



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

*“Análisis transcriptómico y epigenético de Linfocitos T
CD8⁺ de neonatos y adultos humanos en estado basal y
durante la activación”*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

DARELY YARAZETH GUTIÉRREZ REYNA

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Ma. Angélica Santana Calderón

CUERNAVACA, MORELOS.

JUNIO, 2020.

Miembros de Comité Tutorial

Dra. María Angélica Santana Calderón

(Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos)

Dra. Sonia Dávila Ramos

(Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos)

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

(Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos)

Miembros del Jurado

Dr. Vicente Madrid Marina

(Instituto Nacional de Salud Pública)

Dr. Armando Hernández Mendoza

(Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos)

Dr. Martin Gustavo Pedraza Alva

(Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México)

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

(Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos)

Publicaciones Relacionadas con la Tesis

Darely Yarazeth Gutiérrez-Reyna, Alejandra Cedillo-Baños, Linda Aimara Kempis-Calanis, Oscar Ramírez-Pliego, Lisa Bargier, Denis Puthier, José David Abad-Flores, Morgane Thomas-Chollier, Denis Thieffry, Alejandra Medina-Rivera, Salvatore Spicuglia, María Angelica Santana. IL-12 signaling contributes to the reprogramming of neonatal CD8+ T cells. *Frontiers in Immunology* (2020).

Resumen

Los neonatos son muy susceptibles a patógenos intracelulares, esto conduce a una alta tasa de mortalidad. En este trabajo nos enfocamos en las células T CD8⁺, cuya función principal es la eliminación de las células infectadas por patógenos intracelulares. Las células T CD8⁺ neonatales presentan diferentes características en comparación con las células de adulto, que pudieran llevar a la alta vulnerabilidad a infecciones de los neonatos. Entre ellas están una mayor susceptibilidad a apoptosis, un alto umbral de activación, genes característicos de la inmunidad innata y baja producción de citocinas proinflamatorias. Todas estas características se reflejan en el perfil transcriptómico y epigenético únicos de las células T CD8⁺ vírgenes neonatales. Pero surgen las siguientes preguntas ¿Se puede modificar este perfil transcripcional único de las células neonatales con señales de activación fuertes (i.e. la presencia de la IL-12)? Y ¿Qué señales pudieran estar regulando este perfil transcriptómico y epigenético de las células T CD8⁺ vírgenes neonatales?

Para contestar la primera pregunta, evaluamos el transcriptoma de las células T CD8⁺ de neonatos y adultos en estado basal y en respuesta a la activación por el TCR, en presencia y ausencia de la IL-12. Encontramos que en las células neonatales, las señales de la IL-12 contribuyen a la expresión de genes tipo células de adulto, asociados con señalización intracelular, citocinas de las células T, metabolismo y división celular y además, contribuyó a la inhibición del FT firma de neutrófilos CEBPE y a otros genes relacionados con una respuesta tipo inmunidad innata. También las señales de la IL-12 indujeron la apertura de genes de citotoxicidad. Esto sugiere que las señales de la IL-12 contribuyen a la reprogramación epigenética de las células T CD8⁺ neonatales.

Para contestar la segunda pregunta, analizamos el perfil epigenético de las células T CD8⁺ de neonatos y adultos y evaluamos los motivos de unión de factores transcripcionales (FTs) en las distintas regiones de la cromatina y en los promotores de los clústeres de genes diferencialmente expresados entre estas células. Entre ellos encontramos en los promotores activos únicamente de las células de adulto a los motivos de unión a FTs de respuesta a interferón IRF2 e IRF3. Por otra parte, en las células neonatales encontramos a los motivos de unión a FTs de respuesta canónica a Wnt, TCF1 y LEF1, así también a Bcl11A y Bcl11B. También encontramos diferencias en los motivos de unión de miembros de la familia NFAT, particularmente a NFATc2 encontrado en los potenciadores activos de las células neonatales y NFATc1 en las células de adultos. Sugiriéndonos a estos FTs como reguladores importantes de la cromatina en las células T CD8⁺ de neonatos y adultos.

Índice

<u>Resumen</u>	i
<u>Abreviaturas</u>	vi
<u>Introducción</u>	1
<u>Sistema Inmune</u>	1
<u>Inmunidad Adaptativa</u>	2
<u>Linfocitos T CD8⁺</u>	3
<u>Activación de Linfocitos T</u>	6
<u>Control de la Expresión Genética en Eucariontes</u>	7
<u>Mecanismos Epigenéticos</u>	8
<u>Sistema Inmune Neonatal</u>	9
<u>Justificación</u>	13
<u>Objetivos</u>	15
<u>Objetivo General</u>	15
<u>Objetivos Particulares</u>	15
<u>Hipótesis</u>	16
<u>CAPÍTULO 1: <i>La IL-12 contribuye a la maduración de las células T CD8⁺ neonatales.</i></u>	17
<u>Introducción</u>	17
<u>Señales que llevan a la activación del linfocito T CD8⁺</u>	17
<u>IL-12 y su señalización</u>	21
<u>Metabolismo durante la activación de las células T</u>	23
<u>Metilación del DNA</u>	29
<u>Metilación de islas CpG</u>	32
<u>Antecedentes</u>	37
<u>Planteamiento del problema</u>	41
<u>Hipótesis</u>	42
<u>Objetivos del Capítulo</u>	42
<u>Objetivo General</u>	42
<u>Objetivos Particulares</u>	42
<u>Metodología</u>	43
<u>Metodología Experimental</u>	43
<u>Cultivo y estimulación de las células</u>	43

<u>Preparación del RNA y RT-qPCR</u>	43
<u>Extracción de DNA e Inmunoprecipitación de DNA metilado (MeDIP)</u>	44
<u>Análisis de Estadístico</u>	45
<u>Metodología Bioinformática:</u>	45
<u>Procesamiento de los datos de RNA-seq, Expresión diferencial y Clusterización</u>	45
<u>Búsqueda de Promotor y de Islas CpG</u>	47
<u>Resultados</u>	48
<u>Purificación de linfocitos T CD8[±]</u>	48
<u>Las señales de la IL-12 contribuyen a la reprogramación transcripcional de las células T CD8[±] neonatales</u>	50
<u>Las señales de la IL-12 inducen la expresión genes de señalización y de citotoxicidad</u>	55
<u>Las señales de la IL-12 inducen la expresión de genes de función celular y metabolismo</u>	59
<u>Las señales de la IL-12 reprimen a los genes relacionados con inmadurez de las células T CD8⁺ neonatales</u>	64
<u>El perfil inflamatorio de las células T CD8⁺ neonatales no está completamente reprimido por la coestimulación con IL-12</u>	66
<u>Cambios en la metilación del DNA de los promotores inducidos por las señales del TCR o TCR/IL-12</u>	69
<u>Conclusiones del Capitulo</u>	71
<u>Capítulo 2: Asociación de motivos de unión de factores transcripcionales con las regiones regulatorias del epigenoma de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos</u>	72
<u>Introducción</u>	72
<u>Regulación de la expresión génica por el epigenoma</u>	72
<u>Modificaciones de Histonas</u>	77
<u>Estados de la cromatina</u>	80
<u>Métodos para analizar la jerarquía de la accesibilidad de la cromatina</u>	86
<u>ATAC-seq</u>	90
<u>Factores transcripcionales</u>	93
<u>Los Factores Transcripcionales participantes en la regulación del epigenoma</u>	95
<u>Mecanismos epigenéticos en los linfocitos T CD8[±]</u>	96
<u>Antecedentes</u>	98
<u>Planteamiento del Problema</u>	102
<u>Objetivos del capítulo</u>	104
<u>Objetivo General:</u>	104
<u>Objetivos Particulares:</u>	104

<u>Hipótesis:</u>	<u>105</u>
<u>Metodología:</u>	<u>105</u>
<u>Metodología Experimental:</u>	<u>105</u>
<u>Purificación de Linfocitos T CD8⁺ vírgenes:</u>	<u>105</u>
<u>ATAC-seq:</u>	<u>106</u>
<u>Extracción de RNA y síntesis de cDNA:</u>	<u>106</u>
<u>PCR-tiempo real:</u>	<u>107</u>
<u>Análisis Estadístico:</u>	<u>107</u>
<u>Metodología Bioinformática:</u>	<u>107</u>
<u>Definir Regiones Regulatorias:</u>	<u>107</u>
<u>Procesamiento de Datos:</u>	<u>108</u>
<u>Calidad de Datos FASTQC:</u>	<u>108</u>
<u>Remover Mala Calidad:</u>	<u>109</u>
<u>Alineamiento del Genoma:</u>	<u>109</u>
<u>Calidad de Alineamiento:</u>	<u>109</u>
<u>Peak Calling:</u>	<u>109</u>
<u>Reproducibilidad entre las réplicas:</u>	<u>110</u>
<u>Visualización de los Picos:</u>	<u>110</u>
<u>Definiendo Estados de la Cromatina:</u>	<u>110</u>
<u>Procesamiento de Datos:</u>	<u>111</u>
<u>Resultados:</u>	<u>114</u>
<u>Purificación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos:</u>	<u>114</u>
<u>Objetivo 1: Definición de los motivos de unión a FT en los promotores de los Clústeres de genes diferencialmente expresados en células T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos:</u>	<u>116</u>
<u>Objetivo 2: Definir y validar los sitios de unión a FT en regiones regulatorias de los distintos Estados de la Cromatina, característicos de las células T CD8⁺ neonatales y de adultos:</u>	<u>129</u>
<u>Análisis de los Estados de la Cromatina:</u>	<u>130</u>
<u>131</u>	
<u>Análisis de las regiones regulatorias a partir de los estados de la cromatina de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos:</u>	<u>136</u>
<u>Análisis de sobrelape del ChIP-seq de Factores Transcripcionales de líneas celulares con las regiones regulatorias de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos:</u>	<u>140</u>
<u>Análisis de las regiones regulatorias filtradas con el ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos:</u>	<u>144</u>

<u>Análisis de peak-motifs en las regiones regulatorias de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.....</u>	<u>145</u>
<u>Análisis de vías de señalización en las regiones regulatorias filtradas con el ATAC-seq de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.....</u>	<u>148</u>
<u>Conclusiones del Capítulo.....</u>	<u>152</u>
<u>Discusión General.....</u>	<u>154</u>
<u>Reprogramación transcripcional por las señales de la IL-12.....</u>	<u>155</u>
<u>Motivos de unión de factores transcripcionales ligados a regiones regulatorias.....</u>	<u>159</u>
<u>Anexos.....</u>	<u>171</u>
<u>Anexo 1. Purificación.....</u>	<u>171</u>
<u>Anexo 2. Protocolo ATAC-seq.....</u>	<u>177</u>
<u>Anexo 3. Protocolo Extracción de RNA por TRIZOL y síntesis cDNA.....</u>	<u>178</u>
<u>Anexo 4. Lista de Primers.....</u>	<u>180</u>
<u>Anexo 5. Extracción gDNA.....</u>	<u>183</u>
<u>Anexo 6. Sonicación de DNA.....</u>	<u>183</u>
<u>Anexo 7. MeDIP.....</u>	<u>183</u>
<u>Anexo 8. Sobrelape de FTs en regiones promotoras de clústeres.....</u>	<u>184</u>
<u>Anexo 9. Procesamiento de datos de CHIP-seq.....</u>	<u>187</u>
<u>Anexo 10. Análisis del ATAC-seq.....</u>	<u>203</u>
<u>Anexo 11. Tablas.....</u>	<u>215</u>
<u>Anexo 12. Figuras.....</u>	<u>215</u>
<u>Bibliografía.....</u>	<u>220</u>

Abreviaturas

Factor Transcripcional → FT

Células Asesinas Naturales → Células NK

Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia → UNICEF

Células madre hematopoyéticas → HSC

Receptor tipo toll → TLR

Adenosín Monofosfato cíclico → cAMP

Proteína cinasa A → PKA

Trampas Extracelulares de Neutrófilos → NETs

Complejo Mayor de Histocompatibilidad → MHC

Interleucina → IL

Interferón → IFN

Factor de Necrosis Tumoral → TNF

Receptor tipo-inmunoglobulina de leucocito 1 → LIR-1

Inmunoglobulina → Ig

Emigrantes Recientes del Timo → RTEs

RNA mensajero → mRNA

Células T helper → Th

Célula T reguladora → Treg

Especies Reactivas de Oxígeno \rightarrow ROS

Células Presentadoras de Antígeno \rightarrow APC

Ligando de FAS \rightarrow FasL

Dominios de Muerte asociados a FAS \rightarrow FADD

Linfocito T citotóxico \rightarrow Tc

Calcio \rightarrow Ca²⁺

Receptor de células T \rightarrow TCR

Grupo central de activación supramolecular \rightarrow cSMAC

Grupo de activación supramolecular periférico \rightarrow pSMAC

Grupo de activación supramolecular distal \rightarrow dSMAC

Molécula de adhesión Intercelular 1 \rightarrow ICAM-1

Antígeno asociado a la función del linfocito 1 \rightarrow LFA-1

Moléculas de inmunoglobulinas y mucina \rightarrow TIM

DNA metiltransferasas \rightarrow Dnmts

S-Adenil metionina \rightarrow SAM

5-metilcitosina \rightarrow 5mC

5-hidroximetilcitosina \rightarrow 5hmC

Enzimas de translocación ten-eleven \rightarrow Tet

Introducción

Sistema Inmune

El sistema inmune está constituido por células y moléculas que dan protección frente a agentes infecciosos y nuestras propias células disfuncionales. La respuesta inmune se basa en el reconocimiento de lo “extraño” y “potencialmente peligroso”, aunque en ocasiones se pueden desencadenar respuestas inmunitarias a sustancias no infecciosas o componentes de nuestro cuerpo. Para poder comprender como trabaja el sistema inmune, podemos dividirlo en dos grandes ramas, el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo.

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa a la que se enfrentan los patógenos, que está lista para entrar en acción de inmediato cuando el huésped es atacado por estos. Se conforma de barreras físicas, químicas, celulares y proteínas sanguíneas (Abbas et al., 2015).

Las barreras físicas presentes son las capas epiteliales, superficies mucosas y tejidos glandulares. Las barreras químicas comprenden sustancias solubles especializadas que tienen actividad antimicrobiana y el pH ácido estomacal (Kindt et al., 2007). La defensa celular del sistema inmune innato consta de diferentes células con receptores sensibles a productos microbianos o señales de estrés celular. Estas células son los neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales y otros linfocitos como las células linfoides innatas, las células B1 y los linfocitos T intraepiteliales. Las proteínas sanguíneas son las proteínas del complemento y otros mediadores de la inflamación. Todos estos elementos constituyen a la llamada inmunidad innata o natural, permitiendo responder de una manera rápida y eficaz ante infecciones. Sin embargo, esta inmunidad es limitada e insuficiente para microorganismos más patogénicos.

Los agentes infecciosos han evolucionado para ser resistentes al sistema inmune innato y cuando la infección es muy fuerte o persistente, y no puede ser controlada totalmente por el sistema innato, se activa el sistema inmune adaptativo. Este último es capaz de reconocer específicamente al antígeno y recordarlo (memoria inmunológica) para responder en mayor magnitud y capacidades defensivas ante un particular agente infeccioso, adaptándose a este mismo de forma más intensa a exposiciones posteriores al mismo antígeno.

A continuación describiremos en más detalle el sistema inmune adaptativo.

Inmunidad Adaptativa

El sistema inmune adaptativo, como se ha descrito anteriormente, puede responder más específicamente ante un agente infeccioso particular. Esto es debido a las características que presenta la inmunidad adaptativa. Entre ellas la especificidad ante los diferentes agentes infecciosos, la memoria, la expansión clonal de las células capaces de reconocer el agente infeccioso específico y la gran diversidad de receptores celulares capaces de reconocer a una enorme gama de antígenos diferentes.

Las células que componen el sistema inmune adaptativo son los linfocitos B y los linfocitos T. Los linfocitos B producen anticuerpos que reconocen a los antígenos, permitiendo que se marquen, neutralicen y se eliminen los antígenos por mecanismos efectoros. Los principales subtipos de linfocitos T que se encuentran en abundancia en circulación son los linfocitos T $CD4^+$ y los linfocitos T $CD8^+$.

Los linfocitos T $CD4^+$, son los linfocitos cooperadores, que reciben su nombre porque coordinan la respuesta inmune a través de su comunicación con los macrófagos, neutrófilos, 2

linfocitos T CD8⁺, células asesinas naturales (células NK) y otros leucocitos para que destruyan a los agentes infecciosos. También ayudan a los linfocitos B a producir anticuerpos de mayor afinidad y del isotipo que requiere la respuesta inmune a un reto específico. Los linfocitos T CD8⁺, en cambio, son las células citotóxicas, responsables de la eliminación de patógenos intracelulares, células cancerosas y células disfuncionales (Abbas et al., 2015).

Linfocitos T CD8⁺

Las células T CD8⁺ juegan un papel importante ante la eliminación de patógenos intracelulares y tumores. Estos linfocitos, al igual que los linfocitos T CD4⁺, se desarrollan en el timo y salen a la circulación sanguínea como emigrantes recientes del timo, que maduran en la circulación en células vírgenes. Estas células tienen respuesta ante el antígeno, hasta que son activadas por el reconocimiento del antígeno a través del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (por sus siglas en inglés, MHC) clase I que se encuentra en las células presentadoras de antígeno (por sus siglas en inglés, APC). Esto permite que las células T CD8⁺ se activen, proliferen y se diferencien en células efectoras o de memoria.

Las células citotóxicas efectoras necesitan establecer el contacto directo con su célula blanco, para formar así la sinapsis inmunológica y puedan llevar a cabo sus mecanismos de citotoxicidad para eliminarla. Los principales mecanismos citotóxicos de las células T CD8⁺ son la secreción de moléculas de muerte como son las granzimas y perforina y la interacción del receptor de muerte (por sus siglas en inglés, Fas) con su ligando (por sus siglas en inglés, FasL) (Halle et al., 2017).

Cuando el linfocito T CD8⁺ lleva a cabo la sinapsis inmunológica, libera el contenido de sus gránulos citotóxicos que contienen las granzima y perforina. Esta última genera poros en la membrana de la célula blanco, que permiten el flujo de iones como el calcio, activando a la célula blanco para endocitar la región dañada de su membrana. La fusión depende de la proteína de unión a GTP, Rab5 de los endosomas tempranos resultando en la formación de vesículas grandes, denominadas gigantosomas que contienen a perforina y granzima. La formación de poros mediados por perforina en las membranas de los gigantosomas inhibe la acidificación endosomal, previniendo la destrucción de los contenidos de los gránulos en el gigantosoma y permite la liberación de las granzimas dentro del citosol de la célula blanco (Gordy & He, 2012). De esta forma, se internalizan las granzimas, que son una familia de proteasas que desencadenan la apoptosis de la célula blanco (Oykhman & Mody, 2010). Otro mecanismo citotóxico presente en la sinapsis inmunológica es la interacción del receptor de muerte FAS en la célula blanco con su ligando en el linfocito citotóxico. Esta interacción induce la trimerización de los dominios de muerte asociados a Fas (FADD) que reclutan a la procaspasa 8 o 10, desencadenando la vía de señalización de apoptosis en la célula blanco (Mc et al., 2009).

