If the primary *Tcra* VJ recombination is not productive, then the secondary *Tcra* VJ recombination involving the more 5'-*Trav/Trdv* and 3'-*Traj* gene segments will occur in lDP thymocytes (51) (Fig. 2). This strategy of successive *Tcra* VJ gene segment rearrangements using the further 5'-*Trav/Trdv* and 3'-*Traj* gene segments permits multiple VJ gene segment rearrangements at each *Tcra* allele to assure the expression of a productive TCR $\alpha$  chain in all lDP thymocytes and to provide a greater probability that positive selection and further  $\alpha\beta$  T lymphocyte maturation can occur.

E $\delta$  is formed by seven protein-bound elements known as  $\delta$ E1,  $\delta$ E2,  $\delta$ E3,  $\delta$ E4,  $\delta$ E5,  $\delta$ E6, and  $\delta$ E7, in a 380-bp DNA fragment (46). Although this fragment is functional in activating transcription of reporter constructs in transient transfection experiments, it is not able to activate rearrangement of a reporter construct in single-copy transgenic mice requiring the presence of two flanking matrix attachment regions for such function (52). E $\delta$  activity depends critically on the binding of the transcription

factors (TFs) Runx1 and c-Myb to  $\delta E3$  (53-55). These TFs are dissociated from  $E\delta$  in the transition from DN3a to DP thymocytes, which is concomitant with the inactivation of the enhancer (14).

$E\alpha$  is formed by four protein-bound elements known as  $T\alpha1$ ,  $T\alpha2$ ,  $T\alpha3$ , and  $T\alpha4$ , in a 275-bp DNA fragment that constitutes the minimal  $E\alpha$  with the correct temporal regulation during thymocyte development (46). The 116-bp  $T\alpha1$ - $T\alpha2$  fragment constitutes the core enhancer with essential binding sites for the constitutive TFs CREB/ATF, TCF-1/LEF-1, Runx1, and Ets-1 that bind cooperatively in an all-or-none fashion (36, 56-58). These TFs are bound to a primed  $E\alpha$  prior to its activation in DN3a thymocytes as well as when the enhancer is fully active in eDP and IDP thymocytes (14, 46, 59). Although the  $T\alpha1$ - $T\alpha2$  fragment is efficient in activating transcription and gene segment recombination at short distances in the context of a transgenic recombination reporter construct, is not sufficient to activate endogenous *Tcra* VJ recombination at large distances (36, 60). In addition, it does not display the proper  $E\alpha$  developmental regulation because it is activated prematurely in DN3a thymocytes, being necessary additional  $T\alpha3$ - $T\alpha4$ -binding TFs including Sp1, GATA-3, E2A, and/or HEB for proper temporal activation of the enhancer (36, 37). Pre-TCR signaling triggers the activation of  $E\alpha$  through the binding of the inducible TFs NFAT, AP-1, and Egr-1 in eDP thymocytes, which are recruited to a pre-assembled  $E\alpha$  enhanceosome formed by the  $E\alpha$ -bound constitutive TFs (18). In IDP thymocytes, prior to positive selection,  $E\alpha$  remains fully active through the induction of strong binding of constitutive TFs such as E2A (18).

### **Developmental chromatin dynamics at *Tcrd/Tcra***

Three-dimensional fluorescence in situ hybridization experiments revealed the *Tcra/Tcrd* locus changes its configuration in DN3a and DP thymocytes (5, 61). In DN3a

thymocytes, the *Tcra/Tcrd* locus adopts a fully contracted configuration (61). In DP thymocytes, the locus adopts a contracted configuration across the most 3'-region of the locus, including the 3' *Trav/Trdv* and the *Traj* gene segments, as well as the C $\alpha$  region, in a region of approximately 0.5-Mb; whereas it adopts an extended configuration across the 5'-region of the locus, including the centrally and upstream position *Trav/Trdv* gene segments (5'-*Trav/Trdv*) in a region of over 1-Mb (61). The fully contracted locus configuration in DN3a thymocytes is thought to facilitate the *Tcrd* VDJ recombination using the diverse *Trdv* gene segments across the entire locus, whereas the *Tcra/Tcrd* configuration in DP thymocytes is believed to facilitate the sequentially ordered primary and secondary *Tcra* VJ recombination (5, 61) (Fig. 2). The molecular mechanism involved in the regulation of the different configurations adopted by the *Tcra/Tcrd* locus during thymocyte development is currently unknown.

Although the 3'-end of the locus remains similarly contracted in DN3a and DP thymocytes, chromosome conformation capture experiments (3C and 4C) have distinguished two distinct functional chromatin interactions within this 0.5-Mb region of DN3a and DP thymocytes using recombinase activating gene-deficient (*Rag*<sup>-/-</sup>) mice (5, 27, 28) (Fig. 3). In *Rag*<sup>-/-</sup> DN3a thymocytes, a functionally relevant discrete chromatin loop mediated by CTCF-bound INT1/2 and CTCF-bound TEAp has been recently identified (28). Active E $\delta$  is present within this chromatin loop attached to the *Trdd* and *Trdj* gene segments constituting a recombination center capable of recruiting the distant *Trdv* gene segments in DN2/3a thymocytes (5, 28). In addition to CTCF, other factors are required for loop formation because it is not present in B lymphocytes where occupancy of the relevant CTCF sites remains intact (28). Interestingly, the formation of this chromatin loop favors the use of the diverse *Trdv* gene segments for *Tcrd* VDJ recombination in DN2/3a thymocytes and indirectly increases the diverse use of the

*Trav/Trdv* gene segments for *Tcra* VJ recombination in DP thymocytes (28). In *Rag*<sup>-/-</sup> eDP thymocytes, binding of the pre-TCR inducible TFs to E $\alpha$  triggers the formation of a chromatin hub through the physical interactions of the E $\alpha$ -bound TFs, TFs bound to the promoters associated with the most 3'-*Trav/Trdv* gene segments and TEAp, and the CTCF bound to HS-1' and each E $\alpha$ -dependent promoter (27, 31) (Fig. 3). This chromatin hub creates an additional recombination center at the 3'-*Trav/Trdv* and 5'-*Traj* gene segments to activate the primary *Tcra* VJ recombination in DP thymocytes (5).

### **E $\alpha$ and E $\delta$ in mature $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytes**

Once the TCR $\alpha\beta$  or TCR $\gamma\delta$  is assembled on the thymocyte surface, E $\alpha$  becomes active in  $\gamma\delta$  T lymphocytes and is essential for normal transcription of the rearranged *Tcrd* locus in these cells, but surprisingly this enhancer is significantly inhibited in SP thymocytes and  $\alpha\beta$  T lymphocytes (34, 62) (Fig. 4). Although E $\delta$  is accepted to be active in  $\gamma\delta$  T lymphocytes, its contribution toward the transcription of the rearranged *Tcrd* locus is negligible due to the strong activity of the E $\alpha$  enhancer in these cells (43) (Fig. 4). In support of inhibition of E $\alpha$  activity in the transition from DP to SP thymocytes and in  $\alpha\beta$  T lymphocytes, E $\alpha$  inhibition is evidenced not only when it is located in its natural location at the unrearranged *Tcra* locus and also when positioned at an ectopic location (62). Furthermore, expression of reporter transgenes directed by the 7.4-kb LCR containing E $\alpha$  is significantly inhibited in splenocytes and  $\alpha\beta$  T lymphocytes compared to thymocytes (30, 63). The transcriptional inhibition of the unrearranged *Tcra* locus by E $\alpha$  in SP thymocytes and  $\alpha\beta$  T lymphocytes suggests this enhancer does not contribute to the transcription of the rearranged *Tcra* locus in these cells (62). In support of this hypothesis, transgenic rearranged *Tcra* constructs containing the 3-kb region from the downstream C $\alpha$ , including E $\alpha$  and HS1', are expressed at very low and variable levels,

ranging from 1 to 20% in  $\alpha\beta$  T lymphocytes (29, 64). Two main questions rise from these findings: How is  $E\alpha$  inactivated and what is the molecular mechanism for transcribing the rearranged *Tcra* locus in SP thymocytes and  $\alpha\beta$  T cells?

Recent experiments using chromatin immunoprecipitation to compare the active and inactive  $E\alpha$  enhanceosomes assembled in DP thymocytes and  $\alpha\beta$  T lymphocytes, respectively, have revealed that the presence of the E2A and HEB TFs is highly diminished in  $\alpha\beta$  T lymphocytes (62) (Fig. 5). No differences in the binding of CTCF to HS-1' were detected between DP thymocytes and  $\alpha\beta$  T lymphocytes, indicating the binding of this factor is not involved in the inhibition of  $E\alpha$  function in  $\alpha\beta$  T cells (31, 33, 62). These results suggest strong binding of E2A and HEB might be essential for  $E\alpha$  activity. The forced expression of E2A in  $\alpha\beta$  T lymphocytes through retroviral transduction cannot recover the enhancer activity of  $E\alpha$ , neither alone or in combination with the upregulation of other TFs in the context of T-cell activation or T helper differentiation (62). Future experiments are necessary to reveal the molecular mechanism of enhancer inactivation in mature  $\alpha\beta$  T cells by evaluating the simultaneous functional effect of E2A and HEB on  $E\alpha$  activity, the analysis of the molecular consequences of different signaling pathways mediated by the pre-TCR and TCR $\alpha\beta$  on  $E\alpha$  function, and a detailed comparison of the  $E\alpha$  enhanceosomes assembled in  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T lymphocytes.

The inhibition of  $E\alpha$  in SP thymocytes and  $\alpha\beta$  T lymphocytes does not preclude the enhanced transcription of the rearranged *Tcra* locus in these cells compared to the unrearranged *Tcra* locus in preselected DP thymocytes in the presence of a fully active  $E\alpha$  (62). The molecular basis for the transcription of the rearranged *Tcra* locus is currently unknown. Although a possible contribution of  $E\alpha$  to the transcription of the rearranged *Tcra* locus cannot be totally rejected, the inhibition of its activity through the



disruption of the functional long-range enhancer-promoter interactions, the loss of activating histone modifications, and the decreased transcription of the unrearranged *Tcra* locus in  $\alpha\beta$  T lymphocytes compared to LDP thymocytes suggests the existence of an  $E\alpha$ -independent mechanism to activate transcription of the rearranged *Tcra* locus in  $\alpha\beta$  T cells (62). In support of this,  $E\alpha$  is not required for copy number-dependent transgenic expression in splenocytes (30). It is possible that different conformations of the unrearranged and rearranged *Tcra* locus, due to the deletion of intergenic sequences, may reveal a novel enhancer or activate an enhancer-independent activity in the rearranged *Tcra* V promoters. The putative novel enhancer must be located upstream of *Trav1* or downstream of *Traj2* gene segments to ensure its retention upon *Tcra* VJ recombination. Interestingly, transcription of reporter transgenes controlled by the LCR is also significantly inhibited in splenocytes and  $\alpha\beta$  T lymphocytes compared to thymocytes, suggesting the additional sequences required for proper transcription the rearranged *Tcra* locus in  $\alpha\beta$  T lymphocytes are not contained within the 7.4-kb LCR fragment (30, 31, 63). A new putative enhancer,  $E3'-J\alpha$ , located between the *Traj3* gene segment and  $C\alpha$  region, and is active in both thymocytes and peripheral  $\alpha\beta$  T lymphocytes has been recently described (42) (Figs. 2-4). However, transgenic constructs containing a rearranged *Tcra* locus with an intact *Traj2* to HS1' are expressed at very low and variable levels in  $\alpha\beta$  T lymphocytes, suggesting the genomic region containing  $E3'-J\alpha$ ,  $E\alpha$ , and HS1' is not sufficient to allow for the strong and stable transcription of the endogenous rearranged *Tcra* locus (29, 64). It will be important to test the relevance of  $E\alpha$  and other putative relevant sequences in the transcription the rearranged *Tcra* locus by their conditional deletion in peripheral  $\alpha\beta$  T lymphocytes and in transgenic mice.

## **Consequences of defects in *Tcra/Tcrd* locus transcription and recombination**

Although beneficial, V(D)J recombination is a dangerous process. Defects in this process at the TCR loci cause for immunodeficiencies and chromosomal translocations that lead to lethal leukemia (4, 65, 66). The most common T-lymphocyte leukemia, T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), is composed by a heterogeneous group of acute leukemias derived from the transformation of thymocytes that are arrested at various developmental stages. 35% of human T-ALLs carry chromosomal translocations involving TCR loci in thymocytes. These aberrant translocations frequently involve the juxtaposition of a strong promoter or enhancer from a TCR gene with a TF gene or a gene involved in cell signaling or differentiation. These illegitimate TCR gene translocations lead to the aberrant expression of their corresponding proteins, resulting in abnormal proliferation and differentiation processes. Among all the aberrant translocations of TCR genes during thymocyte development, those involving the *Tcra/Tcrd* locus have been found in a high percent of human T-ALLs. For example, 5-10% of pediatric and 30% of adult T-ALLs show translocations of the *TLX1* and *TLX3* genes into the *Tcra/Tcrd* locus. These translocations result in the overexpression of the TFs TLX1 and TLX3 and the arrest of DP thymocyte maturation. This arrest is a direct consequence of the recruitment of these TFs to E $\alpha$  (67). Binding of TLX1/TLX3 to E $\alpha$  interferes with the recruitment of Ets-1 and results in reduced enhancer activity as evidenced by decreased gene chromatin accessibility and a drastic inhibition of *Tcra* gene segment recombination. The expression of a functional TCR $\alpha$  chain is needed for the assembly of the TCR $\alpha\beta$  and the maturation of DP to SP thymocytes (34, 68). Other important aberrant translocations involving the *Tcra/Tcrd* locus include those that result in ataxia-telangiectasia (A-T) syndrome, which is rare immunodeficiency disorder due to mutations in the A-T mutated kinase (ATM) that cause chromosome instability and defects in DNA repair (69). An

important percent of A-T syndrome patients develop the disease due to translocations and inversions involving specific breakpoints at the *Tcra/Tcrd* locus and most of all  $ATM^{-/-}$  mice die due to thymic lymphomas derived from and incorrect repair of the breaks that result from V(D)J recombination and aberrant *Tcra/Tcrd* locus translocations (70-75). The knowledge of the precise mechanisms by which the *Tcra/Tcrd* locus transcription and recombination are regulated is important to understand the defective control of these processes that results in disease.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1.- Temporal control of T-cell gene rearrangements and thymocyte development.**

The thymus is represented as a light pink rectangle. Schematic representation of thymocyte maturation depicting the various developmental stages and the TCR gene rearrangements is shown.  $\beta$ -,  $\gamma\delta$ -, and positive selection, which depend on the expression of pre-TCR, TCR $\gamma\delta$  or TCR $\alpha\beta$ , respectively, are indicated in red. T cell maturation is indicated by the transition from yellow to red (maturation to  $\gamma\delta$  T lymphocytes) or green (maturation to  $\alpha\beta$  T lymphocytes).

### **Figure 2.- Representation of the different structure of the *Tcra/Tcrd* locus during T-**

**lymphocyte development.** The V, D, and J gene segments are represented by black narrow rectangles. The C $\delta$  and C $\alpha$  regions are represented by black large rectangles. The 1.6-Mb 5'-locus region includes the *Trav/Trdv* gene segments, and the 0.1-Mb 3'-locus region includes the *Trdd* and *Trdj* gene segments, the C $\delta$  region, the *Trdv5* gene segment, the *Traj* gene segments, and the C $\alpha$  region. Red lines indicate the areas occupied by *Trav/Trdv*, *Trdd* and *Trdj*, and *Traj* gene segments. The position of the functionally relevant regulatory elements is indicated as follows: INT1/2 as green circles, E $\delta$  as a blue circle, TEAp as a purple circle, E3'-J $\alpha$  as an orange circle, LCR as a pink line, E $\alpha$  as a red circle, HS-1' as a black rectangle, and HS2-6 as brown ovals. The dashed lines represent the possible different rearrangements along the *Trav/Trdv* gene segment cluster and the continuous lines represent the *Tcrd* DJ recombination in DN2/3a thymocytes and the primary and secondary *Tcra* VJ recombination in DP thymocytes. The arrows represent regions of active germline transcription. Arrows anchored to a particular V gene segment represent the transcripts originated from specific V promoters. The rearranged *Tcrd* VDJ and *Tcra* VJ transcripts are written in bold blue characters. Low transcription

is represented by dashed lines (low transcription level) whereas the width of the continuous lines is proportional to the level of transcription (medium or high). The deleted *Tcrd* locus in DP and SP thymocytes, and in  $\alpha\beta$  T lymphocytes, is represented as a separate circularized DNA fragment containing the rearranged *Tcrd* and several unrearranged *Trav/Trdv* and *Traj* gene segments produced as a consequence of a *Tcra* VJ recombination.

**Figure 3.-** Different chromatin loops are formed at the 3'-*Tcra/Tcrd* locus in DN3a and DP thymocytes. The V, D, and J gene segments are represented by black narrow rectangles. The C $\delta$  and C $\alpha$  regions are represented by black large rectangles. The diagram indicates the 5'- and the 3'-*Trav/Trdv* gene segments, the *Trdd* and *Trdj* gene segments, the C $\delta$  region, the *Trdv5* gene segment, the *Traj* gene segments, and the C $\alpha$  region. The red lines indicate the areas occupied by 5'-*Trav/Trdv*, 3'-*Trav/Trdv*, *Trdd* and *Trdj*, and *Traj* gene segments. The position of the functionally relevant described regulatory elements is indicated as follows: INT1/2 as green circles, E $\delta$  as a blue circle, TEAp as a purple circle, E3'-J $\alpha$  as an orange circle, LCR as a pink line, E $\alpha$  as a red circle, HS-1' as a black rectangle, and HS2-6 as brown ovals. Curved arrows represent the looping interactions between the regulatory elements demonstrated by 3C and 4C experiments (27, 28). In *Rag*<sup>-/-</sup> DN3a thymocytes, high-frequency looping interactions occur between the INT1/2 elements and the TEAp CTCF sites. In *Rag*<sup>-/-</sup> DP thymocytes, high frequency looping interactions occur between the E $\alpha$ -, TEAp-, and the 3'-*Trav/Trdv* promoters-associated CTCF sites and bound TFs. These interactions are thought to promote the nucleation of recombination centers that facilitate both the *Tcrd* VDJ recombination in DN2/3a thymocytes and the *Tcra* VJ recombination in DP thymocytes involving distant gene segments.