Las células T CD8⁺ pueden diferenciarse en diferentes subpoblaciones efectoras de linfocitos T citotóxicos (Tc) como son, los Tc1, Tc2, Tc9, Tc17 y linfocitos T CD8⁺ supresores (Visekruna & Huber, 2014). Estas subpoblaciones de linfocitos tienen diferentes funciones, las células Tc1 son las mejor descritas, ya que matan a las células infectadas por patógenos intracelulares, por la liberación de moléculas citotóxicas como son granzima y perforina, y secretan citocinas como interferón (por sus siglas en inglés, IFN) γ y el factor de necrosis tumoral (por sus siglas en inglés, TNF) (Visekruna & Huber, 2014). Las células Tc2 pueden ser inducidas por la interleucina (IL) 4, así ellas producen IL-4, IL-5 e IL-13. Además, estas células muestran un nivel

bajo de citotoxicidad, son menos protectoras en comparación con las Tc1 en infecciones como la influenza y participan en la propagación de las alergias mediadas por los linfocitos T helper (Th) 2 (Visekruna & Huber, 2014). En el caso de los linfocitos Tc9, se encuentran en el epitelio del intestino, producen IL-9 e inhiben la activación de los linfocitos T CD4⁺, previniendo así la inflamación mediada por los linfocitos T CD4⁺ en el intestino delgado (Visekruna & Huber, 2014). Otro subtipo de linfocitos citotóxicos son los llamados Tc17, que producen IL-17 y IL-21, que participan en la generación de la autoinmunidad, contra infecciones virales y contribuyen a la respuesta contra tumores (Visekruna & Huber, 2014).

Además de los distintos subtipos de células efectoras, las células T CD8⁺ también se pueden diferenciar en células supresoras, que suprimen a las células T CD4⁺ al ser activadas e inducen actividad tolerogénica en células dendríticas (Visekruna & Huber, 2014). Una de sus principales funciones es regular las respuestas mediadas por las células T ante una infección a través de las diferentes citocinas que producen, como son TGF-β e interleucina 10 (IL-10) (Visekruna & Huber, 2014). Un subtipo de las células T CD8⁺ supresoras son las células CD8⁺ supresoras restringidas a moléculas no clásicas del MHC clase Ib Qa-1 (ratón) o HLA-E (humano) (Visekruna & Huber, 2014). Estas células reconocen los péptidos de los antígenos en complejos con Qa-1, expresado por las células T CD4⁺ activadas, y pueden eliminar las células en una manera dependiente de perforina. Qa-1 puede interactuar con CD94/NKG2A o con el TCR, que conduce a la activación y proliferación de estas células. Las células T CD8⁺ supresoras Qa-1 muestran un fenotipo de CD44^{hi} CD122⁺ Ly49⁺, surgen tarde en las respuestas ante los antígenos y se vuelven funcionales después del reencuentro con el antígeno (Visekruna & Huber, 2014). Otra subpoblación de células T CD8⁺ supresoras son las restringidas para el MHC clase Ia, que suprimen la producción de IFNγ, estas células pueden suprimir respuestas antitumorales inducidas por vacunas (Visekruna & Huber,

2014). En modelos de diabetes autoinmune, podemos encontrar otro subtipo de células T $CD8^+CD28^-$ supresoras, que son las autorregulatorias, que surgen de precursores que reconocen autoantígenos con baja afinidad. Estas células inhiben la aparición de diabetes mediante la regulación de la respuesta de células T autorreactivas, vía supresión de la presentación de antígeno en las células presentadoras de antígeno por la expresión de receptores inhibitorios. Las células T $CD8^+CD28^-$ amortiguan la respuesta inmune por la secreción de IL-10 (Yarde, Danielle, Lorenzo-Arteaga, Kristina, Corley, 2014). Finalmente, otra población de células $CD8^+$ supresoras son las células T $CD8^+FOXP3^+$ supresoras, que tienen preferencia por el tracto gastrointestinal, previenen la enfermedad del hospedero contra injertos (por sus siglas en inglés, GvHD) por la inhibición de las repuestas de células T restringidas por MHC clase I (Visekruna & Huber, 2014).

Activación de Linfocitos T

La activación de las células T se lleva a cabo en los órganos linfoides secundarios, en donde se encuentran las células presentadoras de antígeno, como lo son las células dendríticas. Estas células, circulan continuamente en el medio extracelular de los tejidos, internalizando antígenos y se activan por el reconocimiento de patógenos, que dan la alarma inmunológica, que induce su maduración y migración a los ganglios linfáticos. En estos órganos, presentan los péptidos del antígeno asociados al MHC clase II a los linfocitos T $CD4^+$ o MHC clase I a los linfocitos T $CD8^+$. Cuando el linfocito T virgen entra en circulación sanguínea, escanea los distintos antígenos en las células dendríticas de los nodos linfáticos. Puede vivir mucho tiempo (hasta 8 años) en circulación sin ser activada (Farber et al., 2014) (Abbas et al., 2015).

El contacto de los linfocitos T con las APCs durante la activación, reorganiza al TCR y a las diferentes proteínas de membrana que participan en la adherencia y señalización de las células, formando microclústeres y posteriormente la sinapsis inmunológica. Esta consiste en tres subdominios: grupo central de activación supramolecular (cSMAC) que contiene al TCR, el segundo grupo es el SMAC periférico (por sus siglas en inglés, pSMAC) que rodea a cSMAC por un anillo de las moléculas de adhesión Intercelular 1 (por sus siglas en inglés, ICAM-1) unidas a las moléculas de integrinas LFA-1 (antígeno asociada a la función del linfocito 1) y un segundo anillo llamado SMAC distal (por sus siglas en inglés, dSMAC) en el cual se acumula la fosfatasa CD45, que está asociada a cinasas de activación. La sinapsis inmunológica participa tanto en la activación de la célula T, como en el fin de la misma. Los microclústeres, que contienen también a las moléculas de señalización clústerizadas participan en la activación de la célula (Pettmann et al., 2018).

Si la célula encuentra un antígeno que reconoce específicamente a través de su receptor de antígenos (TCR, por sus siglas en inglés) podrá ser activada por una célula dendrítica activada, que es capaz de proporcionarle, además del antígeno, señales por moléculas coestimuladoras y citocinas proinflamatorias, es decir 3 distintas señales para la generación de una óptima respuesta del linfocito T ante el antígeno. En el Capítulo 1 describiremos más en detalle la participación de estas tres señales de activación del linfocito T.

Control de la Expresión Genética en Eucariontes

En los genomas de las células eucariontes, los pasos iniciales de la transcripción de un gen pueden ser regulados en tres diferentes niveles: el lineal, el epigenético y por la localización nuclear. La regulación lineal se refiere a las regiones reguladoras en el mismo gen, por ejemplo los promotores, potenciadores y barreras. Los promotores son secuencias específicas del DNA

son reconocidas por los factores basales de la transcripción que permiten o no la expresión de dicho gen. Los potenciadores (del inglés, *enhancers*) son secuencias que controlan la transcripción de genes a distancia por la unión de factores transcripcionales y pueden estar incluso en otro cromosoma; los aisladores (del inglés, *insulators*) son secuencias que previenen la difusión de heterocromatina, que se encuentran dentro de genes que son expresados, previenen que los *enhancers* activen inapropiadamente a genes vecinos de un gen activo (Mekhail & Moazed, 2010).

La localización nuclear se refiere a la localización del gen dentro del núcleo que está compuesto por “dominios nucleares” de cromatina transcripcionalmente activa o inactiva (Liu, 2020). Las regiones de los cromosomas que presentan descondensación de la cromatina y regiones transcripcionalmente activas tienden a localizarse en territorios intercromosomales, mientras que las regiones con características de heterocromatina se encuentran asociadas a la lámina nuclear. Esta asociación con la lámina nuclear ha sido caracterizada como un ambiente represivo de cromatina; sin embargo, no todos los loci con localización perinuclear están silenciados. Se ha observado cromatina transcripcionalmente activa en regiones cercanas a los poros nucleares (Liu, 2020). Por otra parte, tampoco se encuentran abiertas todas las áreas centrales del núcleo. Las regiones del DNA que contienen a los genes pueden cambiar en eu- o hetero- cromatina, dependiendo de señales de diferenciación y activación celular.

La regulación epigenética está mediada por diferentes mecanismos, como son la metilación del DNA, modificaciones de histonas y el posicionamiento del nucleosoma a lo largo del DNA (Audia & Campbell, 2016b). A continuación se describirán a más detalle estos mecanismos epigenéticos.

Mecanismos Epigenéticos

El acceso al DNA está regulado por diversos mecanismos epigenéticos que controlan la condensación y descondensación de la cromatina, como son las modificaciones de histonas, la metilación del DNA, los distintos RNA pequeños no codificantes y cambios de subunidades de histonas.

Un punto fundamental de la regulación epigenética es la modulación de la estructura de la cromatina, ya que estos mecanismos epigenéticos impactan en su organización y mantenimiento.

Uno de estos mecanismos son los diferentes RNA pequeños no codificantes, que impiden la expresión de un determinado gen, los micro RNAs (miRNAs) y algunos RNA no codificantes largos (LncRNA), no solo tienen la capacidad de regular la expresión génica, sino también de modificar el patrón de metilación de una secuencia específica, involucrándose en la formación de heterocromatina (Skvortsova et al., 2018).

Describiremos a más detalle dos mecanismos epigenéticos, que son relevantes en este estudio, los cuales son las modificaciones de histonas y la metilación del DNA en el capítulo 2.

Sistema Inmune Neonatal

Los primeros 28 días de vida son considerados como el periodo neonatal. Durante este periodo de vida el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (siglas en inglés, "UNICEF") ha registrado una alta tasa promedio de mortalidad a nivel mundial de 18 muertes por cada 1000 individuos nacidos vivos en el 2018 (*Neonatal mortality - UNICEF DATA*, 2018). Una de las principales causas de las muertes neonatales son las infecciones, representando el 31% de las causas de muerte (Adatara et al., 2019).

Este alto índice en la tasa de muertes neonatales puede deberse a que los neonatos, en comparación con los adultos, presentan diferentes características en su sistema inmune. El desarrollo del sistema inmune comienza en etapas embrionarias tempranas, inicialmente en el hígado fetal. Posteriormente, los progenitores de las células madre hematopoyéticas (por sus siglas en inglés, HSC) en la médula ósea dan lugar a los linfocitos B y a las células polimorfonucleares, como son las células cebadas, neutrófilos y eosinófilos (Basha et al., 2014) y a los progenitores de linfocitos T, que maduran en el timo.

El sistema inmune innato está compuesto de granulocitos, principalmente neutrófilos, monocitos y macrófagos, células NK, células T intraepiteliales, entre ellas las y células dendríticas. La mayoría de las células sanguíneas son los neutrófilos, sin embargo, los neutrófilos neonatales se encuentra en menor número que los neutrófilos de los adultos y tienen características especiales. Entre ellas, tienen baja expresión de receptores como receptor tipo toll (TLR, por sus siglas en inglés) 4 y expresión similar de TLR2, en comparación al adulto (Basha et al., 2014), así como una deficiente señalización a través de MyD88 y p38 en la estimulación de TLR2 y TLR4. La respuesta disminuida por la estimulación de los TLR es atribuida a los altos niveles de adenosina en la sangre neonatal, que incrementa los niveles de Adenosín Monofosfato cíclico (cAMP, por sus siglas en inglés), lo que lleva a la inhibición de la secreción de $TNF\alpha$ por la estimulación de los TLR dependiente o independiente de la proteína cinasa A (PKA, por sus siglas en inglés) (Basha et al., 2014). Otra característica es que presentan una baja cantidad de receptores de adhesión, como L-selectina y Mac-1. Además, no tienen una respuesta eficiente a la apoptosis mediada por Fas, son ineficientes en hacer trampas extracelulares (NETs, por sus siglas en inglés) y tienen una capacidad fagocítica reducida (Basha et al., 2014).

En el caso de las células dendríticas, al igual que los monocitos, también se encuentran disminuidos en los neonatos y expresan bajas cantidades del MHC clase II. Sus niveles de expresión de receptores TLR son similares a los de adultos, pero producen altos niveles de citocinas como son la IL-10, IL-6 y IL-23, que llevan a tolerancia o inflamación. Producen bajos niveles de otras citocinas tales como IFN α/β , IL-1 β , TNF e IL-12p70, que llevan a una activación deficiente de los linfocitos T. Las células NK neonatales, tienen incrementada la expresión de receptores inhibidores como son CD94/NKG2A y una baja expresión del receptor tipo-inmunoglobulina de leucocito 1 (LIR-1), que reconoce al MHC clase I. Estas células también presentan una pobre habilidad de degranulación, y hay una menor cantidad de gránulos citotóxicos, una baja producción de citocinas como son IL-15, IL-12 e IFN γ . Otro factor importante es la presencia de prostaglandinas y otras moléculas solubles que se encuentran en la sangre de cordón humano, que contribuyen a la inhibición de las funciones de las células NK (Basha et al., 2014).

Las células T $\gamma\delta$ representan el 1-5% del total de células del sistema inmune en el adulto, sin embargo este porcentaje es más bajo en el neonato (Basha et al., 2014). Este tipo celular expresa niveles bajos de CD2, CD45RO, LFA-1 y HLA-DR. También tienen bajas cantidades de perforina y granzima B (Basha et al., 2014).

En el sistema inmune adaptativo neonatal, las células B y células T tienen características particulares. A continuación se describirá a más a detalle cada tipo celular.

Las células B neonatales son vírgenes y solo tienen parcialmente desarrollado el repertorio de Inmunoglobulinas (Ig). Estas células se pueden diferenciar en dos subtipos las B-1 y B-2 en ratón (Nguyen et al., 2013). Las células B-1 expresan CD11b, altos niveles de IgM y bajos niveles de IgD, CD21, CD23 y B220 y producen anticuerpos naturales, particularmente en el intestino (Basha et al., 2014). Las células B-2 generalmente expresan alto B220, alto y bajo IgM, alto IgD,

CD43- y CD23⁺ pero no expresan CD5, aunque pueden expresar bajos niveles de CD5 al ser activadas (Nguyen et al., 2013). Los anticuerpos producidos por células B-2 de ratón y humano tienen menor probabilidad de ser autorreactivos, pero tienen una alta especificidad y afinidad debido a las permutaciones y selección clonal a través de la activación del receptor de células B (BCR) (Nguyen et al., 2013). Las células B-2 maduras también sufren recombinación en su DNA para el cambio de clase de las Igs dando lugar a la producción de las subclases de anticuerpos IgA, IgE e IgG (Nguyen et al., 2013). Los neonatos tienen centros germinales subdesarrollados en los ganglios linfáticos y bazo y una baja expresión de las moléculas coestimuladoras de las células B, incluidos CD80, CD86 y CD40, lo cual resulta en bajos niveles de respuestas primarias de IgG a infecciones y vacunas (Chougnnet, 2018).

Los prethimocitos migran al timo para madurar y diferenciarse en células T ($\alpha\beta$) de los linajes CD4 o CD8 y salen a la circulación con un fenotipo inmaduro que madura en periferia y se conocen como los emigrantes recientes del timo (RTEs, por sus siglas en inglés). Las células T de sangre de cordón están enriquecidas de RTEs y proliferan homeostáticamente en respuesta a IL-7 en ausencia de la estimulación por el TCR.

Las células T CD4⁺ neonatales presentan una polarización hacia el fenotipo Th2 y tienen una menor producción de citocinas del tipo Th1, como IFN γ , IL-2 y TNF α . Los neonatos también carecen casi por completo de las células Th17 (Basha et al., 2014), esto puede ser debido a los bajos niveles del RNA mensajero (mRNA) de RORC, resultando en la baja producción del TF ROR γ T que es firma de las células Th17 (Simon et al., 2015). También se debe al efecto inhibitorio que tiene la IL-4 en la diferenciación hacia Th17 (Debock & Flamand, 2014). Otro linaje perteneciente a los linfocitos T CD4⁺ son las células T reguladoras (Tregs), que están en una alta frecuencia en la sangre de cordón, representando el 12% de las células T CD4⁺ y el 8% en los

nodos linfáticos. Las Tregs juegan un papel importante en el control de la alorreactividad maternal y en el desarrollo del feto.

La mayoría de los linfocitos T CD8⁺ son RTEs, que presentan reducidas funciones efectoras como son la proliferación, producción de IFN γ e IL-2. Estas células neonatales, al ser activadas, producen una menor cantidad de perforina, granzima A y B, presentan una mayor proliferación homeostática y producen más CXCL8, o IL-8, que es un factor quimiotáctico para neutrófilos. Además producen péptidos antimicrobianos y una alta cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés)(Fike et al., 2019)(Galindo-Albarrán et al., 2016) (Sánchez Villanueva et al., 2019).

Justificación

La reducción de la tasa de mortalidad neonatal representa un gran reto para la organización mundial de la salud. Como ya hemos mencionado, una de las principales causas de la mortalidad neonatal son las infecciones por patógenos intracelulares. Las células del sistema inmune adaptativo que eliminan a las células infectadas por patógenos intracelulares son los linfocitos T CD8⁺. Sin embargo, las células T CD8⁺ en los neonatos presentan diferentes características en comparación con las células de adulto, que pueden ser responsables de la alta vulnerabilidad de los neonatos a las infecciones por patógenos intracelulares. Entre estas características son su alta susceptibilidad a la apoptosis, su baja producción de citocinas proinflamatorias, su alto umbral de activación, entre otras (Prabhudas et al., 2011). Estas características presentes en los linfocitos neonatales se reflejan en el perfil transcriptómico y epigenético único de estos linfocitos T CD8⁺ vírgenes neonatales (Galindo-Albarrán et al., 2016). Una revisión reciente establece que los

linfocitos T neonatales no deben ser vistos como células T de adulto deficientes, sino células muy responsivas que tienen funciones inmunes particulares, que responden a las necesidades del neonato (Rudd, 2020). Sin embargo, surge la pregunta ¿Qué factores transcripcionales pudieran está regulando este perfil transcriptómico y epigenético en los linfocitos T CD8⁺ neonatales?

Sabemos que los diferentes factores transcripcionales se unen a sus sitios de unión presentes en los promotores de los diversos genes blanco. Sin embargo, para que esta unión de los factores transcripcionales a sus sitios de unión en el DNA se lleve a cabo, es necesario que la cromatina se encuentre accesible. Como dijimos, la compactación de la cromatina está regulada por los diversos mecanismos epigenéticos, en los cuales participan complejos remodeladores de la cromatina. Estos complejos proteicos de remodelación de la cromatina que controlan el epigenoma, pueden a su vez unirse a factores transcripcionales, los cuales conducirán a estos complejos proteicos a la dirección en el genoma de sus genes blanco, para que haya cierre o apertura de la cromatina, haciendo una situación tipo ¿Qué fue primero, el huevo o la gallina? Por esto, muchos sitios que son propensos a abrirse o cerrarse al censar la célula señales extracelulares están marcados como marcas duales, de apertura y cierre de la cromatina y se denominan pausados, del inglés “*poised*”. Al recibir señales de activación o diferenciación, se pierde la marca de cierre o apertura, lo que hace que la célula adquiera el paisaje epigenético adecuado en poco tiempo.

En este proyecto investigamos los motivos de unión de factores transcripcionales que pudieran estar controlando no solo el perfil transcriptómico sino también el epigenético de los linfocitos T CD8⁺ neonatales. Esto se describirá en el Capítulo 2 de esta tesis.

Por otro lado, se ha observado que los linfocitos T CD8⁺ neonatales pueden activarse ante estímulos fuertes. Como hemos mencionado, son necesarias tres señales para que se activen correctamente los linfocitos T CD8⁺, la interacción del TCR con el péptido/MHC clase I, señales

coestimuladoras, y las citocinas. En el Capítulo 1 de este reporte, evaluamos el papel de la IL-12 en la remodelación transcripcional y epigenética de las células T CD8⁺ neonatales durante la activación. Para esto, se evaluó el transcriptoma de los linfocitos T CD8⁺ neonatales y de adulto ante las señales del TCR en presencia y ausencia de la IL-12 y se evaluó en los promotores de un grupo de genes su estado de metilación.

Objetivos

Objetivo General

Analizar la reprogramación transcriptómica y epigenética que ocurre durante la activación y los factores transcripcionales asociados a las regiones regulatorias definidas por el epigenoma de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos en estado basal.

Objetivos Particulares

1. Analizar el transcriptoma de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos durante la activación del TCR en presencia o ausencia de la IL-12.
2. Analizar la presencia de motivos de unión a factores transcripcionales en las regiones regulatorias definidas por el epigenoma de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos.

En este estudio, los objetivos particulares se dividirán en dos grandes capítulos para una mayor comprensión de los temas.

Hipótesis

Encontraremos que al activar las células T CD8⁺ neonatales con señales de TCR y en presencia de IL-12, estas células maduraran a un perfil transcriptómico más cercano al de las células de adulto. Así también, encontraremos diferencias en los motivos de unión a factores transcripcionales en los distintos clústeres de genes y de regiones de la cromatina que nos darán información sobre el perfil único de transcripción y paisaje epigenético de las células T CD8⁺ neonatales.

CAPÍTULO 1: *La IL-12 contribuye a la maduración de las células T CD8⁺ neonatales.*

Introducción

Señales que llevan a la activación del linfocito T CD8⁺

Como mencionamos en la introducción general de este trabajo, para que el linfocito T se active son necesarias diferentes señales, la primera señal es la presentación del antígeno mediante la interacción del TCR con el MHC-péptido de la célula presentadora de antígeno. Sin embargo, esta primera señal no es suficiente para activar al linfocito T, por lo cual se requieren dos tipos de señales adicionales, que son la interacción de las moléculas coestimuladoras, de la APC con sus receptores en la célula T como segunda señal. La mejor segunda señal descrita es la interacción de CD28 en las células T con CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2) en las APCs. La unión de CD28 a sus ligandos en las APCs sinergiza con los eventos de señalización del TCR que conducen al aumento en la energía de la célula, la producción de IL-2, expansión clonal y la generación de células T efectoras y de memoria. Cuando esta segunda señal no está presente resulta en una activación abortiva de las células T y conduce a anergia, es decir, la célula se vuelve no responsiva ante la presencia de un antígeno (Priyadharshini et al., 2012). No solamente CD28 se ha descrito como una señal coestimuladora, también otras moléculas como el coestimulador inducible de células T (ICOS), algunos miembros de la familia de TNF, miembros de la familia de inmunoglobulina y mucina (TIM) (L. Chen & Flies, 2013). También otros receptores que proveen señales coestimuladoras son los receptores de reconocimiento de patrones como son los receptores tipo-toll (TLRs), receptores tipo NOD (NLRs) y receptores tipo RIG-I (RLRs) (Imanishi & Saito,

2020). Por el contrario, existen receptores coestimuladores inhibitorios, como la proteína asociada a linfocitos T citotóxico 4 (CTLA-4) y la proteína de muerte celular programada (PD-1), que inhiben la activación de las células T que terminan las respuestas y previenen respuestas autoinmunes (Imanishi & Saito, 2020). El balance entre las señales coestimuladoras negativas y positivas determina la magnitud de la activación de los linfocitos T. Sin las señales coestimuladoras, la sola señal del TCR induce a la célula T a un estado anérgico. Cuando la célula se convierte en anérgica, mantiene su estado inactivo cuando la célula es expuesta a la presentación de antígeno por el MHC y TCR y moléculas coestimuladoras.

La tercera señal que completa la activación de las células T son moléculas solubles, particularmente las citocinas, como la IL-2, IFN α/β , IL-12, entre otras. (Curtsinger & Mescher, 2011). Esta tercera señal lleva a la activación eficiente de la ampliación clonal y actividades efectoras. También las citocinas que participan en la tercer señal tienen actividad de adyuvante en las vacunas mejorando su respuesta de células T ante infecciones (Curtsinger & Mescher, 2011). En este capítulo describiremos a más detalle la participación de la IL-12 como una tercera señal en la activación de las células T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos.

El reconocimiento del antígeno y coestímulos activadores inducen varias respuestas, entre ellas la secreción de citocinas y la proliferación de los linfocitos específicos frente al antígeno, lo que provoca el aumento del número de células de clones específicos contra el antígeno (lo que se llama expansión clonal) y finalmente la diferenciación de las células vírgenes en linfocitos efectores y de memoria (Kindt et al., 2007)(Abbas, 2012).

El reconocimiento del péptido del antígeno en el contexto del MHC por el TCR induce cambios dentro de las cadenas de CD3 asociadas para facilitar su fosforilación y asociación con proteínas

abajo. Las cadenas ζ y las cadenas ϵ , δ y γ del CD3 contienen motivos de activación 18

basados en tirosinas (ITAMs), que son fosforilados por la tirosina cinasa Src específica de leucocitos (Lck), que está asociada con la región intracelular de los correceptores CD4 y CD8 (Abbas et al., 2015). Los ITAMs fosforilados reclutan a la proteína cinasa activada -Zeta de la familia Syk (Zap70), por la interacción con sus dominios homólogos 2 (SH2). Zap70 fosforila múltiples residuos de tirosina dentro del ligador de activación de células T (LAT), una proteína de andamiaje asociada a membrana (Figura 1). La fosforilación de LAT recluta a una segunda proteína de andamiaje Slp76, que se une a LAT por la proteína adaptadora GRAP2 (Navarro & Cantrell, 2019). Slp76 es fosforilada por Zap70 y forman un complejo que actúa como una plataforma de reclutamiento. Una de las fosfolipasas que se une a este complejo es la fosfolipasa C gamma (PLC γ)(Abbas et al., 2015). Esta fosfolipasa transduce las señales del TCR por la hidrolización de fosfatidilinositol difosfato (PIP2) para producir diacilglicerol (DAG) e IP3, que actúan como segundos mensajeros. DAG recluta a diferentes proteínas río abajo, entre ellas, la proteína cinasa C- (PKC) y RASGEF (factor de intercambio de guanosina de RAS), que es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF)(Navarro & Cantrell, 2019). Ras GEF activa a Ras, una GTPasa pequeña, que es crucial para la activación de la señalización de las cinasas de activación de la cascada de las Cinasas asociadas a Mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés)(Navarro & Cantrell, 2019). Entre los GEF de Ras se encuentra SOS, que es reclutado por LAT, a través de la molécula adaptadora Grb2 (Figura 1). Adicionalmente, otros intercambiadores de Guanosina, como VAV pueden activar a otras GTPasas pequeñas como RAC, que también pueden activar cascadas de MAP cinasas, que llevan a la activación.

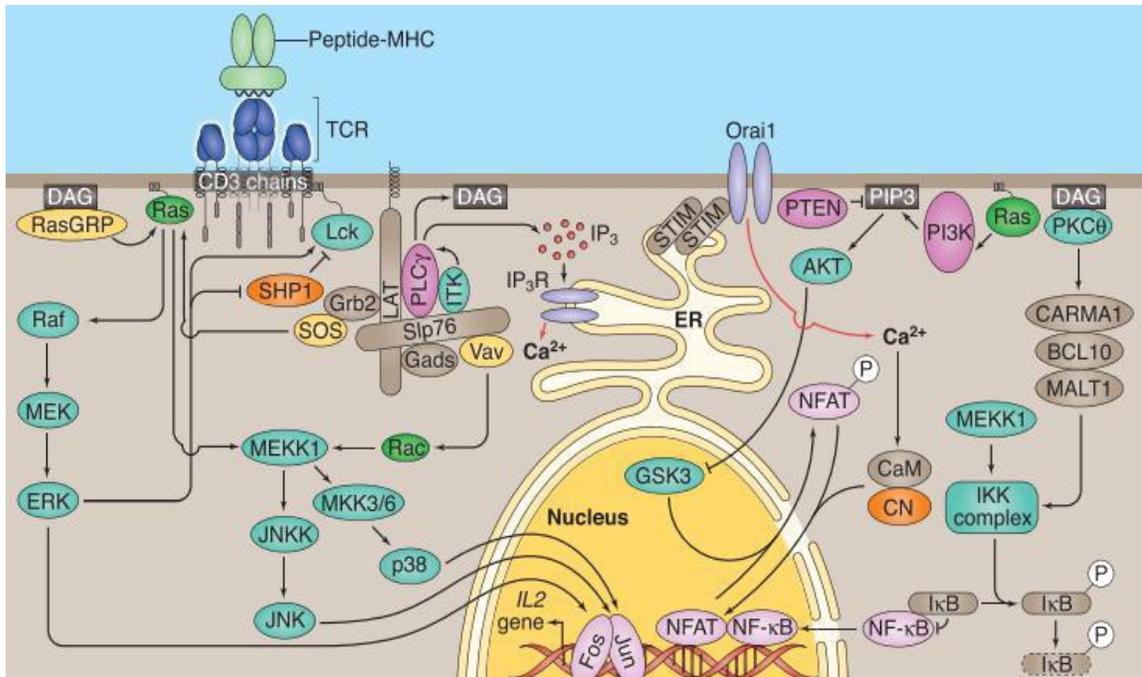


Figura 1. Señalización TCR. (Huse, 2009).

La estimulación del TCR culmina con cambios en la organización del citoesqueleto y la expresión de genes, por la activación de los factores transcripcionales AP1 (heterodímero formado por Fos y Jun), factor nuclear de células T activadas (NFAT) y el factor nuclear B (NF- B) (Abbas et al., 2015). Estos factores actúan en conjunto para activar la transcripción de genes blanco como el gen de la IL-2 (Figura 1).

La activación de Fos y Jun ocurre como un evento río debajo de la señalización de las tres MAPK, Erk, JNK y p38 (Huse, 2009). La actividad de NFAT es regulada por las concentraciones de Ca $^{2+}$ intracelular que son modulados por la producción de IP $_3$. La translocación de NFAT es también regulada por la cinasa fosfatidilinositol 3 (PI3K), que es activada por diferentes efectores de la señalización del TCR, incluyendo Ras. La señalización de PI3K es regulada por la

fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN)(Huse, 2009). El factor 20

transcripcional NF- κ B se encuentra secuestrado en el citoplasma por su inhibidor I κ B en células en reposo. Durante la activación, es fosforilado por la cinasa de I B (IKK), que conduce a la degradación de I B. IKK es activada por MEKK1 miembro de la cascadas de MAPKs (Huse, 2009).

Las señales del TCR inducen cambios en la arquitectura del citoesqueleto. Las células estimuladas por el reconocimiento del antígeno activan la polimerización de actina en la sinapsis inmunológica, generando lamelipodios que recubren la superficie de las APCs. La proteína relacionada a actina (arp2/3) estimula el crecimiento de las ramas de los arreglos de actina y tiene un papel principal en el proceso (Huse, 2009). La polimerización de actina estimulada por el TCR correlaciona con el incremento de las integrinas de adhesión como LFA1, que es directamente afectada por Vav, PLC γ y otros componentes del complejo LAT-Slp76.

La activación de las integrinas promueve una mejor adhesión de la célula T a la APC. Las integrinas activadas inducen señales intracelulares que promueven el remodelamiento del citoesqueleto. También la señalización del TCR induce la polarización del centro de organización de los microtúbulos (MTOC) para los microclústeres y posteriormente la sinapsis inmunológica (Huse, 2009).

IL-12 y su señalización

La IL-12 es una proteína heterodimérica que es producida por células activadas del sistema inmune, principalmente células dendríticas, neutrófilos, macrófagos y monocitos en respuesta a Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) o Daño, (DAMPs, por sus siglas en inglés) (Vacafloresa et al., 2017).

La forma activa de IL-12 (p70) está conformada por una cadena de 35 KDa (p35) y una cadena de 40 KDa (p40) (Curtsinger & Mescher, 2011). En ausencia de IL-12p35, p40 se secreta como un monómero, homodímero, o asociada a p19, para formar la IL-23. Por otra parte, p35 solo puede ser secretada cuando está presente p40. La IL-12 (p70) es una citocina proinflamatoria que es detectada por su receptor heterodímero formado por la subunidad IL-12R β 1 e IL-12R β 2 en los linfocitos T (Curtsinger & Mescher, 2011)(Branch & Biology, 2016). La subunidad β 1 se une a IL-12p40 y la β 2, a IL-12p35(Branch & Biology, 2016).

Cada subunidad de IL-12R tiene distinta actividad biológica. La cola citoplasmática de la IL-12RB1 no contiene 3 aminoácidos en donde se une a la tirosina cinasa (TYK2), perteneciente a la familia Janus Kinasas (JAKs). La falta de estos aminoácidos de tirosina previene la contribución de IL-12R β 1 en el proceso de señalización. El papel principal de la IL-12R β 1 es contribuir al proceso de unión al ligando. Por el contrario, IL-12R β 2 se une a JAK-2, contribuyendo a la transducción de señales a través de los residuos de tirosina, que son reconocidos por el factor transcripcional STAT4 (Branch & Biology, 2016). Las señales activas relacionadas con las JAKs conducen a la fosforilación de las moléculas STAT. Consecuentemente, el proceso de fosforilación de las STAT permite su dimerización y translocación nuclear y posterior la unión al DNA. La IL-12 está asociada con STAT1, STAT3, STAT4, STAT5a y STAT5b (Figura 2) (Branch & Biology, 2016). Aunque el papel de STAT4 es más importante en la señalización de la IL-12 (Pham et al., 2014).

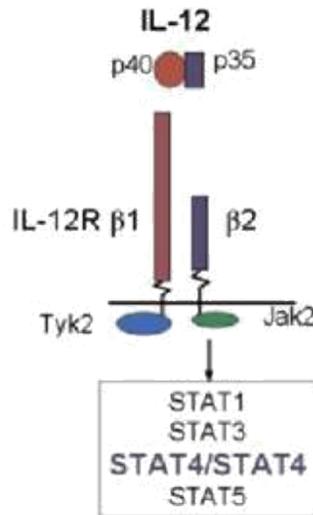


Figura 2. Señalización de IL-12. Modificado de (Touil et al., 2006).

La IL-12, cuando induce la activación del Linfocito T, desata cascadas de señalización que también llevan indirectamente a la activación de factores transcripcionales como NF- κ B y T-bet, que pueden activar diferentes genes blanco, entre ellos los mismos genes que transcriben a las subunidades p35 y p40 (Pham et al., 2014). Esta citocina induce la producción de IFN γ y la diferenciación hacia Th1 de las células T CD4⁺ y a células T CD8⁺ citotóxicas efectoras (Starbeck-Miller et al., 2014). Esta citocina puede utilizarse como una tercera señal para la activación de linfocitos T (Mescher et al., 2007). En las células T CD8⁺ activadas, el receptor de la IL-12 se sobreexpresa inmediatamente para responder más eficientemente a las señales de la IL-12 (Vacaflorosa et al., 2017).

Metabolismo durante la activación de las células T

Las células T vírgenes son quiescentes y tienen un metabolismo muy bajo. Sin embargo, cuando se estimula el TCR, las células rápidamente proliferan y adquieren sus funciones efectoras. Esto requiere una demanda energética y de metabolitos carbonados muy grande, por lo que se 23

requiere una reprogramación metabólica. A continuación describiremos los cambios existentes en las vías metabólicas clave como son la glucólisis, síntesis de ácidos grasos y metabolismo mitocondrial en la activación de las células T (Figura 3).

Las células T vírgenes que no reconocen antígenos, son mantenidas por la IL-7, que induce la proliferación homeostática y sobrevivida. En términos de la actividad metabólica, como le hemos mencionado anteriormente, las células vírgenes mantienen un estado de quiescencia y su metabolismo está basado en lípidos y cadena respiratoria (Maxson & Mitchell, 2016). Sin embargo, cuando las células T se activan, requieren una reprogramación metabólica que soporte su alta proliferación y biosíntesis de membrana, citocinas y otras moléculas. Después de la estimulación mediante el TCR, se incrementa la expresión de genes asociados con glucólisis y glutaminólisis, incluyendo los transportadores extracelulares de nutrientes como son los de glucosa, glutamina y aminoácidos (Almeida et al., 2016). Además, el flujo a través de la glucólisis, vías de las pentosas y vía de las hexosaminas también se incrementa. Se ha observado que durante la activación del TCR y CD28, se induce la activación de las vías de señalización a través de PI3K, que conduce a la sobreexpresión del transportador de glucosa GLUT1 y un mayor captación de glucosa (Franchina et al., 2018). También se ha observado que cinasas pertenecientes a la señalización del TCR como son p38 y ERK, son necesarias para inducir la expresión de la hexoquinasa, la enzima que cataliza el primer paso de la glucólisis (Almeida et al., 2016). Además, los factores transcripcionales Myc y Hif1 α también promueven la reprogramación metabólica hacia glicólisis y el incremento del metabolismo de la glutamina (Franchina et al., 2018), después de la activación de la célula T (Almeida et al., 2016) (Franchina et al., 2018). La señalización por mTORC también favorece la vía de las pentosas fosfato, que es esencial para la síntesis de *novo* de nucleótidos y la replicación del DNA (Franchina et al., 2018). Una función clave de las vías de

las pentosas fosfato es la producción de NADPH, que es esencial para la regeneración de la principal molécula antioxidante glutatión (GSH) (Franchina et al., 2018).

La glucolisis aeróbica conduce a la conversión de glucosa a piruvato y la generación de intermediarios metabólicos que son requeridos para el crecimiento y proliferación (Franchina et al., 2018). Además la glucolisis aeróbica ayuda a mantener el balance redox en la célula a través de la producción de NADH (Franchina et al., 2018).

Durante la señalización temprana del TCR, sus señales promueven la activación por la fosforilación llevada por ZAP70 de la cinasa de la piruvato deshidrogenasa (PDHK1) la cual fosforila a la piruvato deshidrogenasa (PDH) inhibiendo el flujo de piruvato dentro de la mitocondria y facilitando la conversión de ácido láctico y la formación de lactato (Menk et al., 2017). Sin embargo, la formación de lactato durante la señalización tardía del TCR es promovida por Akt y HIF1a (Menk et al., 2017) induciendo así la glucolisis aeróbica.

Después de la división celular, el área de la membrana celular tiende a duplicar su tamaño en comparación con la célula original. Consecuentemente, es necesario tener una cantidad de lípidos suficiente para sostener la proliferación celular, cuando la célula es activada. En seguida de la activación las células T encienden la síntesis de ácidos grasos y la beta-oxidación de ácidos grasos, para la generación de lípidos, que soporten la demanda durante la proliferación y diferenciación de la célula T (Lochner et al., 2015). Los ácidos grasos participan en otros procesos como son la modificación postraduccional de proteínas (Lochner et al., 2015). Dos ejemplos de estas modificaciones son la miristoilación y palmitoilación, ambos son procesos que dependen de la disponibilidad de ácidos grasos. Siendo las modificaciones de proteínas dependientes de lípidos implicadas en la activación de las células T. La palmitoilación de Ras, es clave para su localización

en la membrana y para tener una activación eficiente del TCR. La miristoilación es un proceso que es necesario para los eventos de señalización río abajo del TCR (Lochner et al., 2015).