**Figure 4.-** Regulation of transcription of the rearranged *Tcrd* and *Tcra* genes by distant enhancers in  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T lymphocytes, respectively. The V, D, and J gene segments are represented by black narrow rectangles. The C $\delta$  and C $\alpha$  regions are represented by black large rectangles. Red lines indicate the areas occupied by *Trav/Trdv* and *Traj* gene segments. The rearranged *Tcrd* VDJ and *Tcra* VJ transcripts are written in bold blue characters. The position of the functionally relevant described regulatory elements is indicated as follows: E $\delta$  as a blue circle, TEAp as a purple circle, E3'-J $\alpha$  as an orange circle, LCR as a pink line, E $\alpha$  as a red circle, HS-1' as a black rectangle, and HS2-6 as brown ovals. Curved arrows represent the predicted enhancer-promoter interactions based on the functional experiments (34, 43, 62). In  $\gamma\delta$  T lymphocytes, E $\alpha$ , and also presumably E $\delta$ , functionally interact with the rearranged *Trav/Trdv* promoter. The black arrow represents the functionally relevant interaction between E $\alpha$  and the rearranged *Trav/Trdv* promoter in comparison to the presumed interaction between E $\delta$  and the rearranged *Trav/Trdv* promoter, which is represented in grey. In  $\alpha\beta$  T lymphocytes, E $\alpha$  is strongly inhibited and its contribution to the transcription of the rearranged *Tcra* locus is uncertain. The contribution of the recently described E3'-J $\alpha$  enhancer to the transcription of the rearranged *Tcra* locus is also unknown. The putatively weak or uncertain interactions between these enhancers and the rearranged *Trav/Trdv* promoters are represented as dashed light lines.

**Figure 5.-** Different E $\alpha$  enhanceosomes are assembled in IDP thymocytes and  $\alpha\beta$  T lymphocytes. The diagram depicts the TFs that are bound to E $\alpha$  in the indicated cell stages based on genomic footprinting and chromatin immunoprecipitation experiments, as well as *in vitro* experiments (14, 57-59, 62, 76). The TFs are represented by colored

ovals and their identity is indicated. The E $\alpha$  enhanceosome assembled in  $\alpha\beta$  T lymphocytes lacks bound E2A and HEB TFs compared to those assembled in IDP thymocytes (62,76).

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Spanish government (Grant BFU2013-44660R) and the Andalusian government (Grant CTS-6587), which is financed in part by the European Regional Development Fund (ERDF/FEDER).

## REFERENCES

1. Taghon T, Yui MA, Pant R, Diamond RA, & Rothenberg EV (2006) Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* 24(1):53-64.
2. Brekelmans P, *et al.* (1994) Transferrin receptor expression as a marker of immature cycling thymocytes in the mouse. *Cell Immunol* 159(2):331-339.
3. Rothenberg EV & Tanghon T (2005) Molecular genetics of T cell development. *Annu Rev Immunol* 23:601-649.
4. del Blanco B, Angulo U, & Hernández-Munain C (2014) Epigenetic control of T cell receptor locus rearrangements in normal and aberrant conditions. *Epigenetic and Human Health Transcriptional and Epigenetic Mechanisms Regulating Normal and Aberrant Blood Cell Development*(12):295-329.
5. Carico Z & Krangel MS (2015) Chromatin dynamics and the development of the TCRA and TCRD repertoires. *Adv Immunol* 128:307-361.
6. Ciofani M, *et al.* (2004) Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation. *J Immunol* 172(9):5230-5239.
7. Ciofani M & Zuniga-Pflucker JC (2005) Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism. *Nat Immunol* 6(9):881-888.
8. Pui JC, *et al.* (1999) Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11:299-308.
9. Radtke F, *et al.* (1999) Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* (10):547-558.
10. Boudil A, *et al.* (2015) IL-7 coordinates proliferation, differentiation and Tcra recombination during thymocyte b-selection. *Nat Immunol* 16(4):397-405.
11. Kang J, Coles M, & Raulet DH (1999) Defective development of gamma/delta T cells in interleukin 7 receptor- deficient mice is due to impaired expression of T cell receptor gamma genes. *J Exp Med* 190(7):973-982.
12. Wolfer A, Wilson A, Nemir M, MacDonald HR, & Radtke F (2002) Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes. *Immunity* 16(6):869-879.

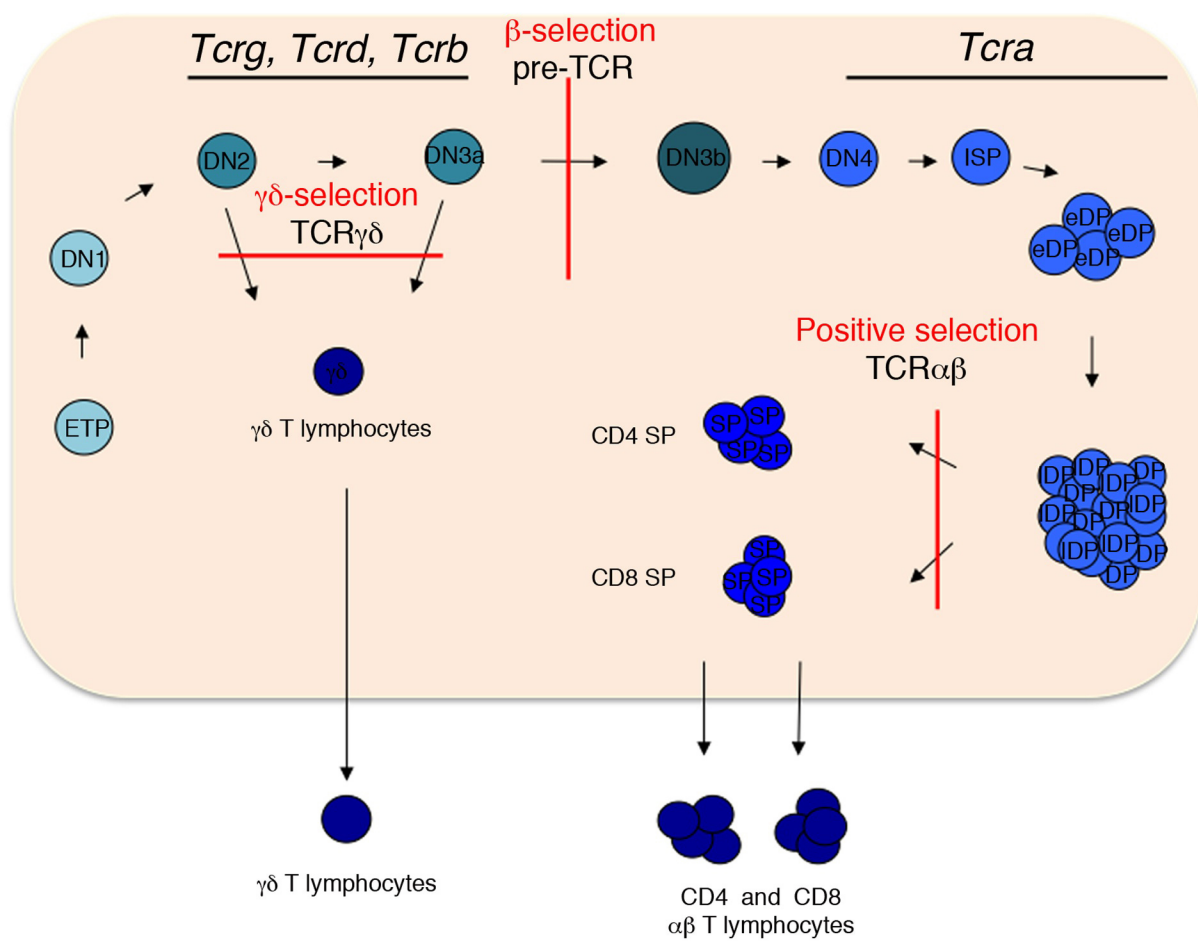
13. Ferrero I, *et al.* (2006) TCRgamma silencing during alphabeta T cell development depends upon pre-TCR-induced proliferation. *J Immunol* 177(9):6038-6043.
14. Hernández-Munain C, Sleckman BP, & Krangel MS (1999) A developmental switch from TCR d enhancer to TCR a enhancer function during thymocyte maturation. *Immunity* 10(6):723-733.
15. Livak F, Tourigny M, Schatz DG, & Petrie HT (1999) Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development. *J Immunol* 162(5):2575-2580.
16. Tani-ichi S, Satake M, & Ikuta K (2011) The pre-TCR signal induces transcriptional silencing of the TCRg locus by reducing the recruitment of STAT5 and Runx to transcriptional enhancers. *Int Immunol* 25:553-563.
17. Tani-ichi S, Satake M, & Ikuta K (2009) Activation of the mouse TCRg enhancers by STAT5. *Int Immunol* 21:1079-1088.
18. del Blanco B, García-Mariscal A, Wiest DL, & Hernández-Munain C (2012) Tcra enhancer activation by inducible transcription factors downstream of pre-TCR signaling. *J Immunol* 188(7):3278-3293.
19. Schlissel MS, Durum SD, & Muegge K (2000) The interleukin 7 receptor is required for T cell receptor g locus accessibility to the V(D)J recombinase. *J Exp Med* 191:1045-1050.
20. Maki K, Sunaga S, & Ikuta K (1996) The V-J recombination of T cell receptor-g genes is blocked in interleukin-7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 184:2423-2427.
21. Durum SK, *et al.* (1998) Interleukin 7 receptor control of T cell receptor gamma gene rearrangement: role of receptor-associated chains and locus accessibility. *J Exp Med* 188(12):2233-2241.
22. Ye SK, *et al.* (2001) The IL-7 receptor controls the accessibility of the TCRg locus by Stat5 and histone acetylation. *Immunity* 15:813-823.
23. Ye SK, *et al.* (1999) Induction of germline transcription in the TCRg locus by Stat5: implications for accessibility control by the IL-7 receptor. *Immunity* 11:213-223.
24. Masui N, Tani-ichi S, Maki K, & Ikuta K (2008) Transcriptional activation of mouse TCR Jg4 germline promoter by STAT5. *Mol Immunol* 45:849-855.
25. Jackson AM & Krangel MS (2006) A role for MAPK in feedback of Tcrb recombination. *J Immunol* 176(11):6824-6830.
26. Glusman G, *et al.* (2001) Comparative genomics of the human and mouse T cell receptor loci. *Immunity* 15:337-349.
27. Shih HY, *et al.* (2012) Tcra gene recombination is supported by a Tcra enhancer- and CTCF-dependent chromatin hub. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(50):3493-3502.
28. Chen L, Carico Z, Shih H-Y, & Krangel MS (2015) A discrete chromatin loop in the mouse Tcra-Tcrd locus shapes the TCRd and TCRA repertoires. *Nat Immunol* 16(10):1085-1093.
29. Diaz P, Cado D, & Winoto A (1994) A locus control region in the T cell receptor alpha/delta locus. *Immunity* 1(3):207-217.
30. Ortiz BD, Cado D, & Winoto A (1999) A new element within the T-cell receptor alpha locus required for tissue-specific locus control region activity. *Mol Cell Biol* 19(3):1901-1909.



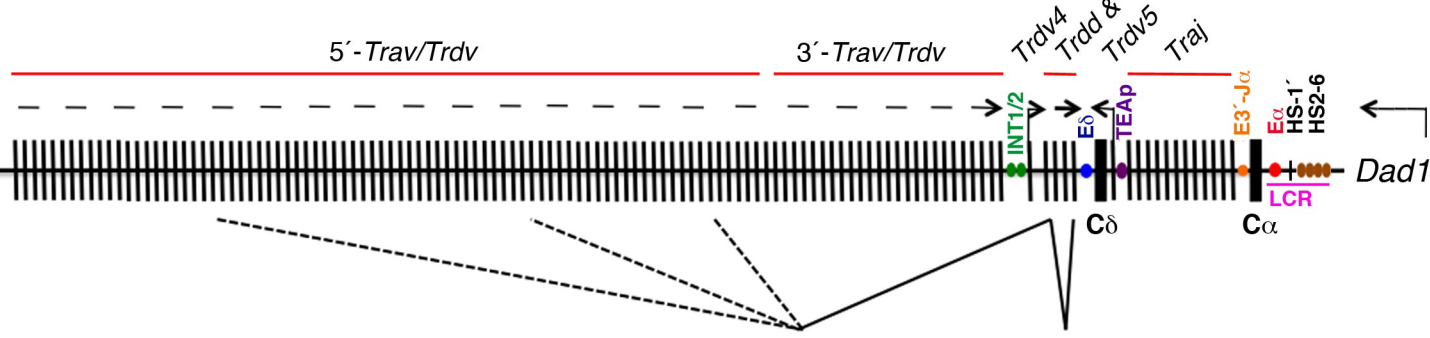
31. Ortiz BD, Cado D, Chen V, Diaz PW, & Winoto A (1997) Adjacent DNA elements dominantly restrict the ubiquitous activity of a novel chromatin-opening region to specific tissues. *EMBO J* 16(16):5037-5045.
32. Gomos-Klein J, Harrow F, Alarcón J, & Ortiz BD (2007) CTCF-independent, but not CTCF-dependent, elements significantly contribute to TCR- $\alpha$  locus control region activity. *J Immunol* 179:1088-1095.
33. Magdinier F, Yusufzai TM, & Felsenfeld G (2004) Both CTCF-dependent and -independent insulators are found between the mouse T cell  $\alpha$  and Dad1 genes. *J Biol Chem* 279:25381-25389.
34. Sleckman BP, Bardon CG, Ferrini R, Davidson L, & Alt FW (1997) Function of the TCR  $\alpha$  enhancer in  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells. *Immunity* 7(4):505-515.
35. Lauzurica P & Krangel MS (1994) Temporal and lineage-specific control of T cell receptor  $\alpha/\delta$  gene rearrangement by T cell receptor  $\alpha$  and  $\delta$  enhancers. *J Exp Med* 179(6):1913-1921.
36. Roberts JL, Lauzurica P, & Krangel MS (1997) Developmental regulation of VDJ recombination by the core fragment of the T cell receptor  $\alpha$  enhancer. *J Exp Med* 185(1):131-140.
37. Balmelle N, Zamarreño N, Krangel MS, & Hernández-Munain C (2004) Developmental activation of the TCR  $\alpha$  enhancer requires functional collaboration among proteins bound inside and outside the core enhancer. *J Immunol* 173(8):5054-5063.
38. Capone M, *et al.* (1993) TCR  $\beta$  and TCR  $\alpha$  gene enhancers confer tissue- and stage- specificity on V(D)J recombination events. *EMBO J* 12(11):4335-4346.
39. Zhong X-P & Krangel MS (1999) Enhancer-blocking activity within the DNase I hypersensitive site 2 to 6 region between the TCR $\alpha$  and Dad1 genes. *J Immunol* 163(1):295-300.
40. Ortiz BD, Harrow F, Cado D, Santoso B, & Winoto A (2001) Function and factor interactions of a locus control region element in the mouse T cell receptor- $\alpha$ /Dad1 gene locus. *J Immunol* 167:3836-3845.
41. Harrow F, Amuta JU, Hutchinson SR, Akwaa F, & Ortiz BD (2004) Factors binding a non-classical cis-element prevent heterochromatin effects on locus control region activity. *J Biol Chem* 279(17):17842-17849.
42. Kucerová-Levisohn M, Knirr S, Mejia RI, & Ortiz BD (2015) The 3'-Ja region of the TCR $\alpha$  locus bears gene regulatory activity in thymic and peripheral T cells. *Plos One* 10(7):e0132856.
43. Monroe RJ, *et al.* (1999) Developmental regulation of TCR  $\delta$  locus accessibility and expression by the TCR  $\delta$  enhancer. *Immunity* 10(5):503-513.
44. Hawwari A & Krangel MS (2005) Regulation of TCR  $\delta$  and a repertoires by local and long-distance control of variable gene segment chromatin structure. *J Exp Med* 202(4):467-472.
45. Hao B & Krangel MS (2011) Long-distance regulation of fetal Vd gene segment TRDV4 by the Tcrd enhancer. *J Immunol* 187(5):2484-2491.
46. Hernández-Munain C (2015) Recent insights into the transcriptional control of the Tcr $\alpha$ /Tcrd locus by distant enhancers during the development of T-lymphocytes. *Transcription* 6(4):65-73.
47. McMurry MT, Hernández-Munain C, Lauzurica P, & Krangel MS (1997) Enhancer control of local accessibility to V(D)J recombinase. *Mol Cell Biol* 17(8):4553-4561.