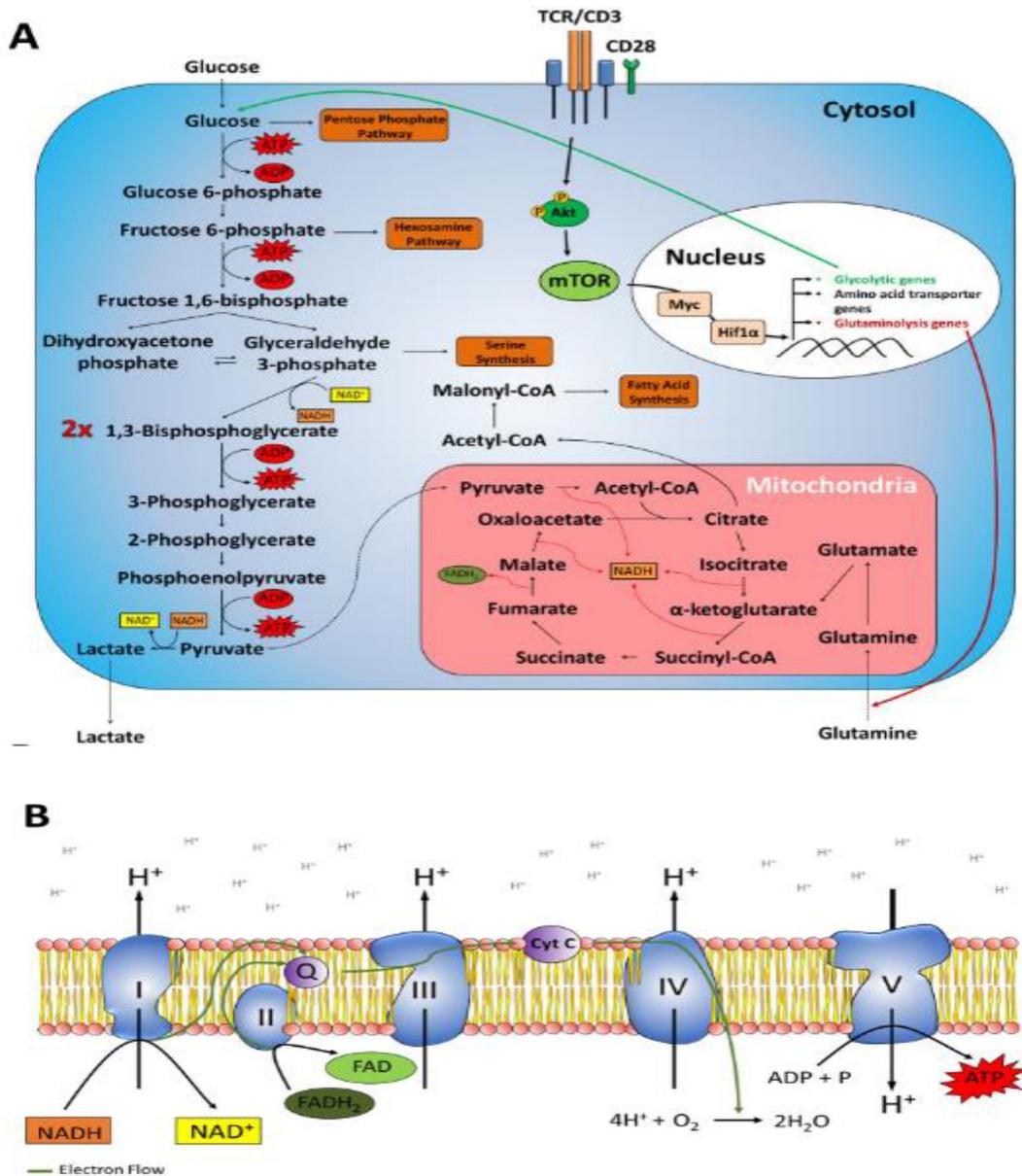


Figura 3. Representación simplificada de las vías metabólicas activadas durante la señalización del TCR. A) La estimulación del TCR induce la expresión de diferentes genes metabólicos, incrementando el importe de glucosa y glutamina del espacio extracelular. La glucosa es degradada en el citosol a piruvato, que puede ser convertido a lactato y regenerado a NAD⁺ que es consumido en la

generación de piruvato. Alternativamente, el piruvato puede ser importado dentro de la mitocondria y descarboxilado a acetil-CoA, alimentando al ciclo de Crebs. Cada ciclo de oxidación genera 4 moléculas de NADH y una de FADH₂. B) El NADH y FADH₂ generados previamente son regenerados para su oxidación formada por la cadena de transporte de electrones, que consiste en una serie de proteínas transmembrana que forman complejos para la generación de energía en la membrana mitocondrial (Almeida et al., 2016).

La inducción de la glucolisis aeróbica inmediatamente de la activación de la célula T implica que una parte del piruvato producido se metaboliza en el ciclo de Crebs y en la fosforilación oxidativa en las células T (Hu et al., 2018). La inhibición de la fosforilación oxidativa en las células T, con un inhibidor de ATP sintasa, elimina completamente la proliferación de las células. El metabolismo mitocondrial por sí mismo puede soportar la activación de las células T y la proliferación. La presencia del piruvato fue suficiente para promover la inducción de los marcadores de activación, expresión de la IL-2 y proliferación por la estimulación de CD3/CD28 en un medio libre de glucosa (Chisolm & Weinmann, 2015). En este mismo estudio también demostraron que las especies reactivas de oxígeno (ROS), derivadas del complejo II mitocondrial como productos de la respiración mitocondrial, son esenciales para la activación de la célula T (Maxson & Mitchell, 2016). Ya que la inhibición de ROS producidos por las células T CD4⁺ reduce la proliferación, crecimiento y captación de glucosa. Así también las ROS son necesarias para sostener la glucolisis aeróbica durante la activación (Previte et al., 2017). También se observó que al reducir el ROS derivado de NADPH oxidasa en células T CD4⁺ activadas reducen la expresión de genes relacionados con la respuesta Th1, la expresión del receptor IL-12 y de diferentes ligandos de quimiocinas proinflamatorias (Lindsey E. Padgett & Tse, 2017).

Otro camino por el cual la mitocondria soporta la activación de la célula T es por la captación del Ca^{2+} citosólico tras la activación del TCR. Después de que la mitocondria se localiza en la sinapsis inmunológica, toma el Ca^{2+} citosólico, y trabaja como buffer local para regular las concentraciones de Ca^{2+} (Almeida et al., 2016)(Uzhachenko et al., 2016). La actividad de buffer es necesaria para regular el flujo de Ca^{2+} y, por lo tanto, la activación consecuente de calcineurina, proteína que promueve la translocación de NFAT al núcleo. El incremento de Ca^{2+} estimula al ciclo de Krebs en la matriz mitocondrial, conduciendo al incremento en las bombas de protones, síntesis de ATP y producción de ROS (Uzhachenko et al., 2016). Cuando la captación de Ca^{2+} mitocondrial es bloqueada, la movilización intracelular de Ca^{2+} tras la estimulación por CD3 se vio afectada (Almeida et al., 2016). También se ha observado la liberación de ATP en la sinapsis inmunológica durante la activación del linfocito T. El ATP se une a receptores purinérgicos extracelulares (P2X) que funcionan como canales de Ca^{2+} , promoviendo el flujo de Ca^{2+} dentro de la célula (Almeida et al., 2016).

No se conoce a fondo el impacto de la oxidación del NADH en la activación de la célula T. Se ha demostrado que la disponibilidad de NAD^+ y la proliferación celular están ligados en células Jurkat y 143B (línea celular de osteosarcoma), que fueron tratadas con inhibidores de la cadena transportadora de electrones, los cuales al regenerar a los sustratos de NAD^+ rescataban la proliferación de las células (Almeida et al., 2016). Esto hace suponer que el ciclo de NADH/ NAD^+ representa un nodo mitocondrial muy relevante en la proliferación de las células T. También se han reportado microdominios de ATP y NAD^+ durante la activación, en los cuales se han observado ectoenzimas que pueden degradar a los receptores purinérgicos y contrarrestar la activación (Fliegert et al., 2019). NAD^+ puede inhibir la liberación de IL-1 por la vía de los receptores P2Y que son dependientes de ATP (Fliegert et al., 2019).

Metilación del DNA

Uno de los mecanismos de la regulación epigenética que influye en la expresión de los genes y es heredado durante la división mitótica, sin causar cambios en la secuencia del DNA, es la metilación del DNA. Fue descubierta en 1948 y es una de las modificaciones químicas más frecuentes en el genoma eucarionte.

La metilación del DNA es catalizada por la familia de DNA metiltransferasas (Dnmts) que transfieren un grupo metilo del S-adenosil metionina (SAM) al quinto carbono de un residuo de citosina, para formar la 5-metilcitosina (5mC).

Las enzimas metiltransferasas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B establecen y mantienen los patrones de DNA en los mamíferos. La DNMT3A y DNMT3B son metiltransferasas *de novo* que tienen como blanco a las citocinas pertenecientes a dinucleótidos CpG no metilados o hemimetilados (Meng et al., 2015). Estas enzimas son esenciales para sus papeles en la metilación *de novo* del genoma durante el desarrollo y para la integración de secuencias retrovirales. DNMT3A es necesaria para el imprinting materno en regiones metiladas diferenciales, y la DNMT3B es requerida para metilaciones en repeticiones pericentroméricas y CGIs en los cromosomas X inactivos (Meng et al., 2015). Los patrones de metilación del DNA establecidos son preservados en células en división por la DNA metiltransferasa 1 (DNMT1), que es conocida por mantener los sitios metilados existentes a través de su preferencia por DNA hemimetilado. Esta DNA metiltransferasa está en altas concentración en células en división (Meng et al., 2015). Otra metiltransferasa que se describió recientemente es la DNA metiltransferasa DNMT3 like (DNMT3L) que es catalíticamente inactiva, se expresa altamente en células germinales y células

madre y actúa como un cofactor obligatorio para las metiltransferasas en las células madre. DNMT3L estimula la actividad de metiltransferasa de DNMT3A o DNMT3B a través de la interacción física (Meng et al., 2015) (Figura 4).

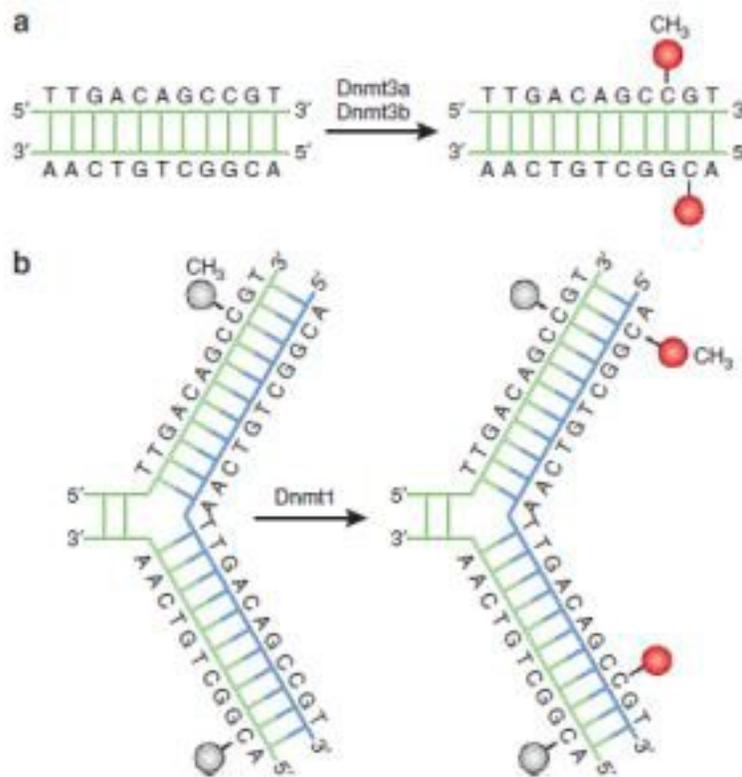


Figura 4. Vías de metilación del DNA. A) Dnmt3a y Dnmt3b son las Dnmts de *novo* y transfieren los grupos metilo (rojo) a la nueva hebra de DNA, B) Dnmt1 es la Dnmt que mantiene el patrón de metilación del DNA durante la replicación (Moore et al., 2012).

La metilación del DNA es esencial por que participa en diferentes procesos, como el silenciamiento de elementos retrovirales y la regulación de la expresión de genes tejido específico, el imprinting genómico y la inactivación del cromosoma X. Además, la metilación

relaciona con la edad en los humanos (Bell et al., 2019) y se ha reportado como una señal del silenciamiento estable de la expresión de genes (Greenberg & Bourc, 2019). Sin embargo, la metilación del DNA puede tener sus excepciones, como esta se ha encontrado río abajo del sitio de inicio de la transcripción (por sus siglas en inglés, TSS) de genes que se están transcribiendo en plantas y algunos animales (To et al., 2015).

La metilación del DNA ocurre principalmente en citosinas, que proceden de las llamadas islas CpG. Estas regiones de 1000 pares de bases son altamente ricas de CpG. Que describiremos a más detalle en la siguiente sección de este capítulo.

El estado de metilación del DNA no solo depende de la adición del grupo metilo sino también de su remoción, es decir de la desmetilación del DNA. Este proceso puede ser activo o pasivo. La desmetilación pasiva ocurre en células en división, la inhibición de la Dnmt1 permite que la citosina adicionada no esté metilada, generando una disminución en la metilación del DNA. La desmetilación activa está presente en células que están o no en división y requiere de reacciones enzimáticas. Esta desmetilación activa, está regulada por diferentes procesos como son, la desaminación a un grupo carbonilo por AID/APOBEC, convirtiendo la 5mC a timina (Moore et al., 2012); otro mecanismo de desmetilación es la formación de 5-hidroximetilcitosina (5hmC) que subsecuentemente es oxidada para formar los productos 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC) (Meng et al., 2015). La versión hidroxilada de 5mC es estable y abundante en los genomas de mamíferos. Por el contrario 5fC y 5caC son extremadamente raras y pueden ser transitoriamente removidas por la glucosilasas de DNA timina (TDG) que son intermediarios de la demetilación del DNA (Meng et al., 2015). Las proteínas TET convierten a 5mC en 5hmC (Figura 6A).

La familia de enzimas TET comprende de 3 desoxigenasas, incluidas TET1 y dos parálogos TET2 y TET3. Estas proteínas son desoxigenasas dependientes de Fe (II)/ α -cetoglutarato, comparten un dominio catalítico de doble cadena con hélices beta (DSBH). Todas las proteínas TET catalizan la conversión de 5mC a 5hmC, 5fC y 5caC (Meng et al., 2015).

5hmC se encuentra predominantemente enriquecida en vecindarios cercanos a sitios de unión de factores transcripcionales, incluyendo elementos reguladores distales y cuerpos de genes de genes altamente expresados y es menos abundante en regiones promotoras (Meng et al., 2015). La sustitución de 5mC a 5hmC inhibe el reclutamiento de proteínas de unión a 5mC como son MeCPs que más adelante describiremos.

Metilación de islas CpG

Como mencionamos anteriormente, la metilación del DNA juega un papel importante en el silenciamiento de los genes. Esta se da particularmente en los promotores rico en dinucleótidos CpG que están concentrados en clústeres largos, llamados Islas CpG (CGIs, del inglés CpG islands). Las islas CpG son secuencias cortas de DNA, en promedio de 1000 pares de bases de largo que muestran una elevada composición de G+C. Tienen una alta frecuencia de dinucleótidos CpG y se encuentran distribuidas desigualmente a lo largo de todo el genoma (Kulis & Esteller, n.d.). Aproximadamente el 70% de los promotores de los genes están asociados con CGI, haciendo éste el tipo de promotor más común en el genoma de los vertebrados. Cerca de la mitad de todas las CGIs se encuentran cercanas a sitios de inicio de la transcripción (TSSs), coincidiendo con los promotores de los genes (Sawan & Herceg, 2010). La mitad restante de las CGIs están distribuidas dentro del gen (intragénicos) o entre genes (intergénicos,). Las CGIs que no se encuentran en el

TSS se denominan CGIs “huérfanas” (Figura 5), porque su función todavía no se conoce (Deaton & Bird, 2011).

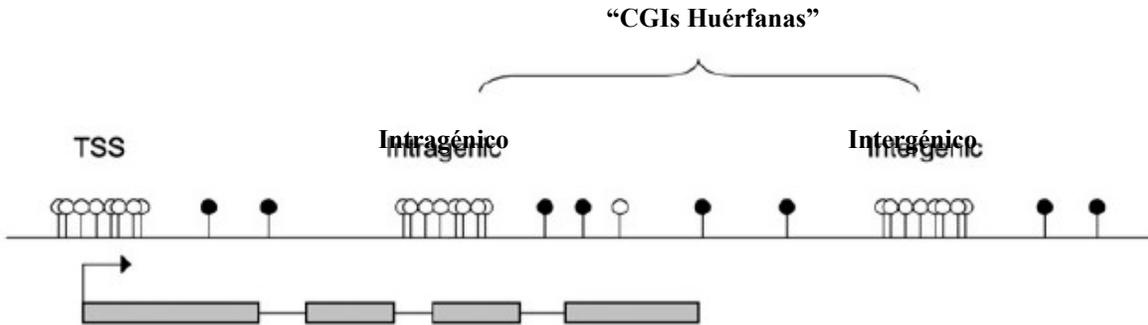


Figura 5. Distribución genómica de CGIs. CGIs localizadas en TSSs, dentro de los genes (intragénicos) o entre los genes (intergénicos). Residuos CpG no metilados (círculos blancos), residuos CpG metilados (círculos negros). (Modificado de Aimée M. Deaton, et al. CpG islands and the regulation of transcription, 2011).

Las CGIs no metiladas en los genomas de los vertebrados suelen tener una deficiencia relativa de nucleosomas, lo que favorece la actividad del promotor. Algunas CGIs pueden contener sitios de unión a factores de transcripción como son Sp1, Nrf-1, E2F, ETS, AP-2, cMyc/myn, CREB, NFkB (Figura 7A)(Pfeifer, 2011). La metilación de las citosinas, puede bloquear la unión de factores de transcripción específicos (Musialik et al., 2014).

Cabe mencionar que existe metilación del DNA en sitios que no son CGIs; se ha encontrado a las 5-metilcitosinas en CpA y en menor cantidad en CpT, que se encuentran exclusivamente en células madre embrionarias. El 75% del total de metilación del DNA identificado en células madre embrionarias se encuentra en un contexto de islas CpG (Yu et al., 2013).

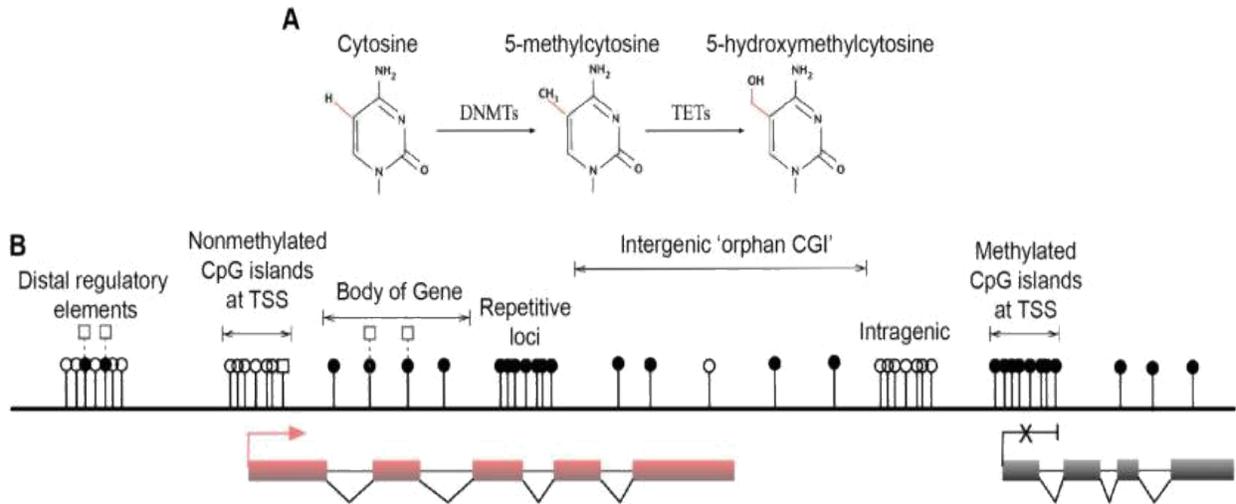


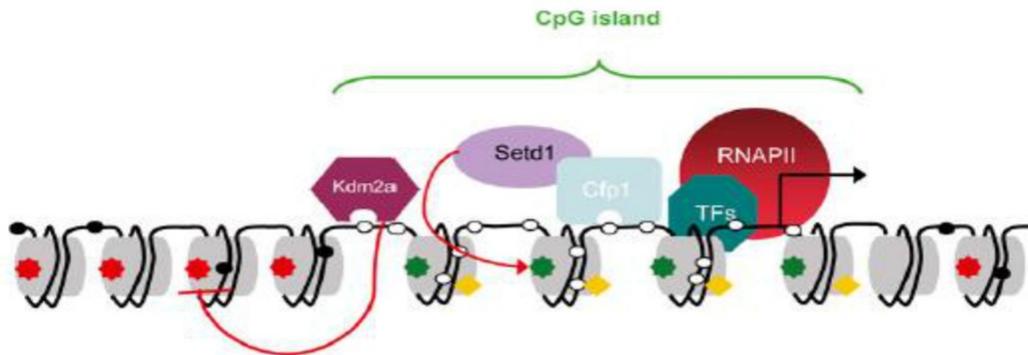
Figura 6. Metilación de citosina. (A) La metilación en el carbono 5 del anillo de pirimidina de la citosina, catalizada por DNMT, en presencia de S-adenosil metionina (SAM), resultado 5-metilcitosina (5mC) es comúnmente encontrada en dinucleótidos CpG en células somáticas. 5-hidroximetilcitosina (5hmC) es formada por la metilación y subsecuentemente hidroxilación que es mediada por las dioxigenasas de translocación de citosina ten-eleven (TETs). (B) Distribución de dinucleótidos CpG en genomas de mamíferos. En los vertebrados los CpG son altamente metilados, mientras que las islas CpG (CGIs) están asociadas con los promotores de los genes. CGIs localizadas en los TSSs, islas huérfanas no se les ha asociado aun alguna función y estas se encuentran en los cuerpos de los genes (intragénicos) y entre los genes (intergénicos). CGIs no metiladas en los extremos 5' de múltiples genes son positivamente correlacionados con la actividad transcripcional (activa, izquierda), mientras un número pequeño de genes son hipermetilados en las CGIs de los promotores en tipos celulares específicos (inactivo, derecha).

Normalmente las CGIs no están metiladas en genes transcripcionalmente activos, mientras que la región promotora de los genes silenciados se caracteriza por estar metilado (Figura. 5B).

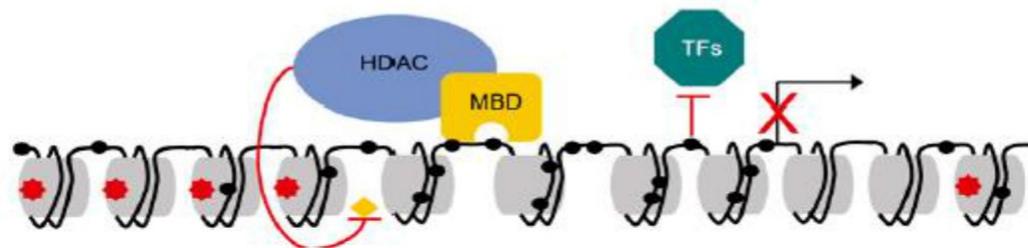
El silenciamiento por las islas CpG puede deberse a la inhibición directa de la unión de los factores de transcripción al DNA o a la ocupación de los sitios consenso por proteínas con dominio de unión a metilación (MBD), que estorban el reclutamiento de los factores transcripcionales. Las CGI metiladas son puntos de anclaje de otras proteínas que modifican la cromatina en el DNA metilado y la condensación de la cromatina (Figura 7B)(Bartke et al., 2010)(Meng et al., 2015). Existen tres principales familias caracterizadas de las proteínas de unión a CpG metiladas (MeCPs), la primera son las proteínas de unión MBD, incluyendo meCP2, MBD1, MBD2 y MBD4, pero no MBD3, que reconocen específicamente a 5-metil-dinucleotidos CpG por su dominio MDB (Meng et al., 2015). La segunda familia son las proteínas KAISO que comprenden a tres proteínas dedos de zinc no relacionadas estructuralmente, las cuales son KAISO/ZBTB33, ZBTB4, y ZBTB38 que se unen al DNA metilado a través de sus motivos de dedo de zinc. La tercera familia incluye a dos proteínas de unión 5meCpG tipo ubiquitina UHRF1 y UHRF2, que reconocen al DNA metilado por sus dominios de asociados a dedos RING (SRA)(Meng et al., 2015).

Las MeCPs pueden actuar como interpretes que reconocen específicamente a marcas de 5meCpG y subsecuentemente reclutan a varios modificadores para establecer un ambiente de cromatina reprimida. Un ejemplo de esa asociación es MeCP2, que se asocia con complejos correpresores como Sin3A y NcoR, por su dominio transrepressor (TRD) e induce una represión transcripcional global fuerte(Meng et al., 2015).

A Transcripcionalmente permisiva



B Represión por Metilación del DNA



C Represión por Polycomb

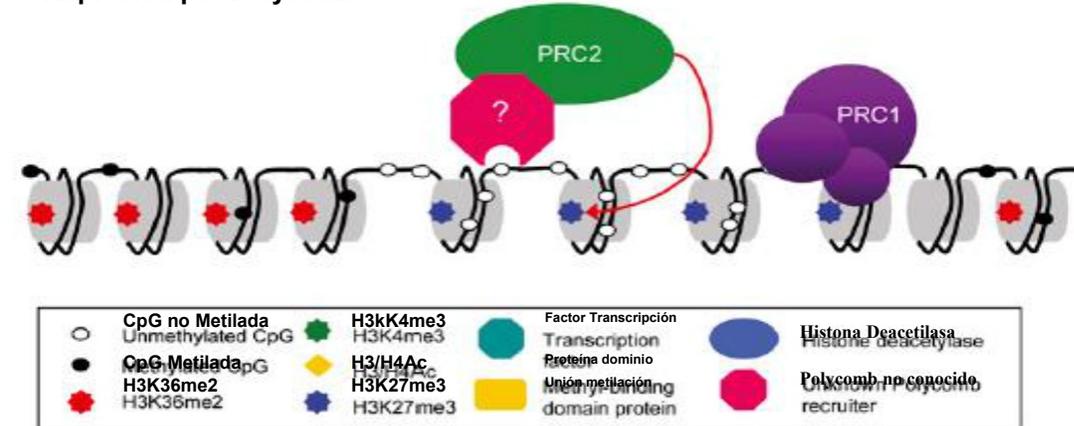


Figura 7. El estado de la cromatina en CGIs. A) Las CGIs existen en un estado transcripcionalmente permisivo no metilado. Son marcados por acetilación de histonas (H3/H4Ac) y trimetilación en H3K4, que es dirigida por Cfp1; B) La metilación del DNA está asociada con un silenciamiento estable de las CGIs de los promotores. Ésta puede ser mediada por proteínas MBD, que reclutan complejos correpresores asociados con la actividad de HDAC; C) CGIs pueden estar también silenciadas por proteínas PcG que son

elementos clave en el reclutamiento de polycomb (Modificado de Deaton M. Aimée. CpG islands and the regulation of transcription. 2011.).

El mecanismo de represión de la expresión de un gen se da por la unión a CGIs no metiladas por grupos de proteínas polycomb (PcG). En mamíferos existen dos complejos PcG: el complejo represivo polycomb 1 (PRC1) y el complejo represivo polycomb 2 (PRC2). PRC2 participa en la colocación de H3K27me3, que son reconocidas por el complejo PRC1 que lleva a la condensación de la cromatina (Figura 27)(Razin & Cedar, 1991).

Antecedentes

Como mencionamos anteriormente, los linfocitos T CD8⁺ neonatales tienen un programa genético y epigenético particular, distinto de los linfocitos T CD8⁺ de adulto. Entre las diferencias más notables, se encontró que los genes implicados en citotoxicidad estaban subexpresados en los linfocitos T CD8⁺ de los neonatos en comparación con los adultos. Esto podría explicar la alta susceptibilidad de los neonatos humanos a las infecciones por patógenos intracelulares. Sorprendentemente, también se encontró que expresaban genes característicos de la inmunidad innata, en particular inflamación tipo neutrófilos, como el factor transcripcional maestro CEBPE y péptidos antimicrobianos (Galindo-Albarrán, 2013).

Los genes asociados a citotoxicidad que se encontraron subexpresados en los linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos con respecto a los adultos se observan en la Figura 8.

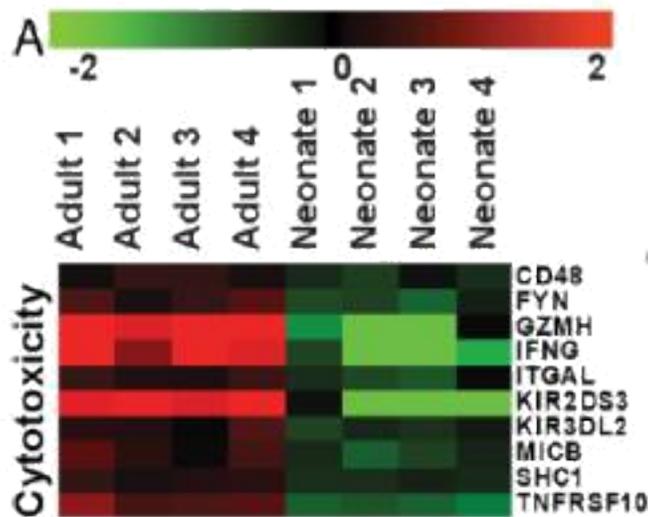


Figura 8. Mapa de calor de genes asociados a citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos.(Galindo-albarr et al., 2015).

Por otra parte, en este mismo estudio se encontraron genes de la respuesta inflamatoria de neutrófilos (Figura 9), los cuales se expresaron más en las células T CD8⁺ vírgenes neonatales en comparación de las de adulto.

La IL-12 se reportó como una tercer señal para la activación de los linfocitos T (Curtsinger & Mescher, 2011). Esta citocina tiene diferentes efectos en las células T CD8⁺, como son el incremento la activación de las MAPKs y AKT inducidas por el TCR en los linfocitos T CD8⁺ humanos (Vacaflores et al., 2017). La presencia de la IL-12 promueve fuertes funciones efectoras y de memoria (Vacaflores et al., 2017). La sensibilidad de las células T CD8⁺ a la IL-12 depende del sexo del individuo, esto se demostró en células T CD8⁺ de ratón al adicionarles IL-12, las células T CD8⁺ de hembras se diferencian a células efectoras de corta vida y los machos se diferencian a precursores de memoria (Joy et al., 2019).

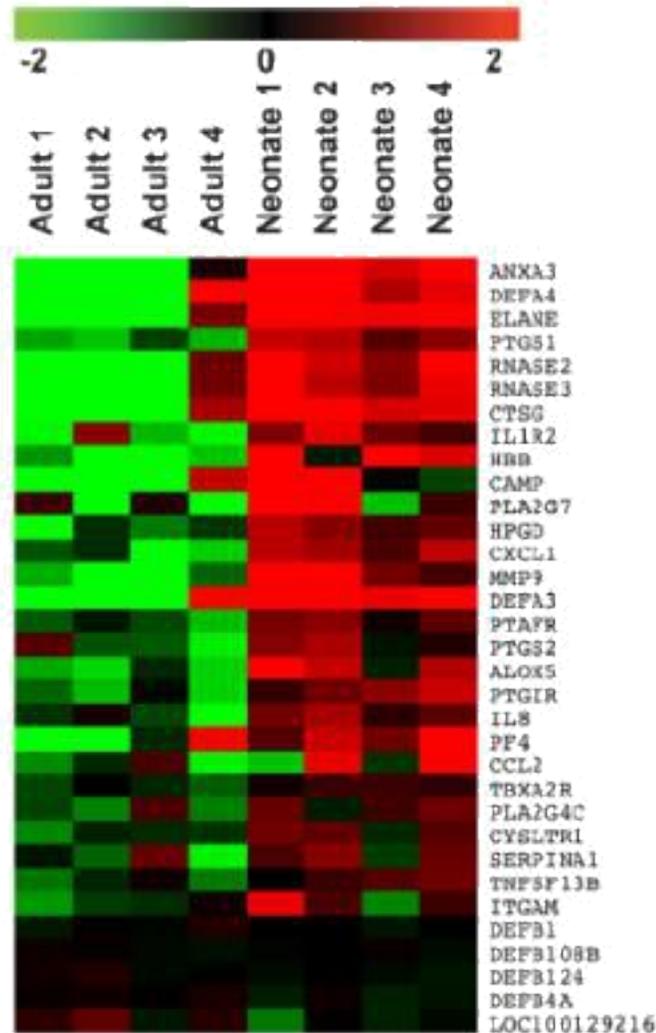


Figura 9. Mapa de calor de genes asociados a actividad antimicrobiana en linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos. (Galindo-albarr et al., 2015).

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el transcriptoma por RNA-seq y regiones de apertura de la cromatina por ATAC-seq de las células T humanas entre hombres y mujeres (Gal-Oz et al., 2019). También se ha observado que la estimulación con la IL-12 mejora significativamente la expansión de las células T CD8⁺ dentro de los 3 días posteriores a la activación in vitro, mientras que los tratamientos con otras citocinas como IL-1, IL-6, TNF e

IFN no tuvieron impacto significativo en la expansión clonal (Starbeck-miller & Harty, 2015). La falta de la expresión del receptor de la IL-12B2 reduce significativamente la expansión de las células T CD8⁺ P14 en respuesta a la infección por *Listeria M* (Starbeck-miller & Harty, 2015). También la estimulación directa de la IL-12 e IFN tipo I promueven el mantenimiento de la expresión CD25, extendiendo la división en las células T CD8⁺ activadas (Starbeck-miller & Harty, 2015). Además, la estimulación con la IL-12 favorece el incremento del tamaño de los exosomas en los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos directamente activan a las células T CD8⁺ bystander o espectadoras (Li et al., 2017).

Sin embargo, la producción de IL-12 es baja en las células dendríticas neonatales (Vanden Eijnden et al., 2006) e incrementa durante la niñez, acercándose a los niveles del adulto a la edad de 12 años (Upham et al., 2002). Se ha demostrado que la IL-12 es necesaria como una tercera señal que autoriza la diferenciación de las células T CD8⁺ neonatales (McCarron & Reen, 2010).

También se ha reportado en células neonatales que los promotores de los genes de IL-12 e IFN están silenciados debido a la hipermetilación (Melvin et al., 1995)(C.-J. Chen et al., 2014). La IL-12 está compuesta por las subunidades p35 y p40. En las células dendríticas neonatales se produce la citocina relacionada IL-23 compuesta por las subunidades p40 y p19 y las células T neonatales producen el receptor de IL-23 debido a la estimulación (Vanden Eijnden et al., 2006). La citocina IL-23 es un componente importante para el perfil Th17. Aunque la adición de la IL-12 a las condiciones estimuladoras se ha demostrado que contribuye en la maduración funcional de los linfocitos T citotóxicos, los mecanismos moleculares que aún no se han descrito.

Planteamiento del problema

El perfil de expresión particular de las células neonatales hace pensar en dos posibilidades: *i*) que representan un tipo celular único y característico del periodo neonatal, que pudiera substituirse paulatinamente por nuevos emigrantes del timo con las características propias de una célula T CD8⁺ de adulto o *ii*) que estas células pueden madurar en la periferia cuando son activadas por las señales adecuadas.

Previamente mencionamos que la IL-12, junto con la estimulación del TCR/CD28, mejora la expansión clonal de células T CD8⁺ neonatales de humano, y permite su diferenciación en células T efectoras, que solo fueron citotóxicas en la estimulación en presencia de la IL-12 (McCarron & Reen, 2010). En las células neonatales, en lugar de producirse IL-12 (p40, p35), se produce IL-23 (p40 y p19), esto debido a la baja transcripción del gen de la subunidad p35, que se encuentra inhibida por diferentes modificaciones epigenéticas (C.-J. Chen et al., 2014). Es posible activar la producción de IL-12, pero se requiere de un fuerte estímulo para lograrlo. Se ha observado que esta barrera se puede romper por infecciones con micobacterias (Starbeck-miller & Harty, 2015). Si la IL-12 fuese la señal que falta a los linfocitos neonatales para poder ser células citotóxicas, pudiera considerarse su uso o el uso de moléculas de señalización río abajo en formulaciones de vacunas y tratamientos en infecciones graves.

En este trabajo nos propusimos evaluar si las señales de la IL-12 permiten el cambio en las células T CD8⁺ neonatales a un fenotipo transcripcional tipo adulto. Asimismo, nos preguntamos si también hay cambios en el programa transcripcional característico de los linfocitos neonatales, es decir, en la transcripción de genes característicos de la respuesta inmune innata de neutrófilos. Finalmente, investigamos si la maduración por la IL-12 se debía a cambios en la programación transcripcional, en particular por la metilación del DNA.

Hipótesis

Las señales de IL-12, en conjunto con la activación a través del TCR, permitirán la maduración de los linfocitos T CD8⁺ neonatales, que se reflejará en una disminución en la metilación del DNA y el aumento en la expresión de los genes asociados a citotoxicidad y la disminución en la expresión de los genes con actividad antimicrobiana.

Objetivos del Capitulo

Objetivo General

Evaluar el transcriptoma en células T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos tras la estimulación a través del TCR, en presencia o ausencia de IL-12, y el estado de metilación del DNA de genes relacionados con citotoxicidad y responsables de la actividad antimicrobiana.

Objetivos Particulares

1. Evaluar los genes con expresión diferencial y las vías de enriquecimiento que participan estos genes en condiciones basales y en respuesta a la estimulación por el TCR (CD3/CD28) y TCR/IL-12 en los en células T CD8⁺ neonatales y de adulto.
2. Validar los resultados del transcriptoma por medio de RT-qPCR
3. Evaluar cambios de la metilación en los promotores de algunos genes diferenciales por las señales del TCR o TCR/IL-12 en células T CD8⁺ de neonatos y adultos.

Metodología

Metodología Experimental:

Cultivo y estimulación de las células

Las células fueron cultivadas con RPMI 1640 medium (Thermo Fischer Scientific; Massachusetts, USA), suplementado con 2mM glutamina, antibióticos (50 U/mL penicillin, 50 ug/mL streptomycin) y 5% suero fetal bovino (Anexo 1). Las células fueron activadas con 1 g/ml de anti-CD3 (OKT3, TONBO biosciences; California, USA), 1 g/ml de anti-CD28 (CD28.2, TONBO biosciences; California, USA), simultáneamente fue adicionada la IL-12 (10 ng/mL) (IL-12; RPX-ProTM Recombinant, TONBO biosciences; California, USA), fueron entrecruzados con IgG entrecruzado con 1µg/ml de (Jackson ImmunoResearch). Se incubaron las células por 36 horas en un ambiente con 5% de CO₂ a 37°C.