48. Abarrategui I & Krangel MS (2006) Regulation of T cell receptor-alpha gene recombination by transcription. *Nat Immunol* 7(10):1109-1115.
49. Abarrategui I & Krangel MS (2007) Noncoding transcription controls downstream promoters to regulate T-cell receptor a recombination. *EMBO J* 26(20):4380-4390.
50. Hawwari A, Bock C, & Krangel MS (2005) Regulation of T cell receptor a gene assembly by a complex hierarchy of germline Ja promoters. *Nat Immunol* 6(5):481-489.
51. Hawwari A & Krangel MS (2007) Role for rearranged variable gene segments in directing secondary T cell receptor a recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(3):903-907.
52. Zhong XP, Carabana J, & Krangel MS (1999) 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* 96(21):11970-11975.
53. Hernández-Munain C & Krangel MS (1994) Regulation of the T-cell receptor d enhancer by functional cooperation between c-Myb and core-binding factors. *Mol Cell Biol* 14(1):473-483.
54. Hernández-Munain C, Lauzurica P, & Krangel MS (1996) Regulation of T cell receptor d gene rearrangement by c-Myb. *J Exp Med* 183(1):289-293.
55. Lauzurica P, Zhong XP, Krangel MS, & Roberts JL (1997) Regulation of T cell receptor  $\delta$  gene rearrangement by CBF/PEBP2. *J Exp Med* 185(7):1193-1201.
56. Hernández-Munain C, Roberts JL, & Krangel MS (1998) Cooperation among multiple transcription factors is required for access to minimal T-cell receptor a-enhancer chromatin in vivo. *Mol Cell Biol* 18(6):3223-3233.
57. Giese K, Kingsley C, Kirshner JR, & Grosschedl R (1995) Assembly and function of a TCR  $\alpha$  enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Dev* 9(8):995-1008.
58. Mayall TP, Sheridan PL, Montminy MR, & Jones KA (1997) Distinct roles for P-CREB and LEF-1 in TCR  $\alpha$  enhancer assembly and activation on chromatin templates in vitro. *Genes Dev* 11(7):887-899.
59. Spicuglia S, *et al.* (2000) TCRa enhancer activation occurs via a conformational change of a pre-assembled nucleo-protein complex. *EMBO J* 19(9):2034-2045.
60. Bassing CH, *et al.* (2003) 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* 100(5):2598-2603.
61. Shih HY & Krangel MS (2010) Distinct contracted conformations of the Tcra/Tcrd locus during Tcra and Tcrd recombination. *J Exp Med* 207:1835-1841.
62. del Blanco B, Angulo Ú, Krangel MS, & Hernández-Munain C (2015) The Tcra enhancer is inactivated in ab T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(14):1744-1753.
63. Harrow F & Ortiz BD (2005) The TCRa locus control region specifies thymic, but not peripheral, patterns of TCRa gene expression. *J Immunol* 175(10):6659-6667.
64. von Boehmer H (1990) Developmental biology of T cells in T cell-receptor transgenic mice. *Annu Rev Immunol* 8:531-556.
65. Van Vlierberghe P & Ferrando A (2012) The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 122(10):3398-3406.

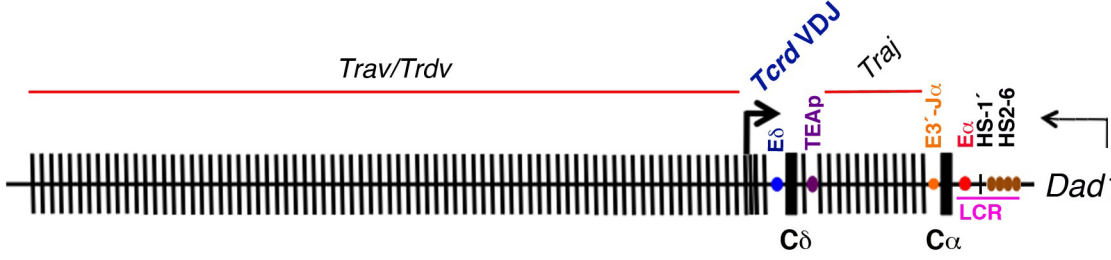
66. Aifantis I, Raetz E, & Buonamici S (2008) Molecular pathogenesis of T-cell leukemia and lymphoma. *Nat Immunol* 8:380-390.
67. Dadi S, *et al.* (2012) TLX homoedomain oncogenes mediate T cell maturation arrest in T-ALL via interaction with ETS1 and suppression of TCRa gene expression. *Cancer Cell* 21(4):563-576.
68. Shinkai Y, *et al.* (1993) Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science* 259(5096):822-825.
69. Bednarski JJ & Sleckman BP (2012) Lymphocyte development: integration of DNA damage response signaling. *Adv Immunol* 116:175-204.
70. Liyanage M, *et al.* (2000) Abnormal rearrangement within the a/d T-cell receptor locus in lymphomas from Atm-deficient mice. *Blood* 96:1940-1946.
71. Zha S, *et al.* (2010) ATM-deficient thymic lymphoma is associated with aberrant Tcrd rearrangement and gene amplification. *J Exp Med* 207:1369-1380.
72. Isoda T, *et al.* (2012) Process for immune defect and chromosomal translocation during early thymocyte development lacking ATM. *Blood* 120(4):789-799.
73. Bredemeyer AL, *et al.* (2006) ATM stabilized DNA double-strand-break complexes during V(D)J recombination. *Nature* 442:466-470.
74. Matei IR, *et al.* (2007) ATM deficiency disrupts Tcra locus integrity and the maturation of CD4+CD8+ thymocytes. *Blood* 109(5):1887-1896.
75. Vacchio MS, Olaru A, Livak F, & Hodes RJ (2007) ATM deficiency impairs thymocyte maturation because of defective resolution of T cell receptor a locus coding end breaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(15):6323-6328.
76. del Blanco B, Roberts JL, Zamarréño N, Balmelle-Devaux N, & Hernández-Munain C (2009) Flexible stereospecific interactions and composition within nucleoprotein complexes assembled on the TCRa gene enhancer. *J Immunol* 183(3):1871-1883.



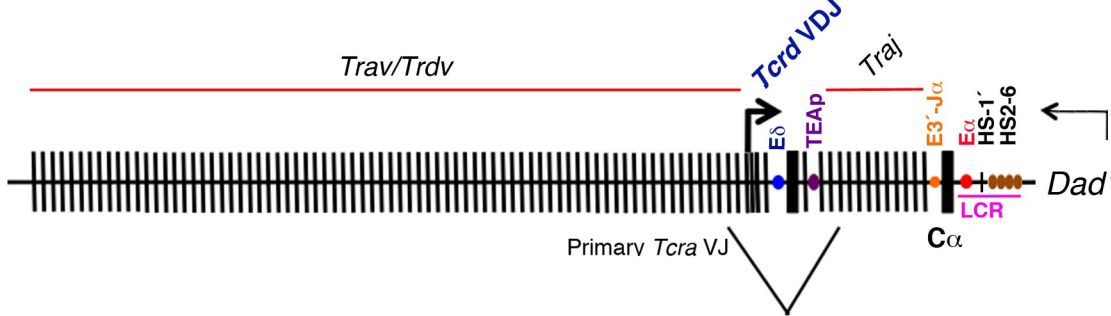
**DN2/3a THYMOCYTES**



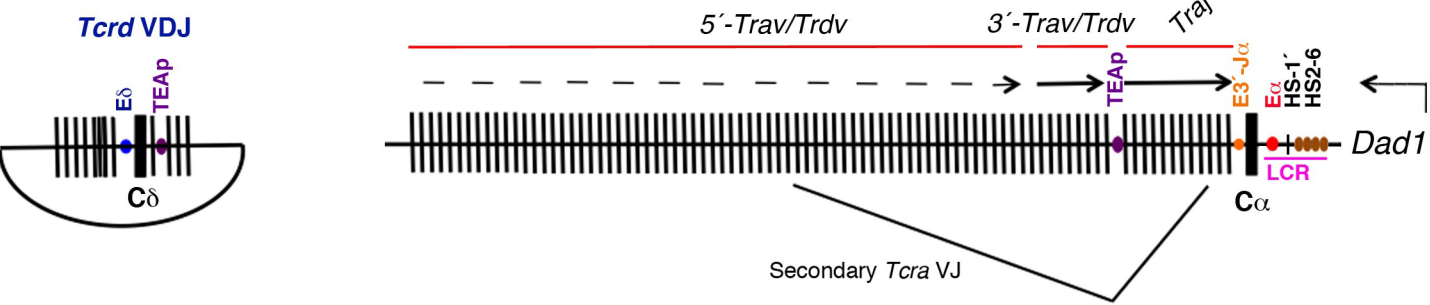
**$\gamma\delta$  T LYMPHOCYTES**



**eDP THYMOCYTES**



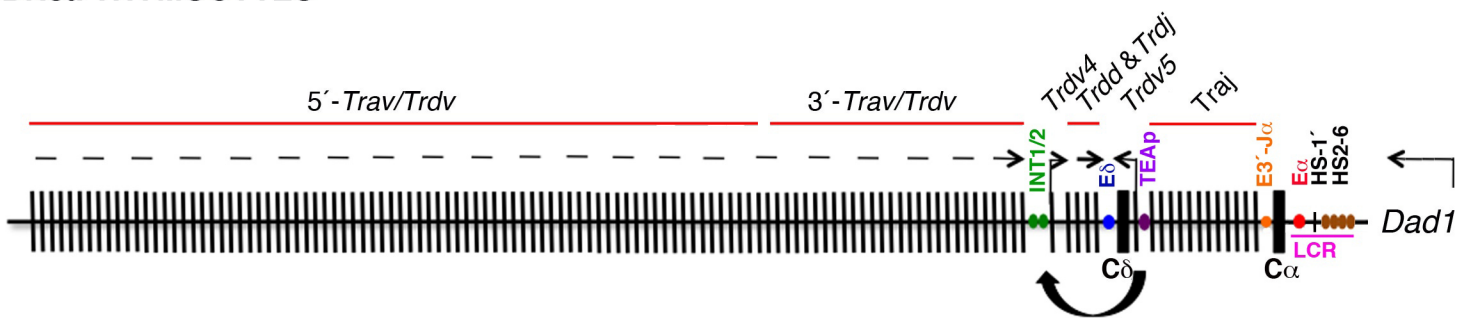
**IDP THYMOCYTES**



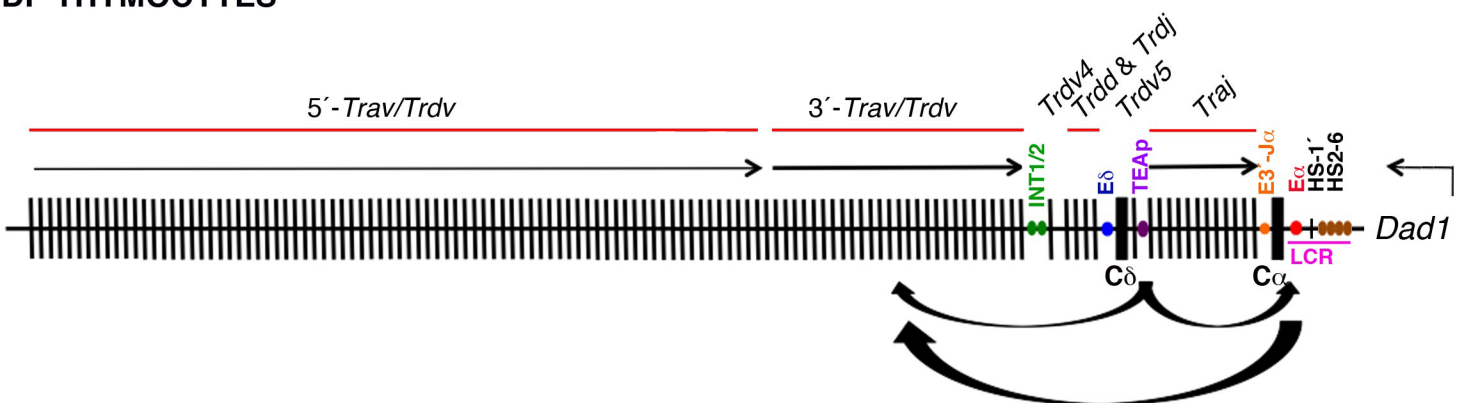
**SP THYMOCYTES &  $\alpha\beta$  T LYMPHOCYTES**



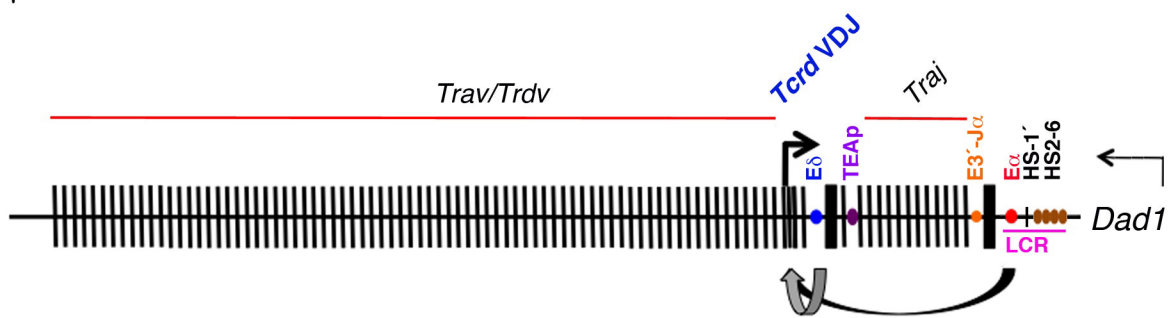
### DN3a THYMOCYTES



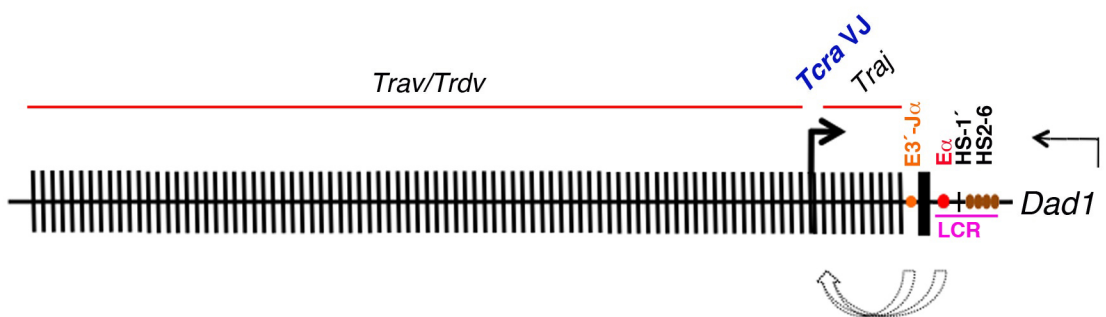
### DP THYMOCYTES



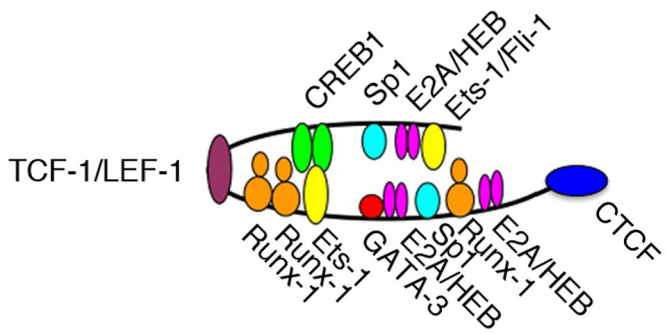
$\gamma\delta$  T LYMPHOCYTES



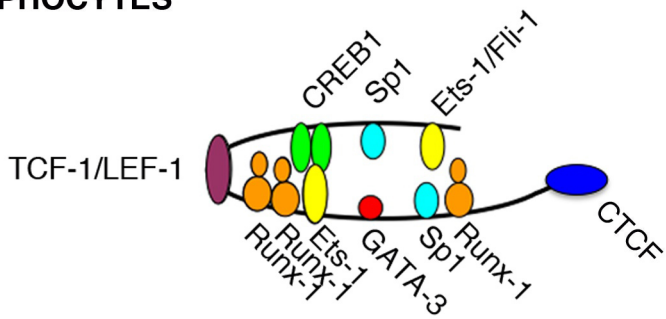
$\alpha\beta$  T LYMPHOCYTES



**DP THYMOCYTES**



**$\alpha\beta$  T LYMPHOCYTES**





1 The Journal Immunology (2019). doi:10.4049/jimmunol.1801650

2 **Notch signaling controls transcription via the recruitment of RUNX1 and MYB to**  
3 **enhancers during T cell development\***

4

5 **Short title: Notch-dependent *Tcrd/Terg* transcription**

6

7 *Alonso Rodríguez-Caparrós<sup>†</sup>, Vanina García<sup>†,§</sup>, Áurea Casal<sup>†</sup>, Jennifer López-Ros<sup>†</sup>,*  
8 *Alberto García-Mariscal<sup>†,‡</sup>, Shizue Tani-ichi<sup>¶,||</sup>, Koichi Ikuta<sup>¶</sup> and Cristina Hernández-*  
9 *Munain<sup>†,#</sup>*

10 <sup>†</sup>Department of Cellular Biology and Immunology, Institute of Parasitology and  
11 Biomedicine “López-Neyra” - Spanish National Research Council (IPBLN-CSIC), PTS,  
12 18016-Granada, Spain

13 <sup>¶</sup>Laboratory of Immune Regulation, Department of Virus Research, Institute for Frontier  
14 Life and Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8587, Japan

15 <sup>§</sup>Current-affiliation: Centre for Biomolecular Sciences, The University of Birmingham,  
16 University Park Campus, Clifton Bv., NG7 2RD, United Kingdom

17 <sup>‡</sup>Current affiliation: Division of Translational Cancer Research, Lund University, 221 00  
18 Lund, Sweden

19 <sup>||</sup>Current affiliation: Laboratory of Biological Chemistry, Human Health Sciences, Graduate  
20 School of Medicine, and Laboratory of Immune Regulation, Department of Virus Research,  
21 Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

22 <sup>#</sup>Corresponding author: email: [chmunain@ipb.csic.es](mailto:chmunain@ipb.csic.es); phone: +34-958-181646; fax: +34-  
23 958-181632.

24

25 **ABSTRACT**

26 *Tcrd* and *Tcrg* display identical developmental programs that depend on the activity of the  
27 enhancers E $\delta$  and E $\gamma$ , being “on” in pre- $\beta$ -selection thymocytes to activate transcription and  
28 V(D)J recombination of the unrearranged genes and “off” in post- $\beta$  selection CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>  
29 double-positive (DP) thymocytes to inhibit transcription of the rearranged genes and avoid  
30 the expression of TCR $\delta$  and TCR $\gamma$  chains in  $\alpha\beta$  T lymphocytes. E $\delta$  and E $\gamma$  activity depends  
31 on transcription factor binding to essential Runx and Myb sites, and parallels that of Notch  
32 signaling. We performed Notch gain- and loss-of-function experiments and found that  
33 Notch signaling activates *Tcrd* and *Tcrg* transcription by favoring the recruitment of  
34 RUNX1 and MYB to the enhancers. Our results suggest that the dissociation of RUNX1  
35 and MYB from E $\delta$  and E $\gamma$  chromatin in DP thymocytes that results in enhancer inactivation  
36 is caused by decreased Notch signaling triggered by pre-TCR signaling, thereby  
37 deciphering the molecular mechanism of *Tcrd* and *Tcrg* silencing during  $\beta$ -selection. These  
38 findings reveal a novel molecular mechanism for gene regulation via Notch signaling  
39 through the recruitment of RUNX1 and MYB to enhancer chromatin during thymocyte  
40 development.

41

42 **KEY POINTS**

43 Notch favors RUNX1 and MYB recruitment to activate enhancer-dependent transcription  
44 These results decipher the mechanism for *Tcrd* and *Tcrg* silencing during  $\beta$ -selection

45

## 46 INTRODUCTION

47 T cell development is a tightly regulated process in which rare circulating  
48 hematopoietic stem cells enter the thymus, where they receive the Notch signaling required  
49 for T cell commitment (1), then progress through a series of developmental stages that can  
50 be distinguished based on the expression of specific surface markers: CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double-  
51 negative (DN)\*\* , CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double-positive (DP), and CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> single-positive (SP)  
52 thymocytes (Figure 1A). Four DN populations, DN1-4, are distinguished based on the  
53 expression of CD25 and CD44, whereas two DN3 populations, DN3a and DN3b, are  
54 distinguished based on the expression of CD27. This process can be divided into two  
55 phases based on the dependency of Notch or TCR signaling (1, 2): a Notch-dependent  
56 phase, which drives DN1 to DN3a thymocyte development, and a pre-TCR/TCR-dependent  
57 phase, which drives DN3a thymocyte to αβ or γδ T lymphocyte development. In addition,  
58 signaling mediated by the IL-7R is also required for T cell survival and maturation,  
59 decaying at the thymocyte transition from DN4 to DP (3, 4).

60 During T cell differentiation, temporally regulated specific rearrangements of the V,  
61 D and J gene segments occur at *Tcra*, *Tcrb*, *Tcrd* and *Tcrg* (Figure 1A) allowing cell  
62 surface expression of one of the three possible TCRs, pre-TCR, TCRγδ or TCRαβ, to drive  
63 specific selection processes that permit thymocytes to mature into functional αβ or  
64 γδ lymphocytes (1, 5). Developmental expression of the different TCRs depends on the  
65 timing of the V(D)J recombination process at the different genes: *Tcrg* and *Tcrd*  
66 recombination takes place in DN2/3a thymocytes, *Tcrb* rearrangements are completed in  
67 DN3a thymocytes and *Tcra* rearrangements occur in DN4/DP thymocytes. Successful *Tcrg*  
68 and *Tcrd* rearrangements permit the expression of TCRγδ in DN2/3a thymocytes, driving

69 cell differentiation to  $\gamma\delta$  T lymphocytes in a process known as  $\gamma\delta$ -selection. Successful *Tcrb*  
70 rearrangements in DN3a thymocytes permit the expression of a functional TCR $\beta$  chain that  
71 assembles with a surrogate TCR $\alpha$  chain, pre-T $\alpha$ , to form a pre-TCR that drives the  
72 transition of DN3a to DP via DN3b, DN4, and immature SP thymocytes in a process  
73 known as  $\beta$ -selection. Successful *Tcra* rearrangements in DP thymocytes permit assembly  
74 with the previously selected TCR $\beta$  chain to express TCR $\alpha\beta$ . The affinity for the antigen of  
75 the TCR $\alpha\beta$  expressed in DP thymocytes will determine the selection of a few cells that will  
76 survive and differentiate into CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> SP thymocytes that migrate to the periphery as  
77 mature  $\alpha\beta$  T lymphocytes. As a consequence of  $\beta$ -selection, transcription of rearranged  
78 *Tcrd* present on extrachromosomal circles and rearranged *Tcrg* in DP thymocytes and  $\alpha\beta$  T  
79 lymphocytes is stably inhibited to avoid expression of TCR $\delta$  and TCR $\gamma$  chains that could  
80 interfere with the normal assembly of functional TCR $\alpha\beta$  (6-8).

81           Signaling mediated by Notch, IL-7R and pre-TCR is essential for expression of the  
82 TCRs: Notch signaling is required for expression of the pre-TCR components, pre-T $\alpha$  and  
83 TCR $\beta$ , via the regulation of *Ptcra* transcription and V $\beta$ D $\beta$ J $\beta$  recombination (2, 9-11); IL-  
84 7R signaling is essential for *Tcrg* transcription and recombination and thus the generation  
85 of  $\gamma\delta$  T cells (12-14); and pre-TCR signaling results in the inhibition of *Notch1*, the  
86 activation of *Tcra* transcription and rearrangement together with the transcriptional  
87 inhibition of *Tcrd* and *Tcrg*, and the generation of  $\alpha\beta$  T cells (6, 15-17).

88           Temporal regulation of germline transcription and V(D)J rearrangements at TCR  
89 loci are controlled through the activity of transcriptional enhancers during cell development  
90 and are dependent on the signaling received by thymocytes during differentiation (5). *Tcrd*

91 is present in a nested organization, with *Tcra* within a 1.8 Mb single genetic locus,  
92 *Tcra/Tcrd*, at chromosome 14 (Figure 1B). The 1.7 Mb-5'-end region includes over 100  
93  $V\alpha/\delta$  segments, and the 0.1 Mb-3'-end region includes *Tcrd*, with the  $D\delta$  and  $J\delta$  segments,  
94 the *Tcrd* enhancer ( $E\delta$ ), the *Trdc* C region ( $C\delta$ ) and the *Trdv5* segment, followed by the  $J\alpha$   
95 segments, the *Trac* C region ( $C\alpha$ ) and the *Tcra* enhancer ( $E\alpha$ ). This genetic structure  
96 determines that  $V\alpha J\alpha$  rearrangements, which result in the deletion of *Tcrd*, preclude the  
97 coexistence of *Tcra* and *Tcrd* on the same chromosome. *Tcrg* spans a region of 0.2 Mb at  
98 chromosome 13 and consists of three functional clusters containing  $V\gamma$  and  $J\gamma$  segments and  
99 a *Trgc* C region, including  $C\gamma 1$ ,  $C\gamma 2$  and  $C\gamma 4$  (Figure 1C). *Tcrg* includes a 3' enhancer  
100 associated with each cluster,  $E\gamma 1-4$ , and an additional 5' element, HSA. Enhancer function  
101 is responsible for activation of *Tcrd* and *Tcrg* and inactivation of *Tcra* transcription in  
102 DN3a thymocytes and the inactivation of *Tcrd* and *Tcrg* transcription in DP thymocytes (7,  
103 18-21). Therefore, based on this enhancer-dependent regulation of an alternative *Tcrd/Tcrg*  
104 and *Tcra* transcription pattern,  $E\delta$  and  $E\gamma$  are inhibited along with the activation of  $E\alpha$  in  
105 the thymocyte transition from DN3a to DP (6, 7). Thus, these enhancers function as a  
106 developmental switch during thymocyte maturation via active  $E\delta/E\gamma$  and inactive  $E\alpha$  in  
107 DN2/3a cells and via inactive  $E\delta/E\gamma$  and active  $E\alpha$  in DP cells (7, 20, 22). Pre-TCR or  
108 related signaling pathway is likely responsible for  $E\delta/E\gamma$  inactivation through the  
109 dissociation of bound transcription factors (TFs) to essential sites and  $E\alpha$  activation  
110 through the recruitment of inducible TFs to a primed enhancer (7, 17, 20). Pre-TCR  
111 signaling inhibits *Notch1* transcription (15, 16), as Notch signaling is strong in DN2/3a  
112 thymocytes, corresponding with the transcription and rearrangement of *Tcrg* and *Tcrd*, and  
113 very weak in DN4/DP thymocytes when *Tcrg/Tcrd* transcription is inhibited. Here, we

114 performed Notch gain- and loss-of-function experiments in mouse thymocytes and  
115 SCID.adh cells to show that this signaling is responsible for the efficient recruitment of  
116 RUNX1 and MYB to E $\delta$  and E $\gamma$  and thus enhancer-dependent *Tcrd* and *Terg* transcription  
117 in DN3a thymocytes. Our results reveal that the dissociation of RUNX1 and MYB from E $\delta$   
118 and E $\gamma$  in DP thymocytes caused by decreased Notch signaling triggered by pre-TCR  
119 signaling constitutes the molecular mechanism of *Tcrd* and *Terg* transcriptional silencing  
120 during  $\beta$ -selection. Furthermore, our data reveal a novel mechanism for activating Notch-  
121 dependent transcription during thymocyte development via the efficient recruitment of  
122 RUNX1 and MYB to specific regulatory regions.

123

## 124 MATERIAL AND METHODS

### 125 Mice

126 *Rag2*<sup>-/-</sup>, *Rag2*<sup>-/-</sup> x *Tcrb* transgene (*Rag2*<sup>-/-</sup>xβtg), *Rag2*<sup>-/-</sup> x *Eα*<sup>-/-</sup> (*Rag2*<sup>-/-</sup>x*Eα*<sup>-/-</sup>) and *Rag2*<sup>-/-</sup> x  
127 βtg x *Eα*<sup>-/-</sup> (*Rag2*<sup>-/-</sup>xβtg*Eα*<sup>-/-</sup>) were described previously (19, 23, 24). *Rag2*<sup>-/-</sup> and *Rag2*<sup>-/-</sup>xβtg  
128 mice were obtained from Taconic. Adult 4- to 8-wk-old *Rag2*<sup>-/-</sup>, *Rag2*<sup>-/-</sup>xβtg, *Rag2*<sup>-/-</sup>x*Eα*<sup>-/-</sup> and  
129 *Rag2*<sup>-/-</sup>xβtg*Eα*<sup>-/-</sup> mice and embryonic d 14.5 (E14.5) *Rag2*<sup>-/-</sup>xβtg*Eα*<sup>-/-</sup> mice were used.  
130 Female and male mice were used randomly. Mice were maintained in the Animal  
131 Experimentation Unit at the IPBLN-CSIC under pathogen-free conditions. All animal work  
132 followed protocols approved by the CSIC and Junta de Andalucía Bioethical Committees.

### 133 Cells

134 SCID.adh cells were previously described (25) and cultured in RPMI medium with 10% FCS,  
135 sodium pyruvate, nonessential aa, glutamine, penicillin/streptomycin (P/S) and 50 μM 2-ME  
136 (Life Technologies). Jurkat cells were cultured in RPMI medium with 10% FCS, glutamine  
137 and penicillin/streptomycin. COS7 and HEK-293T cells were maintained in DMEM with 10%  
138 FCS, glutamine and P/S. OP9 and OP9-DL1 stromal cells were cultured in α-MEM medium  
139 with 20% FCS, P/S and 50 μM 2-ME. Cells were incubated at 5% CO<sub>2</sub> and 37°C.

### 140 Embryonic thymocyte cultures

141 E14.5 *Rag2*<sup>-/-</sup>xβtg*Eα*<sup>-/-</sup> thymocytes were cultured on OP9 or OP9-DL1 monolayers α-MEM  
142 medium with 20% FCS, P/S, 50 μM 2-ME, 5 ng/ml murine rIL-7 and 5 ng/ml human rFlt3  
143 ligand. (PeproTech) as described (26). Cells were incubated at 5% CO<sub>2</sub> and 37°C.



144 ***In vitro* cell signaling stimulation and inhibition**

145 SCID.adh and Jurkat cells ( $1 \times 10^5$  cells/ml) were stimulated in culture with 20 ng/ml of PMA +  
146 0.5  $\mu$ g/ml of ionomycin (P+I) (Sigma-Aldrich) and/or 10 ng/ml of murine rIL-7 for 24 or 48  
147 h. The  $\gamma$ -secretase inhibitor (GSI) 7(N-((3,5-difluorophenyl)-1-alanyl)-s-phenyl-glycine t-  
148 butyl ester) (DAPT)(Selleckchem), also known as GSI-IX, was dissolved at 1 mg/ml in water  
149 and kept at  $-80^\circ\text{C}$  as stock solution. For Notch signaling inhibition, 16  $\mu$ M (SCID.adh cells) or  
150 20  $\mu$ M (Jurkat cells) of DAPT was added for 24 or 48 h.

151 **Induction of DN3a to DP thymocyte differentiation**

152 For *in vivo* thymocyte differentiation: Adult  $Rag2^{-/x}\beta\text{tgxE}\alpha^{-/}$  mice were i.p.-injected with 150  
153  $\mu$ g of purified CD3 $\epsilon$  mAb from the 145-2C11 hybridoma and sacrificed at the indicated times.  
154 Thymocyte differentiation was evaluated by flow cytometry using CD4-FITC, CD8-PE and  
155 CD25-APC Abs (BD Biosciences Pharmingen) using FACS (Becton Dickinson Excalibur  
156 Analyzer).

157 For *in vitro* thymocyte differentiation: E14.5 thymocytes from  $Rag2^{-/x}\beta\text{tgxE}\alpha^{-/}$  mice were  
158 harvested and cocultured on OP9 and OP9-DL1 cell monolayers (26). Cocultures were  
159 performed in 24-well plates with  $\alpha$ -MEM medium along with  $\alpha$ -MEM with 20% FCS, P/S, 50  
160  $\mu$ M 2-ME, 5 ng/ml murine rIL-7 and 5 ng/ml human rFlt3 ligand. Cocultured thymocytes were  
161 harvested and sorted based on cell staining using CD4-FITC and CD8-PE Abs (BD  
162 Biosciences Pharmingen) using a FACS (Becton Dickinson Aria III).

163 **Viral transduction**

164 MigR1 and MigR-expressing ICN1 retroviral plasmids were previously described (27).  
165 MISSION lentiviral vectors were purchased from Sigma: SHC002 (control shRNA), SHC  
166 (*shRunx1*-RNA) and SHC (*shMyb*-RNA).

167 Retroviral transductions of Jurkat cells and murine E14.5 thymocytes with MigR-containing  
168 viruses were performed using RetroNectin (Takara) and spinoculation. Nontissue culture-  
169 treated plates (Corning) were incubated with RetroNectin at 40-50 ng/ml overnight at 40°C.  
170 RetroNectin was removed, and viral supernatant was added and spun at 2000 g for 2 h at 32°C.  
171 Unbound virus was removed, and cells were added in RPMI with 10% FCS at  $1 \times 10^6$  cells/ml  
172 and then incubated for 4 h or overnight.

173 Viral transduction of SCID.adh cells was performed by spinoculation. MigR retroviruses were  
174 produced by LipoD (SignaGen Laboratories)-mediated transfection of 293T cells with one of  
175 the MigR vectors in conjunction with packaging plasmids containing the ecotropic envelope  
176 and the *gag-pol* genes. Lentiviruses for transducing SCID.adh cells were produced by LipoD-  
177 mediated transfection of 293T cells with one of the MISSION lentiviral vectors (Sigma-  
178 Aldrich) in conjunction with the ecotropic envelope expressing plasmid and the pD7.8  
179 plasmids. The *shRunx1* MISSION vectors used were TRCN0000338489 (*shRunx1*#89) and  
180 TRCN0000013660 (*shRunx1*#60), and the *shMyb* MISSION vectors used were  
181 TRCN0000042498 (*shMyb*#98) and TRCN0000042501 (*shMyb*#01). Virus-containing  
182 supernatant was harvested 2 d after transfection. 1 ml of medium containing 8 ng of polybrene  
183 was added to cells in 24-well plates. Plates were centrifuged at 1400 g for 45 min at room  
184 temperature and incubated for 5 h. 1 ml of complete medium was added per well. MigR GFP<sup>+</sup>  
185 were isolated by flow cytometry using a FACS (Becton Dickinson Aria III), whereas  
186 transduced cells with MISSION lentiviruses were isolated based on resistance to puromycin.

187 **Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)**

188 Total RNA was extracted, and cDNA was obtained using qScript cDNA SuperMix (Quanta  
189 Biosciences, Inc.) to perform qPCR as previously described (28) in duplicate using Bio-  
190 Rad SYBR-Green master mix and a Bio-Rad CFX-96 System. The transcription of  
191 individual genes was calculated using the  $\Delta$ Ct method and normalized to *Actb* or *ACTB*  
192 transcription. The primers used are listed in Table S1. The primers for *Actb*, *Runx1* and  
193 *Runx3* were previously described (29).

194 **Quantitative chromatin immunoprecipitation (qChIP)**

195 At least three independent qChIP experiments were performed on  $10^7$  cells with 5-10  $\mu$ g of  
196 RUNX1 (sc-28679 from Santa Cruz Biotechnology or ab23980 from Abcam), MYB (sc-  
197 517 from Santa Cruz Biotechnology or 05-175, clone 1-1, from Merck Millipore) or control  
198 antibodies as previously described (28). The primers used are listed in Table S1. The  
199 primers for qChIP of *E $\alpha$* , *E $\alpha$*  CTCF and *Oct2* were previously described (17, 28).