Preparación del RNA y RT-qPCR

El RNA total fue extraído usando el reactivo TRIZOL® Reagent, siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA) (Anexo 2). La calidad del RNA para secuenciación fue evaluado en el Bioanalyzer nano-RNA (Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA) y se usaron muestras con un valor de la integridad del RNA mayor a 8. Para los ensayos de validación por RT-qPCR, se evaluó la calidad del RNA con geles de agarosa al 1%. La síntesis del cDNA se hizo con el kit de síntesis de la Transcriptasa Reversa RevertAid (EP0441, Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA) (Anexo 3).

Los primers fueron diseñados usando la secuencia de referencia del mRNA de NCBI con el programa Primer-Blast (NCBI), considerando la unión de exón-exón (Anexo 4). El qPCR en tiempo real fue realizado en el termociclador StepOne (Thermo Fischer Scientific; Massachusetts, USA) usando Power SYBR Green PCR Master Mix (K0221, Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA). Se utilizó la 2-microglobulina como gen de referencia, para normalizar la expresión del mRNA. La expresión relativa fue obtenida con el programa StepOne V2.3 y la expresión del gen fue calculada utilizando el método de la curva estándar para cada gen.

Las librerías del RNA-seq fueron construidas usando el Kit TruSeq RNA Library PRep Kit v2 (Illumina; California, USA). Las librerías fueron paired-end y secuenciadas en un secuenciador Illumina NExtSeq 500 sequencer.

Extracción de DNA e Inmunoprecipitación de DNA metilado (MeDIP)

Se realizó la extracción de DNA mediante la utilización de proteinasa K, la cual degrada proteínas en su estado nativo en presencia de detergentes para lisar la membrana celular. Para precipitar el DNA se utilizó acetato de sodio e isopropanol. Al final se dio un lavado al DNA con Etanol 70% (Anexo 5) y se resuspendió con Tris HCl para después purificarlo por columnas de la marca Gene-ALL según instrucciones de fabricantes. Cuantificación de DNA por Qubit.

La inmunoprecipitación de DNA metilado se realizó usando un anticuerpo monoclonal específico para 5-metilcitosina (anti-5-mC). En breve, se fragmentó el gDNA (Anexo 6) y se dividió en dos fracciones: una fracción que se utilizó como referencia del genoma (“input”, el cual se trató igual que la otra fracción a excepción de que no se incubó con el anticuerpo) y la otra fracción a la cual se realizó el proceso de inmunoprecipitación (IP) (Anexo 7). El gDNA para la

IP se desnaturalizó e incubó con un anticuerpo primario anti-5-mC, seguido de la incubación con perlas magnéticas que reconocen al complejo DNA-anticuerpo, después se disoció el complejo DNA-anticuerpo con la incubación en presencia de proteinasa k, que degrada al anticuerpo unido al DNA metilado.

Para finalizar, se purificó el DNA con columnas de DNA (Pälmke et al., 2011). Los controles que se utilizaron para la metilación del DNA fueron: como control negativo se utilizó la isla CpG del promotor de actina, que fue seleccionado debido a que este gen se encuentra activo constitutivamente (Pälmke et al., 2011) y como control positivo, se utilizó la región del promotor del gen del factor temprano de células B (EBF1), que en linfocitos T no se expresa y se encuentra metilado.

Análisis de Estadístico

La significancia estadística fue evaluada por la prueba estadística t-test Student datos no pareados con dos colas; las diferencias fueron consideradas significativas con p-value <0.05 para los datos de qPCR y MeDIP-qPCR.

Metodología Bioinformática:

Procesamiento de los datos de RNA-seq, Expresión diferencial y Clusterización.

Después de la secuenciación, los datos crudos fueron obtenidos en el formato fastq. La calidad de los datos fue evaluada con el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Las secuencias de baja calidad y adaptadores fueron eliminados usando el programa Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Se revisó

nuevamente la calidad usando el programa FastQC en los datos con las secuencias de mala calidad cortadas. Después las reads fueron alineadas con respecto al genoma humano GRCh38/hg38 para generar los archivos de alineamiento binario (BAM) con el programa STAR (v2.4.2a)(Dobin et al., 2013). El descubrimiento de los transcritos se realizó usando Cufflinks (v2.2.1) con el argumento “tipo de librería” en la primera cadena y el archivo GTF obtenido de GENCODE (“Comprehensive gene annotation”, vM1), que contenía la anotación genómica. Los archivos GTF fueron producidos por Cufflinks y combinarlos usando Cuffmerge. Solo los transcritos nuevos con conteos mayores a 0 fueron utilizados para los análisis siguientes. Los transcritos nuevos fueron combinados con el archivo GTF GENCODE para producir la anotación genómica final con FeatureCounts (v1.4.6-p4)(Saadi et al., 2019) para la cuantificación.

El paquete de R, DESeq2 (v1.6.3) (Love et al., 2014) fue utilizado para obtener los genes diferencialmente expresados y la normalización de los datos de conteos. Las diferencias fueron evaluadas estadísticamente y según se muestra en las figuras, se consideró el p value ajustado o un \log_2 fold change > 2 para la significancia estadística. Los genes diferencialmente expresados en condiciones basales fueron sujetos a la clusterización de K-means, usando el método de distancia Euclidiana. La expresión de genes para cada condición dentro del mismo clúster respondió similarmente a la estimulación. El número de K-means fue de 12, porque este número representaba los diferentes perfiles de expresión a nivel basal y en respuesta a la estimulación. Los datos procesados y crudos fueron depositados en el Gene Expression Omnibus (GEO; GSE144108). La expresión de los genes fue visualizada usando el programa IGV genome browser.

Los genes expresados diferencialmente para cada condición fueron cargados en el programa web WEB-based Gene Set Analysis Toolkit (WebGestalt) (Jing Wang et al., 2017), para identificar las vías enriquecidas. Se obtuvo el top 20 de las vías del Reactoma que tenían p-value

ajustado < 0.05 . Las vías de Reactoma, las vías Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) y los procesos biológicos Gene Ontology terms (GO) fueron obtenidos de la base de datos del software Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (Huang et al., 2009).

Búsqueda de Promotor y de Islas CpG

Se diseñaron cebadores para corroborar la transcripción de los genes por RT-PCR y los cebadores para amplificar las islas CpG de la región promotora de cada gen. Para los cebadores que amplifican islas CpG se realizó la búsqueda de las secuencias promotoras mediante la base de datos de promotores eucariontes EPD (Eukaryotic Promoter Database <http://epd.vital-it.ch/>) y si las secuencias promotoras no estaban reportadas, se predijo la secuencia promotora en diferentes programas de búsqueda de promotores como son NNPP2.2 (neural network promoter prediction version 2.2, http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html), FirstEF (firstexonfinder, <http://rulai.cshl.org/tools/FirstEF/>), McPromoter (McPromoter MM:II, <http://tools.igsp.duke.edu/generegulation/McPromoter/>), Promoter2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>).

Antes de realizar la predicción de secuencias promotoras se realizó la búsqueda del sitio de inicio de la transcripción en la base de datos DBTSS (DataBase of Transcriptional Start Site, <http://dbtss.hgc.jp/>), se descargó la secuencia de cada gen 1000 pb río arriba y 200 pb río abajo del sitio de inicio de la transcripción y a continuación se predijo la secuencia promotora con los diferentes programas de búsqueda de promotores eucariontes anteriormente mencionados.

Una vez obtenida la secuencia promotora, se metieron las secuencias ubicadas 1000 pb o 2000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción y la secuencia completa de cada gen en Methyl Primer Express v1.0 (<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=602121&tab=DetailInfo>), Newcpgreport (<http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/pise/newcpgreport.html>), CpGPlot (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpplot/) y MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>) para la localización de las islas CpG.

Se seleccionaron las islas CpG bajo los siguientes criterios: la longitud de las islas CpG entre 100-2000 pb, con un contenido de GC mayor a 0.5 y una presencia observada y esperada mayores de 0.6 de CpG. Una definición aceptada de isla CpG es una región de DNA mayor de 100 pb, con un contenido de GC mayor a 0.5 y una presencia observada y esperada mayor de 0.6 de CpG (Gal-Oz et al., 2019).

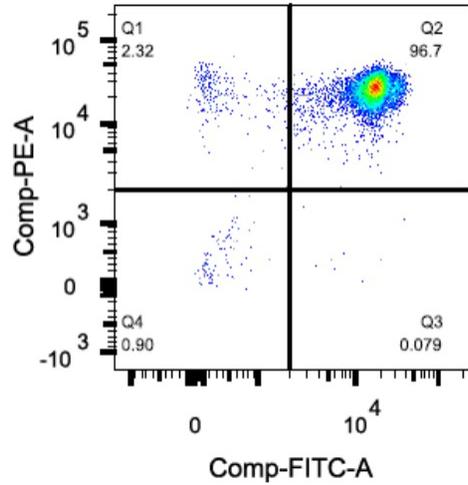
Resultados

Purificación de linfocitos T CD8⁺

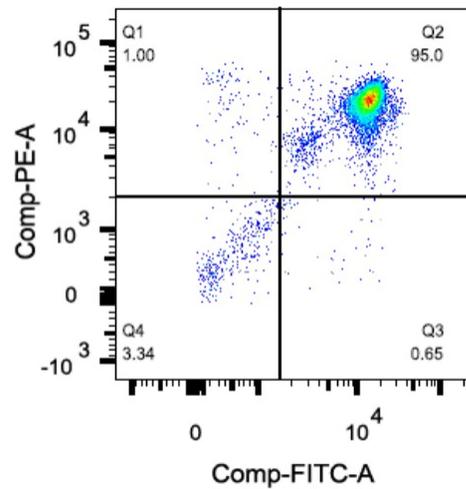
En este segundo capítulo también purificamos linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos, para poder utilizarlos en los estudios de RNA-seq y MeDIP-qPCR se obtuvieron purezas arriba del 95% (Figura 10A).

A)

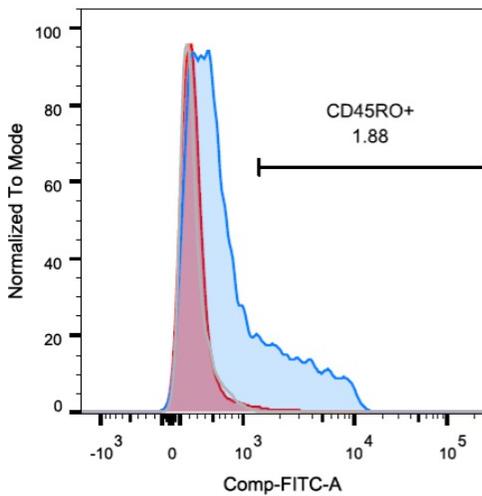
Células T CD8⁺ vírgenes de Adulto



Células T CD8⁺ vírgenes de Neonato



B)



	Sample Name
□	PBMCs Sin Teñir
■	Células T CD8 ⁺ Totales
■	Células T CD8 ⁺ Vírgenes

Figura 10. Pureza de Linfocitos T CD8⁺ vírgenes de adultos y neonatos utilizados en el RNA-seq

y MedIP-qPCR. A) Dot-plots representativos de la pureza de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de adultos (Izquierda) y neonatos (Derecha), en el eje horizontal se muestra a CD8-FITC y en el eje vertical a CD3-PE,

B) Histograma de CD45RO-FITC de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de adulto (rojo) y de los linfocitos T

CD8⁺ antes de eliminar las células de memoria (Células T CD8⁺ Totales, azul) del mismo adulto. Se tiñeron 1x10⁶ células y se adquirieron en un citómetro FACs Canto II. Los datos de citometría fueron analizados en el software FlowJo versión X.

Se eliminaron las células de memoria en las células de adulto y se midió la expresión del marcador de memoria CD45RO de adultos, encontrando una expresión de este marcador por debajo del 4% en las células de adulto, con un nivel medio de fluorescencia bajo (Figura 10B). Por lo que se decidió utilizar estas células para los experimentos de RNA-seq y MeDIP-qPCR.

Las señales de la IL-12 contribuyen a la reprogramación transcripcional de las células T CD8⁺ neonatales.

Para investigar el papel de la IL-12 en la activación de las células T CD8⁺, se realizó el análisis del RNA-seq de células T CD8⁺ vírgenes no tratadas o activadas por el entrecruzamiento de las moléculas de CD3 y CD28 (TCR), solo o en la presencia de la IL-12 (TCR/IL-12) por 36 hr. La comparación de un triplicado de muestras de células vírgenes neonatales y de adulto, exhibieron 967 y 913 genes significativamente sobreexpresados en células neonatales y de adulto, respectivamente (adjusted p-value \leq 0.05) (Figura 11A). En un reporte previo de laboratorio, mostramos que las células neonatales tuvieron una alta proliferación homeostática y estuvieron sesgadas hacia la inflamación tipo neutrófilo. Asimismo, encontramos nuevamente que las vías de señalización enriquecidas en las células neonatales estaban sesgadas hacia ciclo celular e inmunidad innata en nuestros datos de RNA-seq (Figura 12), validando los resultados previamente obtenidos por microarreglos (Galindo-albarr et al., 2015). Después de la estimulación a través del TCR, 3022 y 2707 genes incrementaron su expresión (adjusted p-value < 0.05) en células

neonatales y de adulto, respectivamente. Como esperábamos, los genes estimulados a través del TCR en células de adultos estuvieron asociadas con la respuesta inmune, mientras que los de las células neonatales estuvieron sesgados hacia ciclo celular y encontramos un menor enriquecimiento en genes de la señalización a través de IL-10 (Figura 11B), de acuerdo con el fenotipo de tolerancia de las células neonatales.

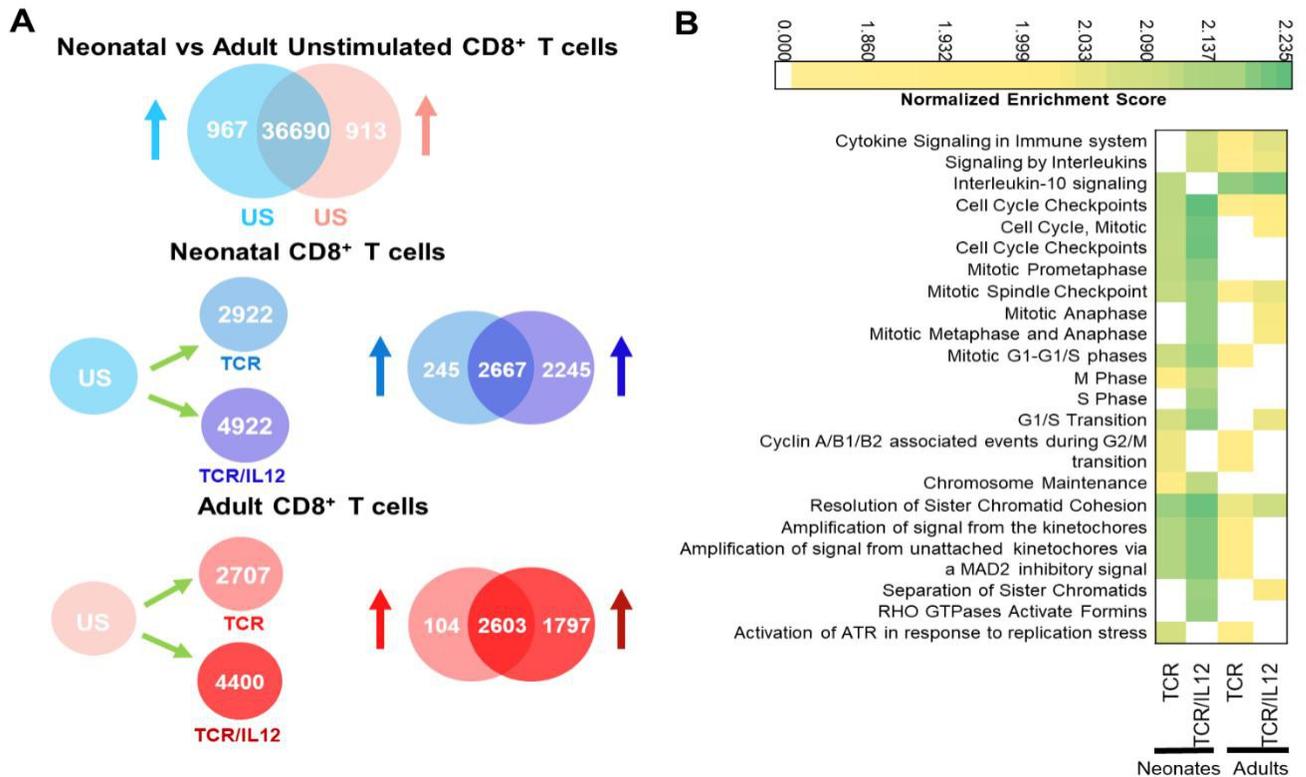


Figura 11. TCR o TCR/IL-12 induce la respuesta en células T CD8⁺ neonatales y de adulto. A) Número de genes expresados diferencialmente (adjusted p-value < 0.05) entre no estimulados y TCR o TCR/IL-12 de células T CD8⁺ neonatales y de adulto. US= células no estimuladas B) Top 20 de vías del REACTOME enriquecidas significativamente (adjusted p-value <0.05) en células T CD8⁺ neonatales y de adultos estimuladas a través de las señales del TCR o TCR/IL-12.

Notablemente, en ambas poblaciones, la estimulación del TCR/IL-12 indujo la expresión significativa del doble de la cantidad de genes, comparados con la estimulación a través del TCR (4922 y 4400 genes en células neonatales y de adulto respectivamente) (Figura 11A). Además, las vías inducidas en las células neonatales por TCR/IL-12 incluyeron vías de señalización de citocinas. Esto es indicativo de la maduración y activación de las células neonatales por la adición de las señales de la IL-12. Así, la coestimulación de la IL-12 tuvo un fuerte efecto sinérgico sobre las señales del TCR en las células CD8⁺, sugiriendo una contribución de las señales de la IL-12 hacia la maduración de las células neonatales y para la completa activación en ambos tipos de células.

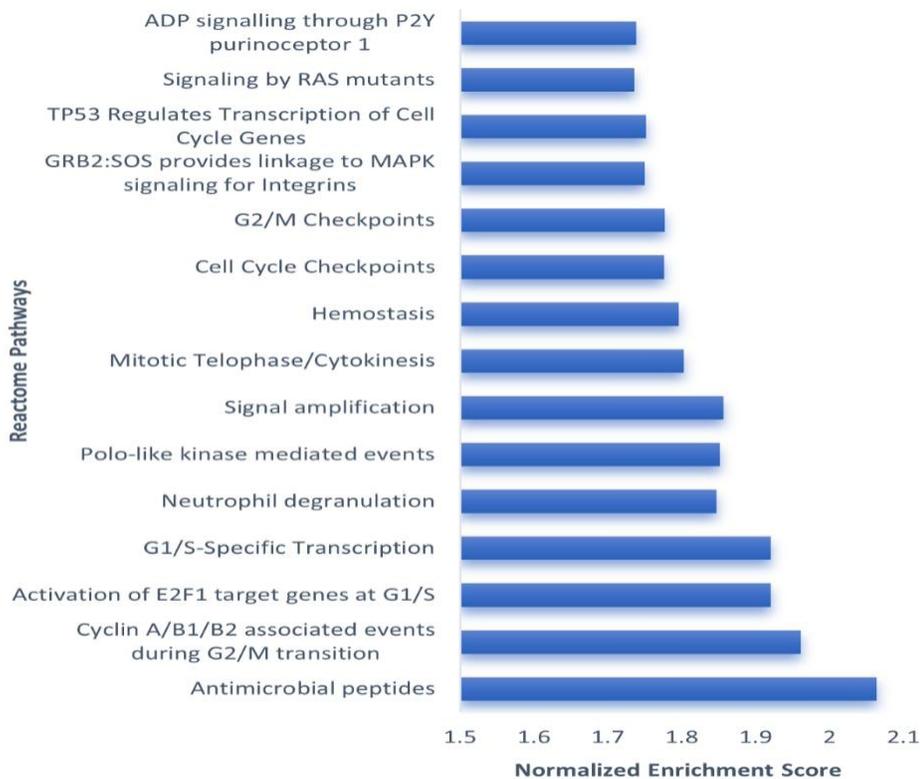


Figura 12. Vías enriquecidas en células T CD8⁺ neonatales sin estimulación. Las gráficas muestran el top 20 de las vías de REACTOMA más enriquecidas (adjusted p-value ≤ 0.05) en células T CD8⁺ neonatales comparadas con los adultos, identificados por GSEA de WEB-based Gene Set Analysis Toolkit (WebGestalt).