200 **Construction of reporter plasmids and luciferase assays**

201 The reporter plasmids containing the firefly *luciferase* reporter gene (LUC) J $\alpha$ 49p-LUC,  
202 J $\alpha$ 49p-LUC-E $\alpha$ 386, V $\delta$ 1p-LUC and TEAp-LUC plasmids were previously described (17, 30).  
203 To generate E $\delta$ 370-V $\delta$ 1p-LUC, E $\delta$ 370mRunx-V $\delta$ 1p-LUC, E $\delta$ 370mMyb-V $\delta$ 1p-LUC, E $\delta$ 280-  
204 V $\delta$ 1p-LUC, E $\delta$ 160-V $\delta$ 1p-LUC, E $\delta$ 60-V $\delta$ 1p-LUC and E $\delta$ 35-V $\delta$ 1p-LUC plasmids, *SacI*-  
205 *HindIII* fragments containing the E $\delta$ -V $\delta$ 1p corresponding sequences present in previously  
206 described plasmids (31) were subcloned into the *SacI* and *HindIII* plasmid. To generate the  
207 TEAp-LUC-E $\delta$ 370 plasmid, the E $\delta$ 370 fragment was obtained by PCR using

208 CTGATGTGAATTCCCCCAGCCCAAAGT and  
209 GACAGTCGAATTCCAATTGAAAGGATTAGACATT, including *EcoRI* sites, digested and  
210 subcloned into the TEAp-LUC plasmid. To assay E $\gamma$  activity (32), the minimal *FOS* promoter  
211 (cfosp) was cloned into the *EcoRV* and *HindIII* sites and monomeric murine E $\gamma$ 1 or E $\gamma$ 4 into  
212 the *BamHI* and *Sall* of the pGL4.10 plasmid (Promega). The CSL-LUC (8xRBPJ $\kappa$ ) and CMV-  
213 ICN1 plasmids were previously described (33). Jurkat cells were transfected by  
214 electroporation with 5  $\mu$ g LUC reporter and 10 ng pRL-TK plasmids (Promega). For ICN1  
215 activating experiments, Jurkat cells were electroporated with 5  $\mu$ g pCMV-ICN1 or  
216 pBluescript, 2.5  $\mu$ g of LUC and 10 ng of pRL-TK plasmids. Electroporation and measurement  
217 of LUC and Renilla luciferase activities were performed as previously described (17).

## 218 **EMSAs**

219 RBPJ $\kappa$ -Myc containing cell extracts were obtained by transfection of the CMV-RBPJ $\kappa$ -  
220 Myc plasmid (33) in COS7 cells and EMSAs performed as previously described (34). 1  $\mu$ g  
221 of MYC (clone 9E10 from Abcam or Santa Cruz Biotechnology) or control Ab were used  
222 for super-shifting the specific complex. Binding sites used are listed in Table S1. The  
223 primers HES1 WT and HES1 MUT corresponding to the HES1 promoter were previously  
224 described (35).

## 225 **Statistical analysis**

226 The data represent the mean  $\pm$  SEM of duplicate results obtained from at least three  
227 independent experiments. The number of independent experiments performed (n) is indicated  
228 at figure legends. A non-parametric unpaired Student's t-test with Welch correction was used  
229 as indicated and a *p* values are represented as follows: *p* < 0.05(\*), *p* < 0.005 (\*\*), and

230  $p < 0.0005$  (\*\*\*)).

## 231 RESULTS

### 232 *Tcrd* and *Tcrg* transcription depends on the recruitment of RUNX1 and MYB to E $\delta$ 233 and E $\gamma$ during thymocyte development

234 Enhancer-dependent germline transcription of *Tcra*, *Tcrd* and *Tcrg* is  
235 developmentally regulated during  $\beta$ -selection (6, 7). We confirmed this regulation by  
236 quantifying C $\alpha$ , C $\delta$  and C $\gamma$ 4 (C $\gamma$ ) transcripts in the presence and absence of E $\alpha$  in DN3a  
237 and DP thymocytes by RT-qPCR in total thymocytes from V(D)J recombination-free *Rag2*<sup>-/-</sup>  
238 mice and *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tg mice, respectively (Figure 2A). *Rag2*<sup>-/-</sup> mice have a block at the  
239 DN3a stage due to their inability to rearrange their TCR loci, whereas *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tg mice  
240 have a block at the DP stage due to the expression of a pre-TCR that triggers DN3a to DP  
241 differentiation (23, 24). In accordance with previous Northern blot analyses (7, 19), C $\alpha$   
242 transcripts were absent in *Rag2*<sup>-/-</sup> thymocytes, while they were strongly induced in *Rag2*<sup>-/-</sup>  
243 x $\beta$ tg thymocytes. C $\alpha$  transcripts were found to be entirely dependent on E $\alpha$  because they  
244 were not detected in *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tgxE $\alpha$ <sup>-/-</sup> thymocytes. C $\delta$  transcripts were abundant in *Rag2*<sup>-/-</sup>  
245 , *Rag2*<sup>-/-</sup>xE $\alpha$ <sup>-/-</sup> and *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tg thymocytes, and absent in *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tgxE $\alpha$ <sup>-/-</sup> thymocytes. C $\delta$   
246 transcription in *Rag2*<sup>-/-</sup> and *Rag2*<sup>-/-</sup>xE $\alpha$ <sup>-/-</sup> thymocytes depends on E $\alpha$  function, whereas the  
247 dramatic difference in C $\delta$  transcription observed in *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tg and *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tgxE $\alpha$ <sup>-/-</sup> DP  
248 thymocytes was due solely to the presence of E $\alpha$ . These results indicate that E $\delta$ -dependent  
249 *Tcrd* transcription was inhibited in the thymocyte transition from DN3a to DP, as  
250 evidenced by the isolation of *Tcrd* from the influence of E $\alpha$  in *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tgxE $\alpha$ <sup>-/-</sup> DP  
251 thymocytes, simulating the natural situation that occurs via V $\alpha$ J $\alpha$  recombination. The C $\delta$   
252 transcripts present in DP thymocytes from *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tg mice are a consequence of the

253 activation of  $E\alpha$  in *cis*. As expected due to the regulation of *Tcrg* transcription during  $\beta$ -  
254 selection (6, 20),  $C\gamma$  transcription was high in DN3a thymocytes and strongly inhibited in  
255 DP thymocytes. These results confirmed that *Tcrd* and *Tcrg* transcripts are abundant in  
256 DN3a thymocytes and strongly inhibited in DP thymocytes, whereas  $E\alpha$ -dependent *Tcra*  
257 transcripts are induced in the thymocyte transition from DN3a to DP.

258         The inactivation of *Tcrd* and *Tcrg* transcription during  $\beta$ -selection correlates with  
259 the loss of Runx factor binding to essential sites present within the  $\delta E3$  and  $NF\gamma3$  elements  
260 (7, 20). Of the three Runx family members present in thymocytes, *Runx1* transcription is  
261 higher than that of *Runx2* and *Runx3* in DN2/3a thymocytes ([www.immgen.org](http://www.immgen.org))(36), and  
262 its transcriptional level corresponded with that of *Tcrd* and *Tcrg* during  $\beta$ -selection in mice  
263 (15, 29). Accordingly, we observed that *Runx1* transcripts were more abundant than those  
264 of *Runx3* in *Rag2*<sup>-/-</sup> thymocytes and both were inhibited in *Rag2*<sup>-/-</sup> $\times\beta$ tg DP thymocytes  
265 (Figure 2B). Furthermore, RUNX1 binds specifically to the  $\delta E3$  and  $E\gamma1/E\gamma4$ - $NF\gamma3$   
266 enhancer elements in *Rag2*<sup>-/-</sup> thymocytes (37). To evaluate whether RUNX1 binding to  
267 these enhancers correlates with *Tcrd* and *Tcrg* transcription during  $\beta$ -selection, we  
268 compared the recruitment of RUNX1 to  $E\delta$  and  $E\gamma4$  ( $E\gamma$ ) in *Rag2*<sup>-/-</sup> and *Rag2*<sup>-/-</sup> $\times\beta$ tg  
269 thymocytes by qChIP (Figure 2C). Consistent with the decreased *Runx1* transcription in DP  
270 thymocytes compared with that in DN3a thymocytes, we found that RUNX1 binding to  $E\delta$   
271 and  $E\gamma$  in *Rag2*<sup>-/-</sup> thymocytes was abrogated in *Rag2*<sup>-/-</sup> $\times\beta$ tg thymocytes. We also analyzed  
272 RUNX1 binding to  $E\alpha$  and *Oct2* sequences as controls. Consistent with the reduced  
273 binding of RUNX1 to  $E\alpha$  observed in WT DP thymocytes compared with that in *Rag2*<sup>-/-</sup>  
274 thymocytes (37), binding of this TF to  $E\alpha$  in *Rag2*<sup>-/-</sup> $\times\beta$ tg thymocytes was inhibited

275 compared with that in *Rag2*<sup>-/-</sup> thymocytes, whereas no relevant binding was observed to the  
276 control *Oct2* exon sequence. These results demonstrate that RUNX1 binds specifically to  
277 E $\delta$  and E $\gamma$  in DN3a thymocytes and is dissociated from enhancer chromatin in DP  
278 thymocytes, establishing a direct correlation between RUNX1 binding to E $\delta$ /E $\gamma$  and *Tcrd*  
279 and *Tcrg* transcription.

280 E $\delta$ /E $\gamma$  function also depends on the occupancy of a Myb binding site adjacent to the  
281 RUNX1 binding site present at the  $\delta$ E3 and NF $\gamma$ 3 elements (31, 38, 39). Previous studies  
282 have shown that MYB binds to E $\gamma$  in SCID.adh cells and that a *Myb* antisense  
283 oligonucleotide inhibits E $\delta$  activity in transfected Jurkat cells (31, 32). No significant  
284 differences in *Myb* transcript levels were found between *Rag2*<sup>-/-</sup> and *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tg thymocytes  
285 (Figure 2B), in agreement with the results obtained from microarray and RNA-sequencing  
286 analyses in WT thymocytes retrieved from the ImmGen database. However, our qChIP  
287 analyses revealed MYB binding to E $\delta$  and E $\gamma$  in *Rag2*<sup>-/-</sup> but not in *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tg thymocytes,  
288 whereas no MYB binding to E $\alpha$  and *Oct2* exon was detected (Figure 2C). These data  
289 indicate that binding of MYB and RUNX1 to E $\delta$  and E $\gamma$  correlates with the levels of *Tcrd*  
290 and *Tcrg* transcripts in DN3a and DP thymocytes, indicating that the efficient recruitment  
291 of these factors during thymocyte development is directly involved in the enhancer-  
292 dependent transcription of these loci.

293 **Pre-TCR signaling controls the differential recruitment of RUNX1 and MYB to**  
294 **E $\delta$ /E $\gamma$  in DN3a and DP thymocytes**

295 To evaluate whether pre-TCR signaling triggers transcriptional *Tcrd* silencing as it  
296 does for *Tcrg* (6), we quantified C $\delta$  and C $\gamma$  transcripts in thymocytes from *Rag2*<sup>-/-</sup>xE $\alpha$ <sup>-/-</sup>



297 mice during DN3a to DP differentiation upon CD3 $\epsilon$  mAb injection (Figure 2D). This  
298 treatment promotes efficient thymocyte differentiation in the absence of TCR  
299 rearrangements. The usage of *Rag2*<sup>-/-</sup>*xE $\alpha$* <sup>-/-</sup> mice permits the analysis of *Tcrd* transcription  
300 in the absence of E $\alpha$  activation. Progressive DN3a to DP differentiation was evaluated by  
301 flow cytometry (Figure S1). Both C $\delta$  and C $\gamma$  transcripts were largely abrogated 24 h after  
302 mAb injection, remaining stably inhibited. Interestingly, inhibition of C $\delta$  and C $\gamma$   
303 transcription corresponded to that of *Runx1* and *Myb* (Figure 2D). Our results indicated that  
304 *Tcrd* and *Tcr $\gamma$*  transcriptional silencing and inhibition of *Runx1* transcription occur very  
305 close temporally during the maturation of DN3a to DP thymocytes as a consequence of pre-  
306 TCR signaling. Because the levels of *Myb* transcripts remain high during DN-to DP  
307 differentiation ([www.immgen.org](http://www.immgen.org) and Figure 2B), an abrupt decrease in *Myb* transcription  
308 in the *Rag2*<sup>-/-</sup>*xE $\alpha$* <sup>-/-</sup> thymocytes after CD3 $\epsilon$  mAb injection was not expected (Figure 2D). At  
309 later developmental stages, in SP thymocytes and peripheral T cells, *Myb* transcription is  
310 strongly inhibited ([www.immgen.org](http://www.immgen.org)), becoming active again when resting T lymphocytes  
311 are stimulated by exposure to antigen or mitogens (40, 41). Although there are obvious  
312 similarities between the biological results of the pre-TCR, CD3 and the TCR $\alpha\beta$  complexes  
313 in activating and inhibiting transcription of specific genes, fundamental differences must  
314 exist to explain the different consequences observed upon signaling mediated by these  
315 complexes during  $\beta$ - and positive selections and T-cell stimulation, including those on *Myb*  
316 transcription. Corresponding with the inhibition of *Runx1* and *Myb* transcription, the  
317 binding of RUNX1 and MYB to E $\delta$  and E $\gamma$  was strongly inhibited in DP cells (Figure 2E),  
318 indicating that the recruitment of RUNX1 and MYB to E $\delta$ /E $\gamma$  correlates perfectly with  
319 enhancer activity.

320 To investigate the molecular mechanism that controls E $\delta$  and E $\gamma$  activity during  $\beta$ -  
321 selection through the regulated recruitment of RUNX1 and MYB, we used SCID.adh cells  
322 (25). These cells have a DN3a phenotype and differentiate into DN4 thymocytes via  
323 treatment with P+I (17, 42), constituting an excellent cellular model to study pre-TCR  
324 signaling (25). We found that C $\alpha$  transcripts were absent in non-stimulated (NS) cells and  
325 strongly induced in P+I-treated cells, whereas C $\delta$  transcripts were highly present in both  
326 NS and stimulated cells, with no differences between 24 and 48 h of stimulation (Figure  
327 3A); these results are similar to those obtained in *Rag2*<sup>-/-</sup> and *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tg thymocytes  
328 (Figure 2A). In agreement with IL-7R-dependent *Tcr $\gamma$*  transcription and pre-TCR-  
329 dependent *Tcr $\gamma$*  silencing (6, 12, 14, 43, 44), C $\gamma$  transcripts were strongly induced upon IL-  
330 7 treatment (Figure 3B), whereas P+I treatment inhibited IL-7-activated C $\gamma$  transcription  
331 (Figure 3C). These results indicated that SCID.adh cells are a good cellular model to assay  
332 pre-TCR and IL-7R signaling for the study of germline *Tcra*, *Tcrd* and *Tcr $\gamma$*  transcription  
333 during DN3a to DN4 development. Consistent with the data obtained in mouse thymocytes  
334 from CD3 $\epsilon$ -mAb-injected mice (Figure 2D), *Runx1* and *Myb* transcription was inhibited in  
335 P+I-stimulated SCID.adh cells, with *Runx1* and *Myb* transcripts being more abundant than  
336 those of *Runx3* in NS cells (Figure 3D-E). Hence, stimulation of SCID.adh cells also  
337 reproduces the regulation of *Runx1* and *Myb* transcription by pre-TCR signaling during  
338 thymocyte development. In accordance with *Runx1* and *Myb* transcription, the binding of  
339 RUNX1 and MYB to E $\delta$  and E $\gamma$  was strongly inhibited upon cell stimulation, whereas no  
340 relevant binding to the *Oct2* exon was observed (Figure 3F). These results confirm those  
341 obtained in mouse thymocytes, indicating that pre-TCR signaling provokes the loss of

342 RUNX1 and MYB binding from E $\delta$  and E $\gamma$ , correlating perfectly with the *Tcrd* and *Tcrg*  
343 transcriptional silencing observed during  $\beta$ -selection.

#### 344 **Mutual regulation of *Runx1* and *Myb* expression controls *Tcrd* and *Tcrg* transcription**

345 Previous functional data suggesting an essential role for Runx and Myb factors in  
346 the regulation of *Tcrd* and *Tcrg* transcription were based on the consequences of destroying  
347 their binding sites (31, 32, 38, 39, 45, 46). To formally probe RUNX1 and MYB  
348 involvement in the regulation of *Tcrd* and *Tcrg* transcription, we inhibited their  
349 transcription by transducing SCID.adh cells with sh*Runx1*- or sh*Myb*-RNA lentiviruses  
350 (Figure 4A-B). Consistent with the participation of these TFs in the core transcriptional  
351 regulatory circuit (CRC) of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cells (47-50), we  
352 observed subtle and mutual inhibition of *Runx1* and *Myb* transcription, whereas that of the  
353 control *Ubb* was unaffected. Interestingly, inhibition of either *Runx1* or *Myb* transcription  
354 significantly inhibited that of C $\delta$  and C $\gamma$ . The same results were confirmed using two  
355 different sh*Runx1*- and sh*Myb*-RNAs. These data demonstrate essential roles for RUNX1  
356 and MYB in activating *Tcrd* and *Tcrg* transcription in DN3a thymocytes.

#### 357 **Notch signaling induces *Runx1* transcription in parallel to that of *Tcrd* and *Tcrg* in** 358 **thymocytes**

359 NOTCH1 signaling is regulated during thymocyte development, as it is strong in  
360 mouse DN1-DN3a thymocytes and sharply downregulated by pre-TCR signaling (1). To  
361 activate this pathway, NOTCH1 interacts with its ligands to provoke proteolytic cleavage  
362 of the receptor intracellular domain (ICN1), which travels to the nucleus to activate  
363 transcription of target genes through its binding to the TF RBPJ $\kappa$ , previously bound to

364 DNA. In agreement with the inhibition of *Notch1* transcription, as well as that of its target  
365 *Hes1*, during thymocyte transition from DN3a to DP (www.immgen.org), we observed  
366 strong inhibition of *Notch1* and *Hes1* transcription in thymocytes from *Rag2*<sup>-/-</sup>xβtg and  
367 CD3ε mAb-injected *Rag2*<sup>-/-</sup> mice compared to that in those of control *Rag2*<sup>-/-</sup> mice (Figure  
368 5A-B). To evaluate a possible effect of Notch signaling on *Tcrd* and *Tcrg* transcription, we  
369 transduced E14.5 *Rag2*<sup>-/-</sup>xβtgxEα<sup>-/-</sup> DN thymocytes with MigR retroviruses directing the  
370 expression of GFP alone (GFP) or ICN1 and GFP together (ICN1) cultured on OP9 cell  
371 monolayers (Figure S2A). As shown in Figure S2A, GFP-transduced GFP<sup>+</sup> thymocytes  
372 remained DN, whereas ICN1-transduced GFP<sup>+</sup> thymocytes differentiate to DP thymocytes  
373 (26, 27). We used *Rag2*<sup>-/-</sup>xβtgxEα<sup>-/-</sup> thymocytes to avoid any interference derived from Eα  
374 activation of *Tcrd* transcription (Figure 2A) and analyzed transcription in GFP<sup>+</sup> DN  
375 thymocytes transduced with GFP or ICN1 retroviruses (Figure 5C). Consistent with  
376 NOTCH1-dependent transcriptional autoregulation (16), *Notch1* transcription was higher in  
377 GFP<sup>+</sup> DN thymocytes transduced with ICN1 retroviruses than that in those transduced with  
378 GFP retroviruses. Interestingly, we observed a significant increase in *Runx1* transcription  
379 together with a strong induction of Cδ and Cγ transcription in ICN1-transduced DN  
380 thymocytes, indicating that *Tcrd* and *Tcrg* respond positively to NOTCH1 signaling. No  
381 significant effect on *Myb* transcription was detected in ICN1-transduced DN thymocytes.

382 Exposure of T cell progenitors to cell-bound Notch ligands of the Delta-Like family  
383 can drive T lineage development on OP9 cultures (26). To confirm our observations at a  
384 physiological level of Notch signaling, we analyzed the effect of activating endogenous  
385 Notch via Delta-Like 1 (DL1) by coculturing E14.5 *Rag2*<sup>-/-</sup>xβtgxEα<sup>-/-</sup> thymocytes on OP9  
386 or OP9-DL1 cell monolayers (Figure S2B). As shown in Figure S2B, DN thymocytes

387 cultured on OP9 monolayers remain DN, whereas those cultured on OP9-DL1 monolayers  
388 can differentiate into DP thymocytes (26). DN thymocytes from OP9 and OP9-DL1  
389 cocultures were cell sorted and analyzed (Figures 5D and S2B). In accordance with the  
390 positive self-regulation of Notch (16), *Notch1* transcription was induced by DL1-mediated  
391 Notch signaling. Interestingly, we found a strong induction of C $\delta$  and C $\gamma$  transcripts  
392 together with an increase in *Runx1* transcription in DN thymocytes cultured on OP9-DL1  
393 monolayers compared to that of those cultured on OP9 monolayers, whereas no effect on  
394 *Myb* transcription was observed. These results indicated that physiological levels of Notch  
395 signaling can trigger the activation of C $\delta$  and C $\gamma$  transcripts, supporting that Notch-  
396 dependent *Runx1* transcription activates *Tcrd* and *Tcrg* transcription in DN thymocytes.

397         Thymocyte cultures on OP9 monolayers require the presence of IL-7 for cell  
398 survival (26). Because we did not observe any Notch-dependent effect on *Il7r* transcription  
399 in our thymocyte cultures (Figure S2C), these results suggest that the induction of *Tcrd* and  
400 *Tcrg* transcription in DN thymocytes was not a consequence of any activating effect of  
401 Notch signaling on *Il7r* transcription. To unequivocally evaluate the effect of Notch  
402 signaling on *Tcrd* and *Tcrg* transcription in the absence of IL-7, we analyzed this in  
403 SCID.adh cells. These cells reproduce pre-TCR-dependent downregulation of *Notch1* and  
404 *Hes1* transcription upon P+I cell stimulation (Figure 5E). After cell transduction with ICN1  
405 retroviruses, we observed a significant increase in *Hes1* transcription in sorted GFP<sup>+</sup> cells  
406 together with the induction of *Runx1*, *Myb*, C $\delta$  and C $\gamma$  transcripts (Figure 5F). Because the  
407 experiments were performed in the absence of IL-7, these results indicated that Notch  
408 signaling activates *Runx1*, *Tcrd* and *Tcrg* transcription independently of any effect  
409 mediated via IL-7R. To reproduce the conditions of the natural DN3a thymocyte

410 environment, we also evaluated the effect of ICN1 signaling on IL-7-activated C $\gamma$   
411 transcription in transduced SCID.adh cells. We found increased levels of C $\gamma$  transcripts in  
412 IL-7-treated, ICN1-transduced SCID.adh cells compared to those in control-transduced  
413 cells (Figure 5G). These results indicated that Notch signaling activates both basal and IL-  
414 7-activated *Tcrd* transcription. To further analyze the role of Notch signaling on *Tcrd* and  
415 *Tcrd* transcription, we inhibited this signaling by treating SCID.adh cells with GSI DAPT.  
416 Consistent with data obtained in ICN1-transduced SCID.adh cells, DAPT inhibited *Hes1*,  
417 *Runx1*, *Il7r*, C $\delta$  and both basal- and IL-7-induced C $\gamma$  transcription (Figures 5G-H and  
418 S2D). Our results indicated that *Runx1*, *Tcrd* and *Tcrd* transcription are activated by Notch  
419 signaling in DN3 thymocytes.

#### 420 **NOTCH1 signaling activates E $\delta$ and E $\gamma$**

421 To evaluate the effect of Notch signaling directly on E $\delta$  and E $\gamma$  function, we  
422 analyzed the effect of P+I- or ICN1-mediated signaling on enhancer activity using reporter  
423 constructs in transiently transfected Jurkat cells (Figure 6), a well-established model for  
424 studying T cell activation (51). Consistent with recent RNA-sequencing analysis (52), P+I-  
425 stimulation inhibited *NOTCH1*, *HES1*, *RUNX1* and *MYB* transcription (Figure 6A),  
426 resembling the observed effect of  $\beta$ -selection signaling in thymocytes and SCID.adh cells.  
427 We compared the effect of P+I stimulation on E $\delta$ -mediated LUC transcription by assaying  
428 a 370-bp E $\delta$  fragment (E $\delta$ 370) containing the seven described elements for protein binding:  
429  $\delta$ E1- $\delta$ E7 (Figure 6B)(53). In accordance with previous data (31), the  $\delta$ E3 Runx and Myb  
430 binding sites were both necessary for E $\delta$  function because E $\delta$ 370 versions with point  
431 mutations at any of these sites, E $\delta$ mRunx and E $\delta$ 370mMyb, were inactive (Figure 6B-C).

432 As expected (17), cell stimulation caused an activation of E $\alpha$ -dependent LUC transcription  
433 driven by the *Traj49* promoter (J $\alpha$ 49p); however, it inhibited E $\delta$ 370 driven by the *TRDVI*  
434 promoter (V $\delta$ 1p) (Figure 6C). These results are in concordance with the inhibitory effect of  
435 P+I treatment on *RUNXI* and *MYB* transcription (Figure 6A). To evaluate whether the  
436 observed P+I-mediated E $\delta$  inhibition is mediated by the essential RUNX1 and MYB  
437 binding sites, we compared the activity of E $\delta$ 35, containing only the  $\delta$ E3 element, in  
438 unstimulated and stimulated cells. We found that, in concordance with the decreased  
439 *RUNXI* and *MYB* transcription observed upon cell stimulation (Figure 6A), the activity of  
440 E $\delta$ 35 was inhibited in P+I-treated cells (Figure 6C). To directly evaluate the effect of Notch  
441 signaling on E $\delta$  function, we analyzed the effect of ICN1 overexpression on V $\delta$ 1p-LUC  
442 reporter constructs in the presence of different truncated versions of E $\delta$  (Figure 6B). An  
443 activating effect of ICN1 was observed on all tested E $\delta$  fragments, including E $\delta$ 35 with no  
444 RBPJ $\kappa$  binding sites (Figure 6D). As a positive control for ICN1 function, we used an LUC  
445 reporter plasmid containing eight sites for RBPJ $\kappa$ , 8xRBPJ $\kappa$ , in tandem (Figure 6D). To  
446 discard any possible effect of Notch on V $\delta$ 1p activity, we also analyzed the effect of ICN1  
447 overexpression on the transcriptional activity of E $\delta$ 370 driven by the T early  $\alpha$  promoter  
448 (TEAp). We found that ICN1 efficiently activated transcription of the TEAp-LUC-E $\delta$ 370  
449 construct without activating that of TEAp-LUC (Figure 6E). Although the constitutive  
450 expression of NOTCH1 present in Jurkat cells makes it difficult to demonstrate the effect  
451 of GSI (54), DAPT treatment significantly inhibited the activity of V $\delta$ 1p-E $\delta$ 370-LUC but  
452 not that of V $\delta$ 1p-LUC (Figure 6F), supporting a positive effect of Notch signaling on the  
453 regulation of E $\delta$  function. The effect of ICN1 overexpression on E $\gamma$  function was evaluated

454 using c<sub>fos</sub>-LUC constructs in the presence of a 300-bp E $\gamma$ 1 or E $\gamma$ 4 fragment (E $\gamma$ 300)  
455 containing the four described elements for protein binding: NF $\gamma$ 1-4 (Figure 6G). Similar to  
456 the effects of P+I-treatment and ICN1 overexpression on E $\delta$  function, the activity of E $\gamma$ 1  
457 and E $\gamma$ 4 was inhibited upon P+I cell stimulation (Figure 6H) and activated by ICN1 (Figure  
458 6I). These data are consistent with the activation of both E $\delta$  and E $\gamma$  by Notch signaling.

459         To confirm the observed effect of Notch signaling on enhancer function in a natural  
460 chromatin context, we evaluated the effect of ICN1 by retroviral transduction of Jurkat  
461 clones with a characterized human *TCRD* minilocus integrated within the genome (55).  
462 This 22-kb minilocus consists of unrearranged V $\delta$ 1, V $\delta$ 2, D $\delta$ 3, J $\delta$ 1 and J $\delta$ 3 segments and  
463 the *TRDC* exons, with E $\delta$  located in its natural location in a 10.5-kb chromosomal fragment  
464 (Figure 6J). Because the endogenous *TCRD* gene has been deleted by *TCRA*  
465 rearrangements in these cells, there is no endogenous *TCRD* region to interfere with the  
466 analysis of the transfected minilocus. Minilocus VD-to-J rearrangements in mouse  
467 thymocytes and C $\delta$  transcription depend on the presence of intact E $\delta$ , whereas E $\delta$  mMyb is  
468 inactive in regard to both functions (38, 55). We transduced two characterized minilocus-  
469 containing clones, W7, with intact E $\delta$ , and M20, with E $\delta$ mMyb, and GFP and ICN1  
470 retroviruses (Figure 6B,K). The W7 and M20 clones were selected as they both have two  
471 copies of the transgene and a clear Myb-site-dependent C $\delta$  transcriptional phenotype (55).  
472 Transduced ICN1 increased *HES1* transcription in the W7 and M20 clones. Strikingly, it  
473 only induced C $\delta$  transcription in W7 cells but not in M20 cells (Figure 6K). These results  
474 indicated that Notch signaling can activate E $\delta$ -dependent transcription when the enhancer is  
475 located within its native chromosomal location.



476 **Notch-dependent recruitment of RUNX1 and MYB to E $\delta$  and E $\gamma$**

477           The fact that ICN1 signaling can activate E $\delta$  and E $\gamma$  function (Figure 6D,H),  
478 including E $\delta$ 35 with just the  $\delta$ E3 Myb and Runx binding sites, together with the effect of  
479 ICN1 overexpression and DAPT treatment on *Runx1* and *Myb* transcription (Figure  
480 5C,F,H), suggest that Notch signaling activates these enhancers through the recruitment of  
481 RUNX1 and MYB to their binding sites. To directly evaluate this possibility, we compared  
482 the binding of these TFs to E $\delta$  and E $\gamma$  by qChIP in NS and treated-DAPT SCID.adh cells  
483 (Figure 7A). According to the DAPT-mediated effects observed on *Runx1*, *Myb*, C $\delta$  and  
484 basal C $\gamma$  transcription (Figure 5H), we found that the binding of RUNX1 and MYB to E $\delta$   
485 and E $\gamma$  was strongly inhibited in DAPT-treated cells (Figure 7A). No binding of these TFs  
486 to the *Oct2* exon was detected. As a control for the DAPT treatment, we observed that it did  
487 not alter the binding of CCCTF factor, CTCF, to E $\alpha$  (Figure 7B). These results together  
488 demonstrate that Notch signaling activates E $\delta$  and E $\gamma$ -dependent transcription by favoring  
489 the recruitment of RUNX1 and MYB to enhancer chromatin.

490

491 **DISCUSSION**

492 The regulation of *Tcrd/Tcrg* and *Tcra* transcription and rearrangement during  
493 thymocyte maturation depends on a developmental switch composed of E $\delta$ /E $\gamma$  and E $\alpha$ . E $\delta$   
494 and E $\gamma$  activity depends on the occupancy of essential Runx and Myb binding sites in pre-  
495  $\beta$ -selected DN thymocytes, with the factors bound to these sites dissociating during  $\beta$ -  
496 selection and thereby causing enhancer inactivation, which abrogates *Tcrd* and *Tcrg*  
497 transcription in DP thymocytes (7, 20, 31, 32, 38, 39, 45, 46, 53). Here, we found that  
498 Notch signaling activates *Tcrd* and *Tcrg* transcription by promoting the efficient  
499 recruitment of RUNX1 and MYB to E $\delta$  and E $\gamma$  in DN3a thymocytes, whereas both pre-  
500 TCR signaling and Notch inhibition cause the dissociation of bound RUNX1 and MYB  
501 from these enhancers, resulting in inhibition of *Tcrd* and *Tcrg* transcription, thereby  
502 deciphering the molecular mechanism for *Tcrd* and *Tcrg* silencing during  $\beta$ -selection.  
503 Expression of TCR $\delta$  from successfully rearranged *Tcrd* present on extrachromosomal  
504 circles and that of TCR $\gamma$  chains from successfully rearranged *Tcrg*, in thymocytes and in  
505 resting  $\alpha\beta$  T lymphocytes could interfere with the normal assembly of functional  
506 TCR $\alpha\beta$  (8). Furthermore, our findings reveal a novel molecular mechanism for gene  
507 regulation by Notch signaling via the recruitment of RUNX1 and MYB to specific binding  
508 sites (56).

509 RUNX1 and MYB are key members of the network for T cell programming, and,  
510 consequently, their appropriate expression is tightly regulated (1). A NOTCH1-dependent  
511 RUNX1/MYB axis controls hematopoietic stem cell development in mouse embryos (57).  
512 The prevalence of this axis is less apparent at later developmental stages; however, as

513 previously reported in leukemia cell lines such as SCID.adh (58-61), we observed a  
514 positive effect of Notch signaling on *Runx1* and *Myb* transcription in these cells. The  
515 inhibitory effect of GSI on *Runx1* and *Myb* transcription observed in SCID.adh cells is  
516 accentuated by overexpression of PU.1, which interferes with Notch signaling (59, 60).  
517 Furthermore, we observed the positive effect of Notch signaling on *Runx1* transcription in  
518 *in vitro* cultured embryonic DN thymocytes. These data together strongly indicate that  
519 Notch signaling is involved in the regulation of *Runx1* transcription in DN3a thymocytes.  
520 In addition to the pivotal roles of these two factors during the thymocyte developmental  
521 program, RUNX1 and MYB form part of the CRC for T-ALL cells controlling the gene  
522 expression program responsible for lineage identity (47-49). Subtle decreases in the  
523 transcription of the TFs that constitute the CRC for a particular lineage affect the mutual  
524 binding of these factors to their own enhancers with very dramatic effects on cell survival  
525 and identity (47-50). The NOTCH1-mediated regulation of *Runx1* transcription described  
526 here together with the RUNX1-mediated regulation of *Notch1* and *Myb* transcription  
527 recently described (50) suggest that NOTCH1 might also be a component of the CRC for  
528 T-ALL cells. In support of this hypothesis, NOTCH1, RBPJ $\kappa$  and RUNX1 bind  
529 simultaneously to *RUNX1*, *MYB* and *NOTCH1* regulatory regions in T-ALL cells (62).  
530 Consistent with the existence of a similar CRC in SCID.adh cells, our data show that subtle  
531 decreases in the transcription of *Runx1* or *Myb* result in mutual transcriptional inter-  
532 regulation between these two factors. The inter-dependent regulation between the  
533 expression of *Runx1* and *Myb* in SCID.adh cells might also contribute to the decrease in  
534 both factors transcription observed by DAPT and P+I treatments. Our data indicate that  
535 only Runx1 responds to Notch signaling in thymocytes, whereas Runx1 and Myb are

536 activated by this signaling in SCID.adh cells. These results suggest that Runx1 is target of  
537 Notch signaling, whereas the response of Myb to Notch and P+I in SCID.adh cells is the  
538 consequence of the participation of RUNX1 and MYB in the CRC for T-ALL cells.  
539 Although primary thymocytes and T-ALL cells share several aspects of their regulatory TF  
540 networks, they differ in the transcriptional mechanisms that control specific genes, as seems  
541 the case for the regulation of the gene for IL-7R. The human *IL7R* is accepted to be a direct  
542 Notch target gene in human cell lines; however, no short-term Notch-dependent effect on  
543 its transcription has been found in primary thymocytes (2, 62-64). Similarly, our results  
544 also indicate that Notch signaling activates mouse *Il7r* transcription in SCID.adh cells but  
545 not in primary thymocytes (Figures S2C and S2D), suggesting a conserved differential  
546 regulation by Notch signaling of this gene in T-ALL cells and primary thymocytes in  
547 humans and mice.