Después, para identificar los principales patrones de cambio de los genes después de la estimulación a través del TCR o del TCR/IL-12, realizamos un análisis de k-means, para clasificar el patrón de respuesta de los genes diferencialmente expresados (adjusted p-value < 0.05 y log2 fold change > 2; Figura 13) entre células T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos dentro de 12 clústeres (Figura 13B).

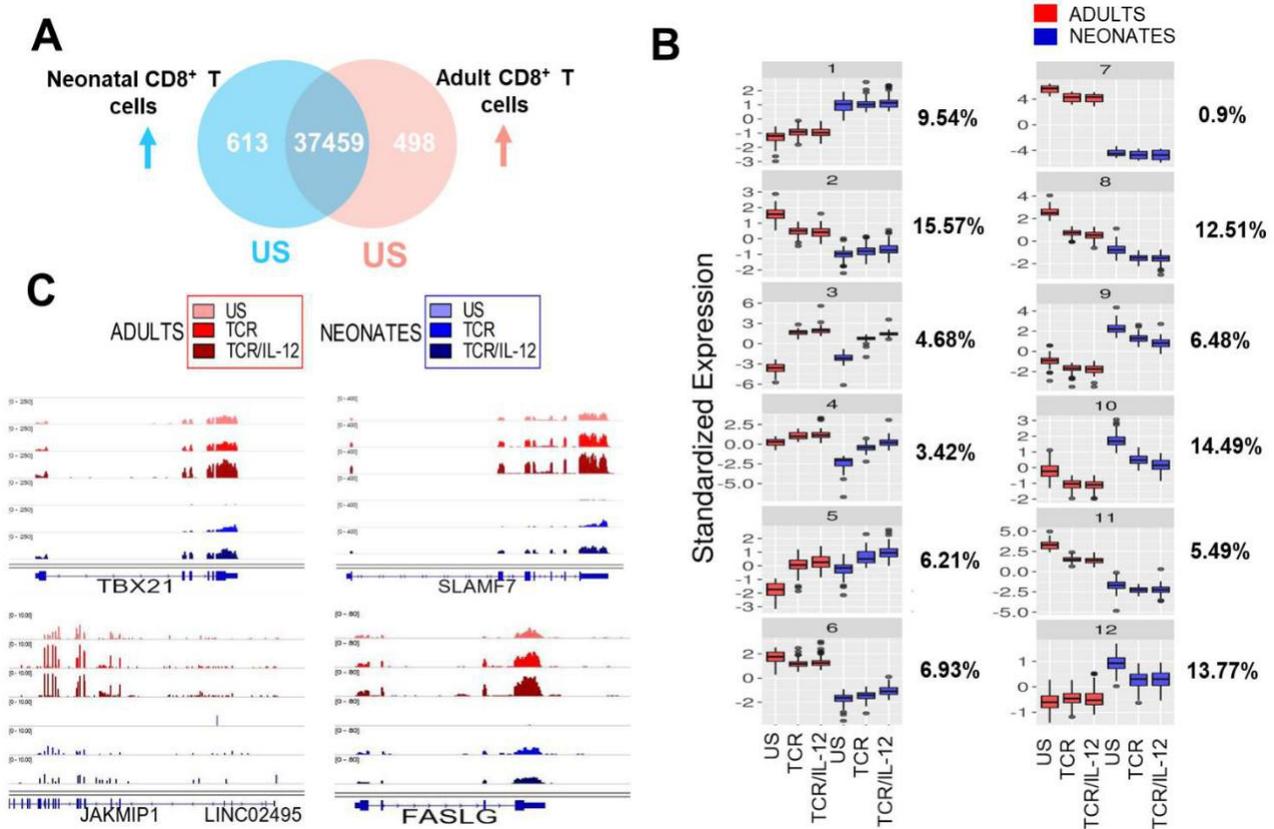


Figura 13. Niveles basales y patrones de respuesta de los genes diferencialmente expresados

entre células T CD8⁺ neonatales y de adulto. A) Diagrama de Venn de genes diferencialmente expresados entre células T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos (adjusted p-value < 0.05 y log2 fold change > 2). B) Clusterización de K-means de los patrones de expresión de los genes, basados en sus niveles basales y en respuesta al tratamiento de TCR o TCR/IL-12 en células T CD8⁺ neonatales y de adulto. El porcentaje

de los genes pertenecen a cada clúster mostrado a la izquierda. C) Vistas de los datos de RNA-seq con el Genome Browser, se muestran cuatro genes (*TBX21*, *SLAMF7*, *JAKMIP1* y *FASLG*) del Clúster 4 que alcanzaron los niveles de expresión de los adultos en células de neonatos estimuladas.

Los Clústeres 1 y 7 corresponden a genes que se mantuvieron sin cambio (10.44%) (Figura 13B). Los clústeres 2 al 6 representan genes que fueron inducidos en las células neonatales por las señales del TCR, pero que su expresión incremento con la adición de la IL-12 (55%). Los clústeres del 8 al 12 representan genes que bajaron su expresión por la estimulación en las células neonatales (44%). Observamos que la coestimulación de la IL-12 condujeron a una mayor similitud con los adultos. Por otro lado, el clúster 3 representa un grupo de genes que con la coestimulación de la IL-12 alcanzo los niveles de las células de adulto estimuladas. Este clúster incluye a los genes relacionados a la función citotóxica y que serán discutidos más adelante.

El clúster 4 representa un grupo de genes subexpresados en las células neonatales, que llegaron a los niveles basales del adulto por la estimulación a través del TCR/IL-12. Estos incluyen genes funcionalmente importantes como son *TBX21* (T-bet), *SLAMF7*, *FASL* y *JAKMIP1* (Figura 13C). Por otro lado, genes de los clústeres 9 y 10 disminuyen su expresión a los niveles del adulto y corresponden a los genes relacionados a inmadurez.

El Clúster 5, representando el 6.21% de los genes y enriquecidos en genes inflamatorios, muestran una respuesta exacerbada a la estimulación en células neonatales. Por lo tanto, está claro que la coestimulación de la IL-12 no solo indujo sino también reprimió la expresión de genes, sugiriendo la reprogramación transcripcional de las células.

Las señales de la IL-12 inducen la expresión genes de señalización y de citotoxicidad.

Para una mejor comprensión del papel específico de las señales de la IL-12 en las células neonatales, identificamos a los genes que fueron significativamente inducidos por la estimulación a través de las señales del TCR/IL-12 en comparación con solo la estimulación por las señales del TCR (Figura 14A). Encontramos que sólo veinte genes fueron significativamente inducidos por la adición de la IL-12. Sin embargo, estos genes inducidos fueron asociados con cuatro vías KEGG relacionados a inflamación, función de citocinas y señalización (Figura 14D). Además, las señales de la IL-12 incrementaron la expresión de los genes clave asociados con citotoxicidad, *GZMB* y *GZMH*; inflamación, *IL21*; control de inflamación excesiva, *IL10*; genes relacionados a activación *SOCS3* y *LAG3 IFNG* y sensibilidad a las señales de la IL-12, *IL12RB*; para la activación de las células T CD8⁺.

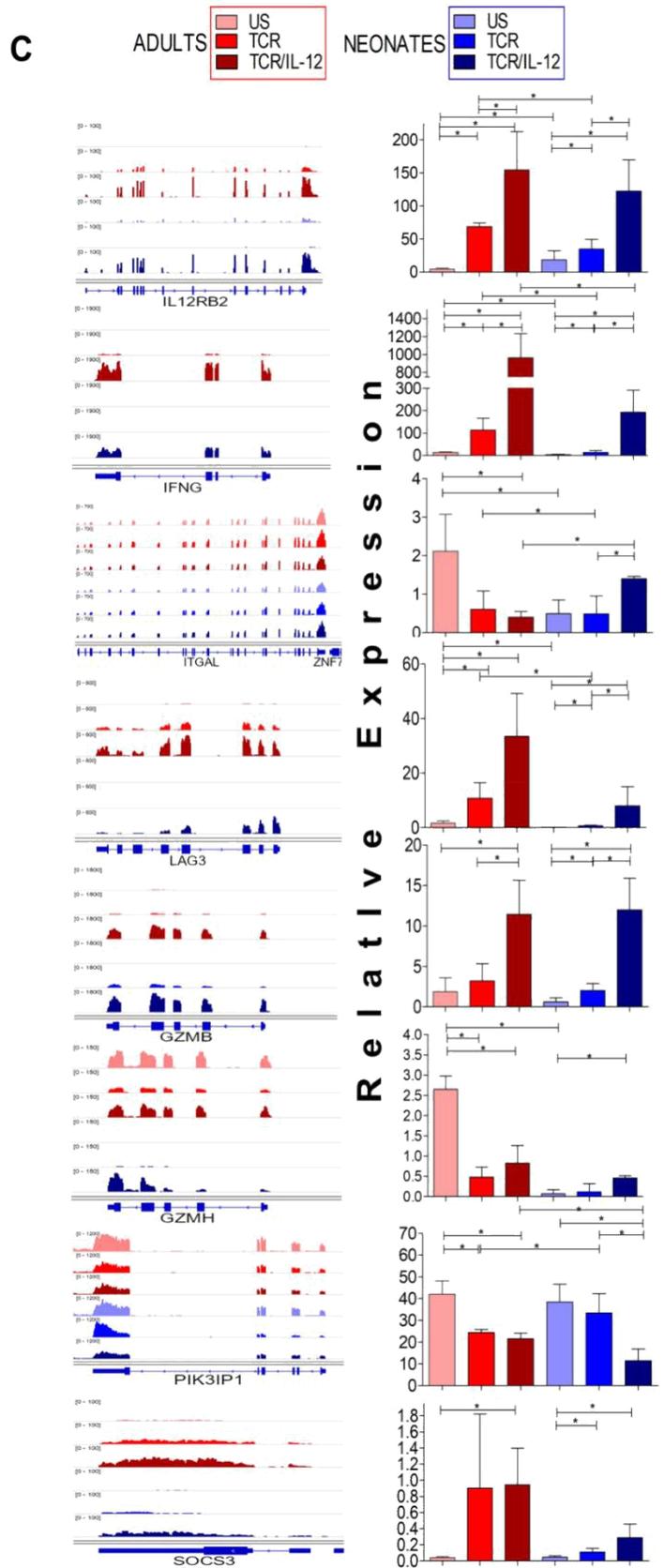
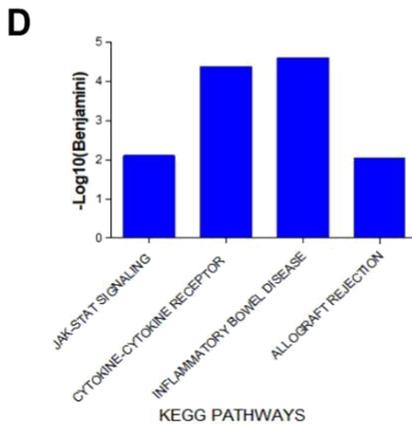
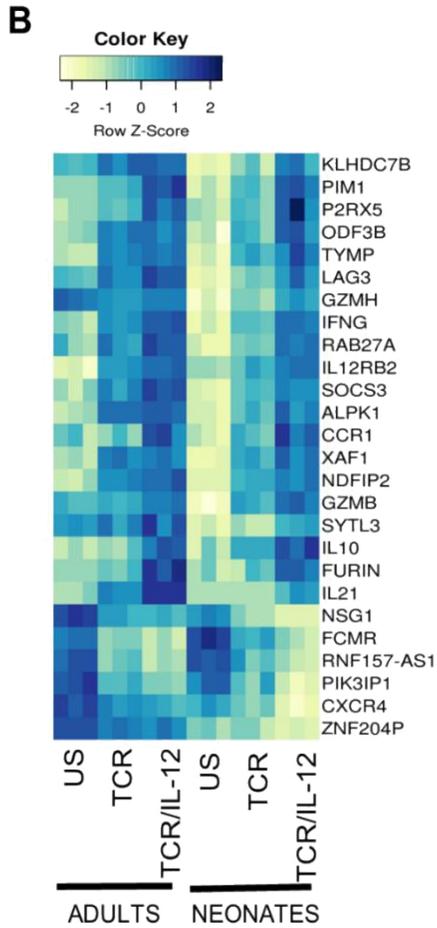
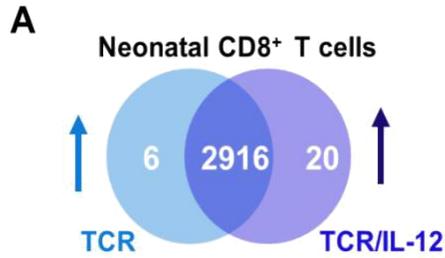
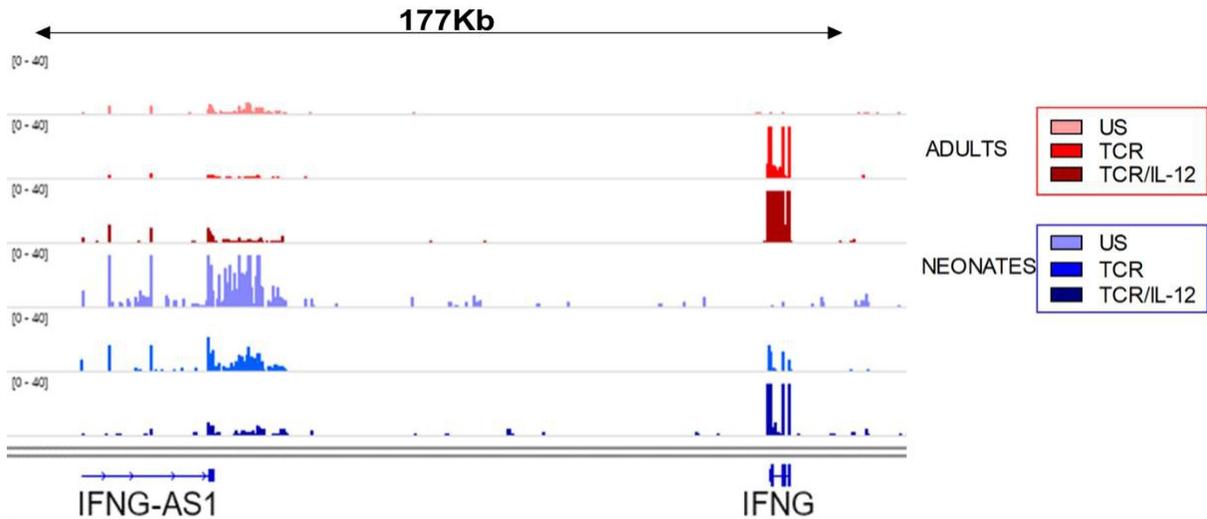


Figura 14. Comparación entre los genes en respuesta al TCR y TCR/IL-12 de las células T CD8⁺ neonatales. A) Diagrama de Venn y B) heatmap de genes inducidos después del tratamiento con el TCR o TCR/IL-12 de células T CD8⁺ neonatales (adjusted p-value < 0.05). C) Visualización en el Genome Browser de una muestra de genes expresados significativamente después del tratamiento del TCR o TCR/IL-12 (izquierda), y evaluaciones de los mismos genes en muestras independientes (n=5) por RT-qPCR (derecha), normalizadas con *β2-microglobulina*. Las significancias estadísticas fueron realizadas por una prueba de t-test Student (no pareados, p-value < 0.05). D) Vías KEGG enriquecidas de los genes diferencialmente expresados, analizados con el software DAVID para asociar genes.

IFN γ está epigenéticamente controlado por un RNA largo no codificante llamado *NeST* o *IFNG-AS1* (Gomez et al., 2013), localizado río arriba del locus de *IFNG*. En la figura 15 se muestra



que en las muestras de células vírgenes de adultos este elemento no se expresa y no mostró cambios en respuesta a la activación. Sin embargo, en células neonatales no estimuladas, *IFNG-AS1* está altamente expresado y baja su expresión por la estimulación, particularmente en la presencia de la IL-12, de acuerdo con una firma epigenética de las células T CD8⁺ neonatales que es modificada por las señales del TCR/IL-12. Esto correlaciona inversamente con la expresión del gen.

Figura 15. Expresión de NeST (IFNG-AS1) e IFN γ durante la estimulación de células T CD8⁺ de adultos y neonatos. Visualización del Genome Browser de NeST e IFN γ de los datos de RNA-seq de células neonatales y de adulto no estimuladas o estimuladas con los tratamientos del TCR o TCR/IL-12.

El receptor de quimiocina CCR1 fue también inducido. La expresión de *CCR1* se incrementa por IFN e induce la migración de las células hacia los tejidos inflamados. Adicionalmente, CCR1 promueve un cambio en el balance Th1/Th2 hacia un fenotipo Th1 (Gao et al., 1997). Seis genes tuvieron baja expresión por la adición de la IL-12, incluyendo al gen del inhibidor de PI3K (*PIK3IP1*), permitiendo la activación de la vía de PI3K, la cual describiremos en la siguiente sección.

El receptor de quimiocina CXCR4 también tuvo baja expresión por la estimulación en la presencia de IL-12. CXCR4 es relacionado al *homing* hacia la médula ósea (Goedhart et al., 2019). En la figura 14C (Panel izquierdo), presentamos los perfiles de RNA-seq de una selección de genes que fueron sobre expresados por la adición de las señales del TCR/IL-12. Para la validación de lo que encontramos, realizamos el análisis por RT-qPCR de estos genes, usando muestras independientes (Figura 14C, panel derecho). En todos los casos el patrón de expresión observado por el análisis de RT-qPCR replicó el patrón de expresión observado por los datos de RNA-seq. En conjunto, estos datos explican la mejora funcional descrita para las células T CD8⁺ neonatales, por la adición de la IL-12 (McCarron & Reen, 2010).

Las señales de la IL-12 inducen la expresión de genes de función celular y metabolismo.

Para explorar el papel de la IL-12 en la funcionalidad de las células neonatales, evaluamos los genes cuya expresión fue significativamente incrementada por las señales a través del TCR en las células de adulto, pero en neonatos solamente alcanzaron significancia por la estimulación por el TCR/IL-12 (Figura 16). De un total de 242 genes que fueron significativamente inducidos por la estimulación del TCR sólo en células de adulto (adjusted p-value < 0.05, log2 fold change >2), 117 fueron recuperados en las células neonatales por la adición de la IL-12 (Figura 16A). Estos genes están predominantemente involucrados en señalización celular, citoesqueleto, transporte celular y metabolismo (Figura 16B).