548         Our data indicate a Notch-dependent mechanism for controlling gene transcription  
549 that acts by regulating the expression and access of RUNX1 and MYB to E $\delta$ /E $\gamma$ . The  
550 observed effect of Notch signaling on E $\delta$ /E $\gamma$  activity could be indirect as consequence of  
551 Notch-dependent activation of Runx1 transcription. In addition, RUNX1 displays a  
552 context-dependent chromatin opening activity that permits its collaboration with different  
553 TFs bound nearby (65). In fact, prior occupancy of the  $\delta$ E3 Runx site is required for stable  
554 occupancy of its adjacent Myb and GATA-3 sites (55), and a similar dependence might  
555 occur between factors bound to NF $\gamma$ 3 Runx and Myb sites. This structural role of RUNX1  
556 explains the decreased MYB recruitment to E $\delta$  and E $\gamma$  observed in *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tg thymocytes  
557 compared to that observed in *Rag2*<sup>-/-</sup> thymocytes in the absence of any decrease in *Myb*  
558 transcription (Figure 2B-C) and most likely also accounts for the defective MYB

559 recruitment to E $\delta$  and E $\gamma$  detected in response to DAPT and P+I treatments due to the  
560 mutual transcriptional regulation between both RUNX1 and MYB in SCID.adh cells, with  
561 dramatic consequences on *Tcrd* and *Tcrg* transcription. In addition, the observed effect of  
562 Notch signaling on E $\delta$ /E $\gamma$  activity could be direct through the recruitment of RBPJ $\kappa$  to  
563 enhancer chromatin. Interestingly, a functional combinatorial code formed by RBPJ $\kappa$  and  
564 Runx sites in Notch signaling has been confirmed in *Drosophila* and vertebrates (56). Our  
565 reporter analyses assaying the effect of Notch signaling on the activity of  $\delta$ E3, in the  
566 absence of RBPJ $\kappa$  binding sites, do not rule out a possible implication of this TF in the  
567 regulation of E $\delta$ /E $\gamma$  activity in the context of native chromatin at the endogenous loci. In  
568 fact, we have validated conserved binding sites for RBPJ $\kappa$  in E $\delta$ , E $\delta$ 5/6, located between  
569  $\delta$ E5 and  $\delta$ E6, and E $\gamma$ , located between NF $\gamma$ 1 and NF $\gamma$ 2, NF $\gamma$ 1/2 (Figure S3). Although no  
570 binding of ICN1 has been detected to these enhancers by ChIP-seq experiments in thymic  
571  $\gamma\delta$  T cells (66), ICN could be transitorily recruited to E $\delta$ /E $\gamma$  through RBPJ $\kappa$  inducing a  
572 conformational change in the enhanceosomes associated with augmented binding of  
573 RUNX1 and MYB to  $\delta$ E3 and NF $\gamma$ 3. This Notch and RUNX1-dependent scenario for the  
574 activation of E $\delta$ /E $\gamma$  resembles in some aspects to that described for the regulation of *Bcl11b*  
575 during thymocyte development, in which TCF-1, GATA-3 and Notch control gene  
576 competence to be turned on, whereas RUNX1 controls the levels of gene expression  
577 independently of ICN recruitment (67). In addition, the non-canonical RBPJ $\kappa$ -independent  
578 Notch pathway could be involved in E $\delta$ /E $\gamma$  regulation (68). Although RUNX1 is the  
579 dominant Runx factor present in DN2/3a thymocytes, the ratio of *Runx1/Runx3* transcripts  
580 is reversed in  $\gamma\delta$  T lymphocytes ([www.immgen.org](http://www.immgen.org)), suggesting that an interchange  
581 between these two TFs might occur between DN2/3a thymocytes and  $\gamma\delta$  T lymphocytes to

582 guarantee E $\delta$ /E $\gamma$  activity in the latter cells. In fact, RUNX3 can substitute for RUNX1 in  
583 regulating *Tcr $\gamma$*  transcription (20).

584 Previous data have established that Notch signaling is involved in modulating  $\alpha\beta$   
585 versus  $\gamma\delta$  T cell determination through differential signal strength with opposite outputs in  
586 humans and mice (69). Strong Notch signaling on uncommitted T cell precursors promotes  
587  $\gamma\delta$  T cell development in humans and  $\alpha\beta$  T cell development in mice (2). These different  
588 effects depend on the cell stage that receives strong Notch signaling during thymocyte  
589 development (69). Our results show that Notch signaling activates transcription of the  
590 murine *Tcr $\delta$*  and *Tcr $\gamma$*  genes in mouse cells, primary thymocytes and SCID.adh cells, and  
591 the human *TCRD* minilocus in human Jurkat cells could constitute a first level of regulation  
592 common between humans and mice prior to  $\gamma\delta$ - and  $\beta$ -selection processes, whereas a  
593 second level of regulation with temporal differences between the two species could operate  
594 via the pre-TCR- and TCR $\gamma\delta$ -selection processes in synergism with Notch signaling later in  
595 development (2).

596 **ACKNOWLEDGEMENTS**

597 We thank Carles Suñé and lab members for valuable discussions, Salvador Guerrero for  
598 FACS analyses, Clara Sánchez-González for mouse care, David L. Wiest (Fox Chase  
599 Cancer Center) for the SCID.adh cells, Jonathan C. Aster (Harvard Medical School) for the  
600 MigR-ICN1, pCMV-ICN1, pCMV-RBPJ $\kappa$ -Myc and 8xRBPJ $\kappa$  constructs and Juan Carlos  
601 Zúñiga-Pflucker (University of Toronto) for the OP9 and OP9-DL1 stromal cells.

602

603 **FOOTNOTES**

604 \*The study was supported by research funding from the Spanish Government (BFU2016-  
605 79699P). The authors declare no competing financial interests.

606 \*\*Nonstandard abbreviations: C $\alpha$ , *Tcra* C region; C $\delta$ , *Tcrd* C region; cfosp, minimal human  
607 *FOS* promoter; C $\gamma$ , *Tcrg* C $\gamma$ 4 region; CRC, core transcriptional regulatory circuit CTCF,  
608 CCCTF factor; DAPT, 7(N-(3,5-difluorophenyl)-1-alanyl)-s-phenyl-glycine t-butyl ester);  
609 DL1, Delta-Like 1; DN, double negative; DP, double positive; E14.5, embryonic d 14.5;  
610 E $\alpha$ , *Tcra* enhancer; E $\delta$ , *Tcrd* enhancer; E $\gamma$ , *Tcrg* E $\gamma$ 4 enhancer; GSI,  $\gamma$ -secretase inhibitor;  
611 ICN1, intracellular NOTCH1; LUC, firefly *luciferase* gene; NS, non stimulated; P+I, PMA  
612 + ionomycin; PCR, polymerase chain reaction; *Rag2*<sup>-/-</sup> x $\beta$ tg, *Rag2*<sup>-/-</sup> x *Tcrb* transgene;  
613 qChIP, quantitative chromatin immunoprecipitation; RT-qPCR, quantitative reverse  
614 transcription polymerase chain reaction; SP, single positive; T-ALL, T-cell lymphoblastic  
615 leucemia; TEAp, T early  $\alpha$  promoter; TF, transcription factor; V $\delta$ 1p, *TRDVI* promoter.

616



617    **REFERENCES**

- 618    1.     Yui, M. A., and E. V. Rothenberg. 2014. Developmental gene networks: a  
619         triathlon on the course of T cell identity. *Nat Immunol* 14: 529-545.
- 620    2.     Taghon, T., E. Waegemans, and I. Van de Walle. 2012. Notch signaling during  
621         human T cell development. *Curr Top Microbiol Immunol* 360: 75-97.
- 622    3.     Boudil, A., I. R. Matei, H. Y. Shih, G. Bogdanoski, J. S. Yuan, S. G. Chang, B.  
623         Montpellier, P. E. Kowalski, V. Voisin, S. Bashir, G. D. Bader, M. S. Krangel, and C.  
624         J. Guidos. 2015. IL-7 coordinates proliferation, differentiation and Tcra  
625         recombination during thymocyte b-selection. *Nat Immunol* 16: 397-405.
- 626    4.     Trigueros, C., K. Hozumi, B. Silva-Santos, L. Bruno, A. C. Hayday, M. J. Owen, and  
627         D. J. Pennington. 2003. Pre-TCR signaling regulates IL-7 receptor alpha  
628         expression promoting thymocyte survival at the transition from the double-  
629         negative to double-positive stage. *Eur J Immunol* 33: 1968-1977.
- 630    5.     del Blanco, B., U. Angulo, and C. Hernández-Munain. 2014. Epigenetic control of  
631         T cell receptor locus rearrangements in normal and aberrant conditions.  
632         *Epigenetic and Human Health* Transcriptional and Epigenetic Mechanisms  
633         Regulating Normal and Aberrant Blood Cell Development: 295-329.
- 634    6.     Ferrero, I., S. J. Mancini, F. Grosjean, A. Wilson, L. Otten, and H. R. MacDonald.  
635         2006. TCRgamma silencing during alphabeta T cell development depends upon  
636         pre-TCR-induced proliferation. *J Immunol* 177: 6038-6043.
- 637    7.     Hernández-Munain, C., B. P. Sleckman, and M. S. Krangel. 1999. A  
638         developmental switch from TCR d enhancer to TCR a enhancer function during  
639         thymocyte maturation. *Immunity* 10: 723-733.
- 640    8.     Erman, B., L. Feigenbaum, J. E. Coligan, and A. Singer. 2002. Early TCRA  
641         expression generated TCRag complexes that signal the DN-to-DP transition and  
642         impairs development. *Nat Immunol* 3: 564-569.
- 643    9.     Wolfer, A., A. Wilson, M. Nemir, H. R. MacDonald, and F. Radtke. 2002.  
644         Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-  
645         independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes. *Immunity* 16:  
646         869-879.
- 647    10.    Reizis, B., and P. Leder. 2002. Direct induction of T lymphocyte-specific gene  
648         expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes Dev* 16: 295-  
649         300.
- 650    11.    De Smedt, M., I. Hoebeke, K. Reynvoet, G. Leclercq, and J. Plum. 2005. Different  
651         thresholds of Notch signaling bias human precursor cells toward B-, NK-,  
652         monocytic/dendritic-, or T-cell lineage in thymus microenvironment. *Blood* 106:  
653         3498-3506.
- 654    12.    Kang, J., M. Coles, and D. H. Raulet. 1999. Defective development of  
655         gamma/delta T cells in interleukin 7 receptor- deficient mice is due to  
656         impaired expression of T cell receptor gamma genes. *J Exp Med* 190: 973-982.
- 657    13.    Maki, K., S. Sunaga, Y. Komogata, Y. Kodaira, A. Mabuchi, H. Karasuyama, K.  
658         Yokomuro, J. I. Miyazaki, and K. Ikuta. 1996. Interleukin 7 receptor-deficient  
659         mice lack gd T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7172-7177.

- 660 14. Maki, K., S. Sunaga, and K. Ikuta. 1996. The V-J recombination of T cell receptor-  
661 g genes is blocked in interleukin-7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 184:  
662 2423-2427.
- 663 15. Taghon, T., M. A. Yui, R. Pant, R. A. Diamond, and E. V. Rothenberg. 2006.  
664 Developmental and molecular characterization of emerging beta- and  
665 gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* 24: 53-  
666 64.
- 667 16. Yashiro-Ohtani, Y., Y. He, T. Ohtani, M. E. Jones, O. Shestova, L. Xu, T. C. Fang, M.  
668 Y. Chiang, A. M. Intlekofer, S. C. Blacklow, Y. Zhuang, and W. S. Pear. 2009. Pre-  
669 TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A. *Genes Dev*  
670 23: 1665-1676.
- 671 17. del Blanco, B., A. García-Mariscal, D. L. Wiest, and C. Hernández-Munain. 2012.  
672 Tcra enhancer activation by inducible transcription factors downstream of pre-  
673 TCR signaling. *J Immunol* 188: 3278-3293.
- 674 18. Monroe, R. J., B. P. Sleckman, B. C. Monroe, B. Khor, S. Claypool, R. Ferrini, L.  
675 Davidson, and F. W. Alt. 1999. Developmental regulation of TCR  $\delta$  locus  
676 accessibility and expression by the TCR  $\delta$  enhancer. *Immunity* 10: 503-513.
- 677 19. Sleckman, B. P., C. G. Bardon, R. Ferrini, L. Davidson, and F. W. Alt. 1997.  
678 Function of the TCR  $\alpha$  enhancer in  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells. *Immunity* 7: 505-515.
- 679 20. Tani-ichi, S., M. Satake, and K. Ikuta. 2011. The pre-TCR signal induces  
680 transcriptional silencing of the TCRg locus by reducing the recruitment of  
681 STAT5 and Runx to transcriptional enhancers. *Int Immunol* 25: 553-563.
- 682 21. Xiong, N., C. Kang, and D. H. Raulet. 2002. Redundant and unique roles of two  
683 enhancer elements in the TCRg locus in gene regulation and gd T cell  
684 development. *Immunity* 16: 453-463.
- 685 22. Hernández-Munain, C. 2015. Recent insights into the transcriptional control of  
686 the Tcra/Tcrd locus by distant enhancers during the development of T-  
687 lymphocytes. *Transcription* 6: 65-73.
- 688 23. Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J.  
689 Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall, and F. W. Alt. 1992. RAG-2-deficient  
690 mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J  
691 rearrangement. *Cell* 68: 855-867.
- 692 24. Shinkai, Y., S. Koyasu, K. Nakayama, K. M. Murphy, D. Y. Loh, E. L. Reinherz, and  
693 F. W. Alt. 1993. Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by  
694 functional TCR transgenes. *Science* 259: 822-825.
- 695 25. Carleton, M., N. R. Ruetsch, M. A. Berger, M. Rhodes, S. Kaptik, and D. L. Wiest.  
696 1999. Signals transduced by CD3e, but not by surface pre-TCR complexes, are  
697 able to induce maturation of an early thymic lymphoma in vitro. *J Immunol*  
698 163: 2576-2585.
- 699 26. Schmitt, T. M., and J. C. Zúñiga-Pflucker. 2002. Induction of T cell development  
700 from hematopoietic progenitor cells by Delta-like-1 in vitro. *Immunity* 17: 749-  
701 756.
- 702 27. Aster, J. C., L. Xu, F. G. Karnell, V. Patriub, J. C. Pui, and W. S. Pear. 2000.  
703 Essential roles for ankyrin repeat and transactivation domains in induction of  
704 T-cell leukemia by Notch1. *Mol Cell Biol* 20: 7505-7515.

- 705 28. del Blanco, B., Ú. Angulo, M. S. Krangel, and C. Hernández-Munain. 2015. The  
706 Tcra enhancer is inactivated in ab T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:  
707 1744-1753.
- 708 29. David-Fung, E. S., R. Butler, G. Buzi, M. A. Yui, R. A. Diamond, M. K. Anderson, L.  
709 Rowen, and E. V. Rothenberg. 2009. Transcription factor expression dynamics  
710 of early-T lymphocyte specification and commitment. *Dev Biol* 325: 444-467.
- 711 30. Hawwari, A., C. Bock, and M. S. Krangel. 2005. Regulation of T cell receptor a  
712 gene assembly by a complex hierarchy of germline Ja promoters. *Nat Immunol*  
713 6: 481-489.
- 714 31. Hernández-Munain, C., and M. S. Krangel. 1994. Regulation of the T-cell  
715 receptor d enhancer by functional cooperation between c-Myb and core-  
716 binding factors. *Mol Cell Biol* 14: 473-483.
- 717 32. Tani-ichi, S., M. Satake, and K. Ikuta. 2009. Activation of the mouse TCRg  
718 enhancers by STAT5. *Int Immunol* 21: 1079-1088.
- 719 33. Aster, J. C., E. S. Robertson, R. P. Hasserjian, J. R. Turner, E. Kieff, and J. Sklar.  
720 1997. Oncogenic forms of NOTCH1 lacking either the primary binding site for  
721 RBP-Jk or nuclear localization sequences retain the ability to associate with  
722 RBP-Jk and activate transcription. *J Biol Chem* 272: 11336-11343.
- 723 34. Hernández-Munain, C., and M. S. Krangel. 1995. c-Myb and core-binding  
724 factor/PEBP2 display functional synergy but bind independently to adjacent  
725 sites in the T-cell receptor d enhancer. *Mol Cell Biol* 15: 3090-3099.
- 726 35. Nam, Y., P. Sliz, W. S. Pear, J. C. Aster, and S. C. Blacklow. 2007. Cooperative  
727 assembly of higher-order Notch complexes functions as a switch to induce  
728 transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 2103-2108.
- 729 36. Heng, T. S. P., M. W. Painter, and T. I. G. P. Consortium. 2008. The  
730 Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells.  
731 *Nat Immunol* 9: 1091-1094.
- 732 37. Cauchy, P., M. A. Maqbool, J. Zacarias-Cabeza, L. Vanhille, F. Koch, R. Fenouil, M.  
733 Gut, I. Gut, M. A. Santana, A. Griffon, J. Imbert, C. Moraes-Cabé, J.-C. Bories, P.  
734 Ferrier, S. Spicuglia, and J. C. Andrau. 2015. Dynamic recruitment of both Ets1  
735 to both nucleosome-occupied and -depleted enhancer regions mediates a  
736 transcriptional program switch during early T-cell differentiation. *Nucleic Acids*  
737 *Res* 44: 3567-3585.
- 738 38. Hernández-Munain, C., P. Lauzurica, and M. S. Krangel. 1996. Regulation of T  
739 cell receptor d gene rearrangement by c-Myb. *J Exp Med* 183: 289-293.
- 740 39. Hsiang, Y. H., J. P. Goldman, and D. H. Raulet. 1995. The role of c-Myb or a  
741 related factor in regulating the T cell receptor gamma gene enhancer. *J*  
742 *Immunol* 154: 5195-5204.
- 743 40. Bender, T. P., C. S. Kremer, M. Kraus, T. Buch, and K. Rajewsky. 2004. Critical  
744 functions for c-Myb at three checkpoints during thymocyte development. *Nat*  
745 *Immunol* 5: 721-729.
- 746 41. Yuan, J., R. B. Crittenden, and T. P. Bender. 2010. c-Myb promotes the survival  
747 of CD4+CD8+ double-positive thymocytes through upregulation of Bcl-xL. *J*  
748 *Immunol* 184: 2793-2804.

- 749 42. Dionne, C. J., K. Y. Tse, A. H. Weiss, C. B. Franco, D. L. Wiest, M. K. Anderson, and  
750 E. V. Rothenberg. 2005. Subversion of T lineage commitment by PU.1 in a clonal  
751 cell line system. *Dev Biol* 280: 448-466.
- 752 43. Ye, S. K., K. Maki, T. Kitamura, S. Sunaga, K. Akashi, J. Domen, I. L. Weissman, T.  
753 Honjo, and K. Ikuta. 1999. Induction of germline transcription in the TCRg  
754 locus by Stat5: implications for accessibility control by the IL-7 receptor.  
755 *Immunity* 11: 213-223.
- 756 44. Ye, S. K., Y. Agata, H. C. Lee, H. Kurooka, A. Shimizu, T. Honjo, and K. Ikuta. 2001.  
757 The IL-7 receptor controls the accessibility of the TCRg locus by Stat5 and  
758 histone acetylation. *Immunity* 15: 813-823.
- 759 45. Lauzurica, P., X. P. Zhong, M. S. Krangel, and J. L. Roberts. 1997. Regulation of T  
760 cell receptor  $\delta$  gene rearrangement by CBF/PEBP2. *J Exp Med* 185: 1193-1201.
- 761 46. Hsiang, Y. H., D. Spencer, S. Wang, N. A. Speck, and D. H. Raulet. 1993. The role  
762 of viral enhancer "core" motif-related sequences in regulating T cell receptor-  
763 gamma and -delta gene expression. *J Immunol* 150: 3905-3916.
- 764 47. Sanda, T., L. Lawton, M. I. Barrasa, Z. P. Fan, H. Kohlhammer, A. Gutierrez, W.  
765 Ma, J. Tatarek, Y. Ahn, M. A. Kelliher, C. H. Jamieson, L. M. Staudt, R. A. Young,  
766 and A. T. Look. 2012. Core transcriptional regulatory circuit controlled by the  
767 TAL1 complex in human acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 22: 209-  
768 221.
- 769 48. Mansour, M. R., B. J. Abraham, L. Anders, A. Berezovskaya, A. Gutierrez, A. D.  
770 Durbin, J. Etchin, L. Lawton, S. E. Sallan, L. B. Silverman, M. L. Loh, S. P. Hunger,  
771 T. Sanda, R. A. Young, and A. T. Look. 2014. An oncogenic super-enhancer  
772 formed through somatic mutation of noncoding intergenic element. *Science*  
773 346: 1373-1377.
- 774 49. Saint -André, V., A. J. Federation, C. Y. Lin, B. J. Abraham, J. Reddy, T. I. Lee, J. E.  
775 Bradner, and R. A. Young. 2016. Models of human core transcriptional  
776 regulatory circuitries. *Genome Res* 26: 385-396.
- 777 50. Choi, A., A. Illendula, J. A. Pulikkan, J. E. Roderick, J. Tesell, J. Yu, N. Hermance, L.  
778 J. Zhu, L. H. Castilla, J. H. Bushweller, and M. A. Kelliher. 2017. RUNX1 is  
779 required for oncogenic Myb and Myc enhancer activity in T-cell acute  
780 lymphoblastic leukemia. *Blood* 130: 1722-1733.
- 781 51. Abraham, R. T., and A. Weiss. 2004. Jurkat T cells and development of the T-cell  
782 receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol* 4: 301-308.
- 783 52. Brignall, R., P. Cauchy, S. L. Bevington, B. Gorman, A. O. Pisco, J. Bagnall, C.  
784 Boddington, W. Rowe, H. England, K. Rich, L. Schmidt, N. P. Dyer, M. A. Travis, S.  
785 Ott, D. A. Jackson, P. N. Cockerill, and P. Paszek. 2017. Integration of kinase and  
786 calcium signaling at the level of chromatin underlies inducible gene activation  
787 in T cell. *J Immunol* 199: 2652-2667.
- 788 53. Redondo, J. M., J. L. Pfohl, and M. S. Krangel. 1991. Identification of an essential  
789 site for transcriptional activation within the human T-cell receptor  $\delta$  enhancer.  
790 *Mol Cell Biol* 11: 5671-5680.
- 791 54. O'Neil, J., J. Grim, P. Strack, S. Rao, D. Tibbitts, C. Winter, J. Hardwick, M.  
792 Welcker, J. P. Meijerink, R. Pieters, G. Draetta, R. Sears, B. E. Clurman, and A. T.  
793 Look. 2007. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway  
794 activation and resistance to g-secretase inhibitors. *J Exp Med* 204: 1812-1824.

- 795 55. Hernández-Munain, C., and M. S. Krangel. 2002. Distinct roles for c-Myb and  
796 core binding factor/polyoma enhancer-binding protein 2 in the assembly and  
797 function of a multiprotein complex on the TCR d enhancer in vivo. *J Immunol*  
798 169: 4362-4369.
- 799 56. Kovall, R. A., B. Gebelein, D. Sprinzak, and R. Kopan. 2017. The canonical Notch  
800 signaling pathway: structural and biochemical insights into shape, sugar, and  
801 force. *Dev Cell* 41: 228-241.
- 802 57. Tober, J., M. W. Majirnborg, and N. A. Speck. 2016. Taking a leap: Runx1 in the  
803 formation of blood from endothelium. *Curr Top Dev Biol* 118: 113-162.
- 804 58. Chari, S., and S. Winandy. 2008. Ikaros regulates Notch target gene expression  
805 in developing thymocytes. *J Immunol* 181: 6265-6274.
- 806 59. Morales del Real, M., and E. V. Rothenberg. 2013. Architecture of a  
807 lymphomyeloid delopmental switch controlled by PU.1, Notch and Gata3.  
808 *Development* 140: 1207-1219.
- 809 60. Franco, B. P., D. D. Scripture-Adams, I. Proekt, T. Taghon, A. H. Weiss, M. A. Yui,  
810 S. L. Adams, R. A. Diamond, and E. V. Rothenberg. 2006. Notch/Delta signaling  
811 constrains reengineering of pro-T cells by PU.1. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:  
812 11993-11998.
- 813 61. Guo, Y., I. Maillard, S. Chakraborty, E. V. Rothenberg, and N. A. Speck. 2008. Core  
814 binding factors are necessary for natural killer cell development and cooperate  
815 with Notch signaling during T-cell specification. *Blood* 112: 480-492.
- 816 62. Wang, H., C. Zang, L. Taing, K. L. Arnett, Y. J. Wong, W. S. Pear, S. C. Blacklow, X.  
817 S. Liu, and J. C. Aster. 2014. NOTCH1-RBPJ complexes drive target gene  
818 expression through dynamic interactions with superenhancers. *Proc Natl Acad*  
819 *Sci USA* 111: 705-710.
- 820 63. González-García, S., M. García-Peydró, E. Martín-Gayo, E. Ballestar, M. Esteller,  
821 R. Bornstein, J. L. de la Pompa, A. A. Ferrando, and M. L. Toribio. 2009. CSK-  
822 MAML-dependent Notch1 signaling controls T lineage-specific IL-7Ra gene  
823 expression in early human thymopoiesis and leukemia. *J Exp Med* 206: 779-  
824 791.
- 825 64. Magri, M., A. Yatim, C. Benne, M. Balbo, A. Henry, A. Serraf, S. Sakano, L. Gazzolo,  
826 Y. Lévy, and J. D. Lelièvre. 2009. Notch ligands potentiate IL-7-driven  
827 proliferation and survival of human thymocyte precursors. *Eur J Immunol* 39:  
828 1231-1240.
- 829 65. Lichtinger, M., M. Hoogenkamp, H. Krysinka, R. Ingram, and C. Bonifer. 2010.  
830 Chromatin regulation by RUNX1. *Blood Cell Mol Dis* 44: 287-290.
- 831 66. Nakamura, M., K. Shibata, S. Hatano, T. Sato, Y. Ohkawa, H. Yamada, K. Ikuta,  
832 and Y. Yoshikai. 2015. A genome-wide analysis identifies a notch-RBP-Jk-IL-  
833 7Ra axis that controls IL-17-producing gd T cell homoestasis in mice. *J Immunol*  
834 194: 243-251.
- 835 67. Kueh, H. Y., M. A. Yui, K. K. H. Ng, S. S. Pease, J. A. Zhang, S. S. Damle, G.  
836 Freedman, S. Siu, I. D. Bernstein, M. B. Elowitz, and E. V. Rothenberg. 2016.  
837 Asynchronous combinatorial action of four regulatory factors activates Bcl11b  
838 for T cell commitment. *Nat Immunol* 17: 956-965.
- 839 68. Andersen, P., H. Uosaki, L. T. Shenje, and C. Kwon. 2012. Non-canonical Notch  
840 signaling: emerging role and mechanism. *Trends Cell Biol* 22: 257-265.

841 69. Van de Walle, I., A. C. Dolens, K. Durinck, W. Van Loocke, S. Damle, E.  
842 Waegemans, J. De Medts, I. Velghe, M. De Smedt, B. Vanderckhove, T. Kerre, J.  
843 Plum, G. Leclercq, E. V. Rothenberg, P. Van Vlierberghe, F. Speleman, and T.  
844 Taghon. 2016. GATA3 induces human T-cell commitment by restraining Notch  
845 activity and repressing NK-cell fate. *Nat Commun* 7: 1-14.  
846  
847

848 **FIGURE LEGENDS**

849 **Figure 1. TCR gene rearrangements during thymocyte development, and *Tcra/Tcrd***

850 **and *Tcrg* genomic structure. (A)** Representation of thymocyte maturation depicting the

851 thymocyte stages and TCR gene rearrangements. Thymus is represented as a light grey

852 rectangle.  $\beta$ ,  $\gamma\delta$  and positive selection, depending on the expression of pre-TCR, TCR $\gamma\delta$  or

853 TCR $\alpha\beta$ , respectively, are indicated. Intensities of Notch and IL7R signaling are indicated.

854 Thymocyte maturation to  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T lymphocytes is represented by the transition from

855 white to grey, as indicated. Genomic structure of mouse *Tcra/Tcrd* **(B)** and *Tcrg* **(C)** loci.

856 V, D and J segments are represented as vertical rectangles, and recombination signal

857 sequences are shown as triangles. Constant regions are represented as horizontal rectangles.

858 Promoters and enhancers are represented as diamonds or circles, respectively. Arrows

859 represent active sites for germline transcription. In DP thymocytes, the *Tcrd* gene is located

860 in an extrachromosomal circle.

861 **Figure 2. *Tcrd* and *Tcrg* transcription is directly linked to the recruitment of RUNX1**

862 **and MYB to E $\delta$  and E $\gamma$  during  $\beta$ -selection. (A)** C $\alpha$ , C $\delta$  and C $\gamma$  transcription in *Rag2*<sup>-/-</sup>,

863 *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tg, *Rag2*<sup>-/-</sup>xE $\alpha$ <sup>-/-</sup> and *Rag2*<sup>-/-</sup> $\beta$ tgxE $\alpha$ <sup>-/-</sup> thymocytes (n=6-7). **(B)** *Runx1*, *Runx3* and

864 *Myb* transcription in *Rag2*<sup>-/-</sup> and *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tg thymocytes (n=5-11). **(C)** Binding of RUNX1

865 and MYB to E $\delta$ , E $\gamma$ , E $\alpha$  and *Oct2* sequences in *Rag2*<sup>-/-</sup> and *Rag2*<sup>-/-</sup>x $\beta$ tg thymocytes (n=5-9).

866 **(D)** C $\gamma$ , C $\delta$ , *Runx1* and *Myb* transcription in *Rag2*<sup>-/-</sup>xE $\alpha$ <sup>-/-</sup> after CD3 $\epsilon$  mAb injection at the

867 indicated times (n=3). **(E)** Binding of RUNX1 and MYB to E $\delta$ , E $\gamma$ , E $\alpha$ , and *Oct2*

868 sequences in *Rag2*<sup>-/-</sup>xE $\alpha$ <sup>-/-</sup> and CD3 $\epsilon$  mAb injected *Rag2*<sup>-/-</sup>xE $\alpha$ <sup>-/-</sup> thymocytes (n=3). The

869 data represent the mean  $\pm$  SEM of duplicate results obtained from n independent

870 experiments. Significance between the obtained values as indicated or relative to control  
871 *Rag2<sup>-/-</sup>xEα<sup>-/-</sup>* thymocytes (D) is shown.

872 **Figure 3. Stimulation-dependent differential recruitment of RUNX1 and MYB to Eδ**  
873 **and Eγ in SCID.adh cells. (A)** Cα and Cδ transcription in NS and P+I-stimulated cells  
874 after 24 and 48 h (n=7). **(B)** Cγ transcription in the absence (-) or presence of IL-7 after 24  
875 and 48 h (n=10). **(C)** Cγ transcription in NS and P+I-stimulated cells in the absence (-) or  
876 presence of IL-7 for 48 h (n=4). **(D)** *Runx1* and *Myb* transcription in NS or P+I-stimulated  
877 cells after 24 h and 48 h (n=5). **(E)** *Runx*, *Runx3* and *Myb* transcription in NS cells (n=5).  
878 **(F)** Binding of RUNX1 and MYB to Eδ, Eγ and *Oct2* exon sequences in NS and P+I-  
879 stimulated cells (n=12). The data represent the mean ± SEM of duplicate results obtained  
880 from n independent experiments. Significance between the obtained values as indicated is  
881 shown.

882 **Figure 4. Mutual regulation of RUNX1 and MYB controls *Tcrd* and *Terg***  
883 **transcription. *Runx1*, *Myb*, Cδ, Cγ and *Ubb* transcription upon *Runx1* downregulation in**  
884 **SCID.adh cells transduced with sh*Runx1*- (A) or sh*Myb*- (B) containing lentiviruses (n=5-**  
885 **8). The data represent the mean ± SEM of duplicate results obtained from n independent**  
886 **experiments. Significance between the obtained values relative to cells transduced with**  
887 **control pLKO.1 lentiviruses is shown.**

888 **Figure 5. Notch signaling induces *Runx1*, *Tcrd* and *Terg* transcription in DN**  
889 **thymocytes and SCID.adh cells. (A)** *Notch1* and *Hes1* transcription in *Rag2<sup>-/-</sup>* and *Rag2<sup>-/-</sup>*  
890 *xβtg* thymocytes (n=4). **(B)** *Notch1* and *Hes1* transcription in *Rag2<sup>-/-</sup>xEα<sup>-/-</sup>* thymocytes after  
891 CD3ε mAb injection at the indicated times (n=3). **(C)** *Notch1*, *Runx1*, *Myb*, Cδ and Cγ



892 transcription in DN thymocytes from E14.5 *Rag2*<sup>-/-</sup>*xβtgxEα*<sup>-/-</sup> mice transduced with GFP or  
893 ICN1 retroviruses cultured on OP9 cells (n=3). **(D)** *Notch1*, *Runx1*, *Myb*, Cδ and Cγ  
894 transcription in DN thymocytes from E14.5 *Rag2*<sup>-/-</sup>*xβtgxEα*<sup>-/-</sup> mice cultured on OP9 cells or  
895 OP9-DL1 cells (n=3). **(E)** *Notch1* and *Hes1* transcription in NS or P+I stimulated SCID.adh  
896 cells for 24 or 48 h (n=6). **(F)** *ICN1*, *Hes1*, *Runx1*, *Myb*, Cδ and Cγ transcription in  
897 SCID.adh cells transduced with GFP or ICN1 retroviruses (n=7). **(G)** Cγ transcription in  
898 SCID.adh cells transduced with GFP or ICN1 retroviruses (n=7) or treated or not with  
899 DAPT for 24 h in the absence or presence of IL-7 (n=3). **(H)** *Hes1*, *Runx1*, *Myb*, Cδ and Cγ  
900 transcription in SCID.adh cells untreated or treated with DAPT for 24 or 48 h (n=15). The  
901 data represent the mean ± SEM of duplicate results obtained from n independent  
902 experiments. Significance between the obtained values relative to control *Rag2*<sup>-/-</sup>*xEα*<sup>-/-</sup>  
903 thymocytes (B) or as indicated is shown.

904 **Figure 6. NOTCH1 signaling activates transfected Eδ and Eγ in Jurkat cells.** **(A)** Gene  
905 transcription in NS and P+I stimulated cells after 24 and 48 h (n=6). **(B)** Structure of Eδ  
906 indicating the location of the δE1-to-δE7 elements and the binding sites for RUNX1 and  
907 MYB at δE3 and their mutant versions. **(C)** Eδ activity upon P+I-cell stimulation for 24 h  
908 (n=6). **(D)** Eδ activity upon ICN1 overexpression in Vδ1p-driven LUC constructs (n=8).  
909 **(E)** Eδ activity upon ICN1 overexpression in TEAp-driven LUC constructs (n=5). **(F)** Eδ  
910 activity upon DAPT treatment (n=8). **(G)** Structure of Eγ1 and Eγ4 indicating the location  
911 of the NFγ1-to-NFγ4 elements and the binding sites for STAT5 at NFγ2 and for RUNX1  
912 and MYB at NFγ3. **(H)** Eγ1 and Eγ4 activity upon P+I-cell stimulation for 24 h (n=6). **(I)**  
913 Eγ1 and Eγ4 activity upon ICN1 overexpression in cfosp-driven LUC constructs (n=6). **(J)**

914 Structure of transfected human *TCRD* minilocus constructs containing WT or mutant  
915 versions of E $\delta$  present in the W7 and M20 clones. V, D and J segments and *TRDC* exons  
916 are represented as black boxes. WT  $\delta$ E1- $\delta$ E7 and mMyb  $\delta$ E3 elements are indicated as  
917 open and closed boxes, respectively. **(K)** *ICN1*, *HESI* and C $\delta$  transcription in clones  
918 transduced with GFP or ICN1 retroviruses (n=3). The data represent the mean  $\pm$  SEM of  
919 duplicate results obtained from n independent experiments. Significance between the  
920 obtained values as indicated is shown.

921 **Figure 7. Notch-dependent recruitment of RUNX1 and MYB to E $\delta$  and E $\gamma$ . (A)**  
922 Binding of RUNX1 and MYB to E $\delta$ , E $\gamma$  and *Oct2* sequences (n=8), and **(B)** CTCF to E $\alpha$   
923 (n=3) in SCID.adh cells NS or DAPT-treated for 24 h. The data represent the mean  $\pm$  SEM  
924 of duplicate results obtained from n independent experiments. Significance between the  
925 obtained values as indicated is shown.