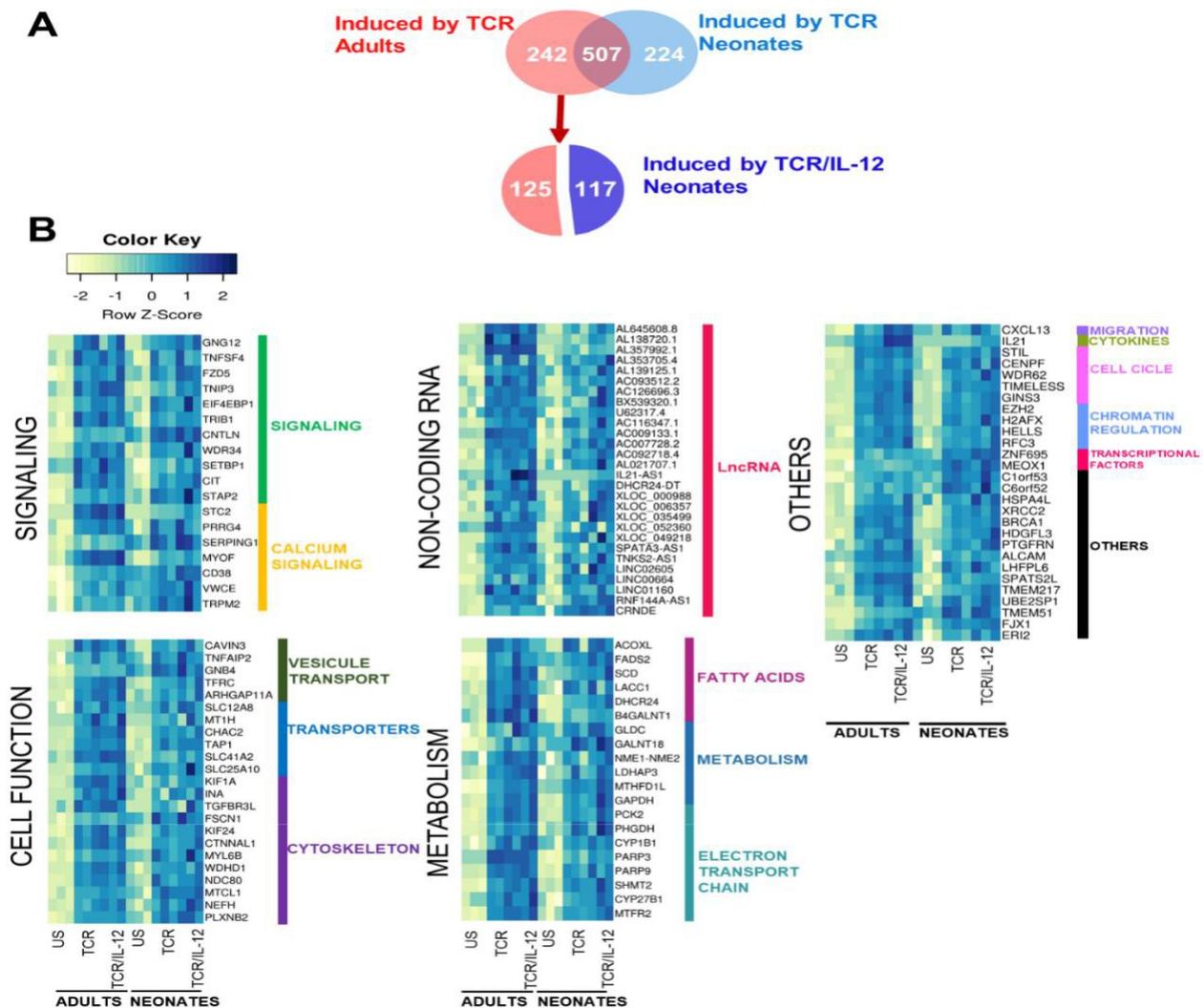


Figura 16. Genes inducidos por las señales del TCR en células T CD8⁺ de adulto, que fueron solamente inducidos por TCR/IL-12 en las células neonatales. A) Diagrama de Venn muestra los genes inducidos por el TCR/IL-12 en las células neonatales, y B) heatmaps de genes inducidos por el TCR en células T CD8⁺ de adultos, inducidos por el TCR/IL-12 en las células neonatales (adjusted p-value < 0.05 y log2 fold change >2), las barras en la derecha muestran anotaciones manuales de las categorías funcionales.

La activación de las células T está asociada con un incremento en el metabolismo, particularmente en glucólisis. Los genes relacionados con la glicólisis fueron sobreexpresados por la estimulación del TCR/IL-12, junto con genes involucrados en síntesis de ácidos grasos, cadena de transporte de electrones, síntesis de ATP, metabolismo de glucosa y otros transportadores. Diferentes RNAs no codificantes, que estaban asociados con genes involucrados en la maduración del RNA, fueron también inducidos en la presencia de IL-12 (Tabla 1).

Entre los LncRNAs inducidos, encontramos a: AL353705.4, asociado con el factor de splicing SCAF1; AL138720.1, asociado con la proteína de unión a poliadenina PABPN1; y AL645608.8 y AL139125.1, ambos asociados con la transferasa Uridil 7, TUT7 (Tabla 1).

lncRNAs and Potential Functions

Gene Symbol	ENSEMBLE ID		Class	Interaction	
XLOC_049218	NA	novel transcript	LncRNA	NA	NA
XLOC_052360	NA	novel transcript	LncRNA	NA	NA
SPATA3-AS1	ENST00000414876	SPATA3 antisense RNA 1 (head to head)	LncRNA	PPARGC1B	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta
TNKS2-AS1	ENST00000432246	TNKS2 antisense RNA 1 (head to head)	LncRNA	GRWD1	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1
LINC01160	ENST00000450155	Long intergenic non-protein coding RNA 1160	LncRNA	AQR	RNA helicase aquarius
LINC00664	ENST00000599078	long intergenic non-protein coding RNA 664	LncRNA	UBTF	Nucleolar transcription factor 1
LINC02605	ENST00000565297	long intergenic non-protein coding RNA 2605	LncRNA	PELP1	Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1
RNF144A-AS1	ENST00000437589	RNF144A antisense RNA 1	LncRNA	TDRD9	ATP-dependent RNA helicase TDRD9
CRNDE	ENST00000501177	Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 180.	LncRNA	C1QBP	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial
AC022239.1	ENST00000527922	novel transcript, antisense to BLK	LncRNA	THOC2	THO complex subunit 2
AL161785.2	ENST00000427080	novel transcript	LncRNA	NISCH	Nischarin
BX571818.1	ENST00000585172.2	novel pseudogene	LncRNA	ABCC9	ATP-binding cassette sub-family C member 9
ERVH48-1	ENST00000447535	endogenous retrovirus group 48 member 1	LncRNA	MYT1	Myelin transcription factor 1
IL21-AS1	ENST00000417927	IL21 antisense RNA 1	LncRNA	AEBP2	Zinc finger protein AEBP2
DHCR24-DT	ENST00000443284.1	DHCR24 divergent transcript	LncRNA	CCDC180	Coiled-coil domain-containing protein 180
XLOC_032059	NA	novel transcript	LncRNA	NA	NA
XLOC_006885	NA	novel transcript	LncRNA	NA	NA
XLOC_016705	NA	novel transcript	LncRNA	NA	NA
XLOC_030946	NA	novel transcript	LncRNA	NA	NA
XLOC_032076	NA	novel transcript	LncRNA	NA	NA

Tabla 1. lncRNAs y funciones potenciales.

Los genes relacionados con ciclo celular y división celular fueron inducidos por las señales del TCR en las células neonatales y de adultos (Figura 17A y B). Estos genes se asociaron con los procesos biológicos relacionados a mitosis (Figura 17C) y fueron validados por RT-qPCR en muestras independientes (Figura 17D). Sin embargo, el incremento de la expresión en los genes relacionados a metabolismo, junto con un incremento en genes relacionados al crecimiento de membrana y proteínas de fusión y citoesqueleto, especialmente encontradas en las condiciones de coestimulación con TCR/IL-12, pueden explicar la alta expansión clonal de las células neonatales, observadas solamente en presencia de la IL-12 (McCarron & Reen, 2010).

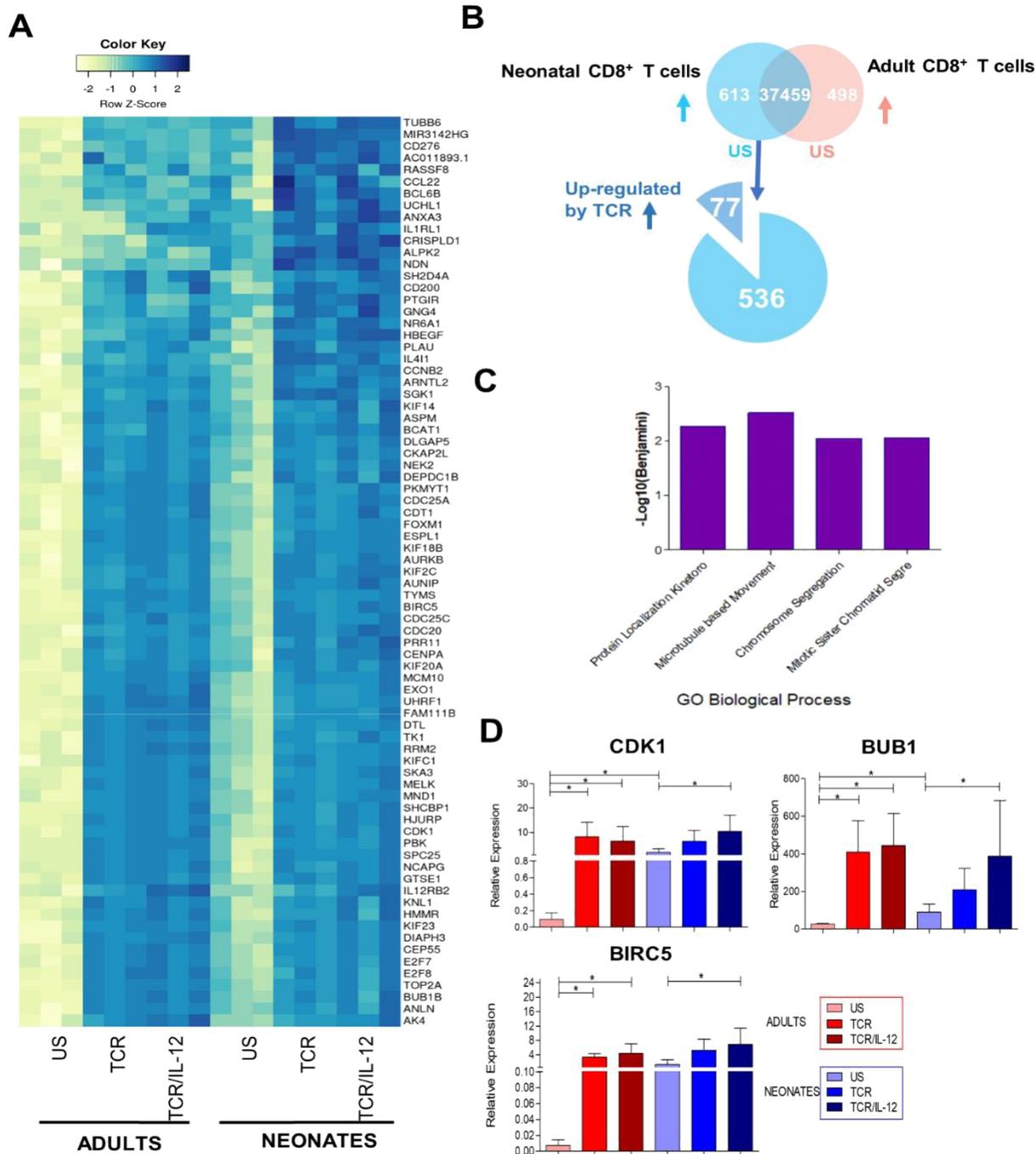


Figura 17. Genes neonatales que responden exacerbadamente al TCR en células T CD8⁺ neonatales. A) heatmap y B) diagramas de Venn que muestran los genes analizados, que son sobreexpresados en las células neonatales que son presentadas en la respuesta exacerbada a las señales del TCR (adjusted p-value < 0.05 y log2 fold change > 2). C) términos GO enriquecidos de los genes

sobreexpresados analizados con el software DAVID. Top 20 de los términos GO significativos se muestra. D) La expresión de una muestra de genes fueron evaluados por RT- qPCR, normalizados con el gene de 2-microglobulina en muestras independientes (n=5). Las significancias estadísticas fueron realizadas con t-test Student (no pareados, p-value < 0.05).

Las señales de la IL-12 reprimen a los genes relacionados con inmadurez de las células T CD8⁺ neonatales.

Como mostramos en la figura 11 y en nuestro reporte previo (Galindo-Albarrán et al., 2016), las células T CD8⁺ neonatales sobreexpresan genes relacionados a una inflamación tipo neutrófilo, inmunidad innata, y precursores de células T. Nos preguntamos que si la coestimulación de la IL-12 puede reprimir esta firma transcripcional inmadura, como se sugiere por nuestro análisis de K-means (Figura 14, clúster 9,10 y 12). Para abordar esto, identificamos un grupo de 23 genes, sobreexpresados en las células T CD8⁺ neonatales vírgenes que fueron específicamente reprimidos por la estimulación del TCR/IL-12 con un log2 fold change > 2 (Figura 18A). Estos genes fueron asociados con la respuesta inmune innata, como son el gen de metaloproteasa MPO y DEFA4, asociados con la actividad antimicrobica y migración a la mucosa intestinal (CCR9)(Gao et al., 1997). El factor transcripcional HOXA3, que es expresado en progenitores hematopoyéticos tempranos y subsecuentemente con una baja expresión en la diferenciación temprana de células T, también se encontró altamente expresado en las células neonatales (Taghon et al., 2003)(Magli et al., 1997)(H. J. Lawrence et al., 1996). Al incluir las señales de la IL-12 a las condiciones estimulatorias, se inhibió expresión de este gen.

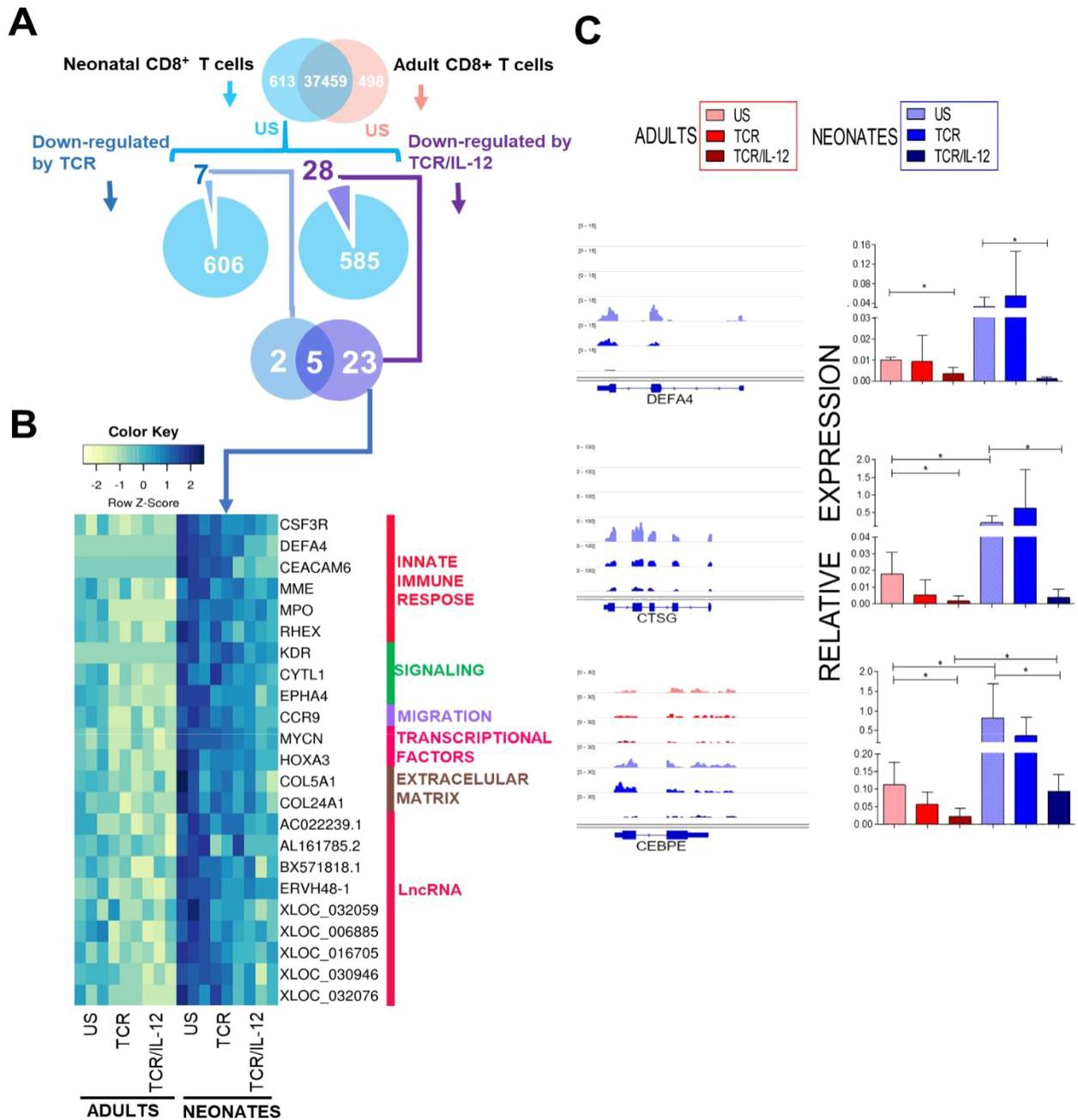


Figura 18. Genes significativamente con baja expresión por las señales del TCR/IL-12 en células

T CD8⁺ neonatales. A) Diagramas de Venn muestran los genes analizados, estos fueron los genes sobreexpresados en las células neonatales que tienen una baja expresión por TCR/IL-12 y B) heatmaps de genes significativamente con baja expresión por TCR/IL-12 en células T CD8⁺ neonatales (adjusted p-value y log₂ fold change >2), barras mostradas en la derecha son anotaciones manuales de las categorías

funcionales. C) izquierda, visualización del genoma browser de una muestra de los genes con baja expresión, después del tratamiento del TCR o TCR/IL-12; derecha, evaluaciones por RT-qPCR de los mismos genes en muestras independientes (n=5), normalizadas con b2-microglobulina. Las significancias estadísticas fueron realizadas con t-test Student (no pareados, p-value < 0.05).

Las células neonatales sobreexpresan más genes de respuesta a neutrófilo, como son CEBPE y Catepsina G(CTSG). La expresión de estos genes no se encontró significativamente inhibida en este clúster, porque los análisis fueron muy astringentes. Sin embargo, usando RT-qPCR en muestras independientes, mostramos que los genes efectivamente bajaron su expresión por las señales del TCR/IL-12, de acuerdo con el análisis de visualización de los datos de RNA-seq (Figura 18C).

En conclusión, la adición de las señales de IL-12 resultó no solo en la inducción de genes característicos de la respuesta de células T CD8⁺, sino también en una baja en la expresión de genes de inmadurez.

El perfil inflamatorio de las células T CD8⁺ neonatales no está completamente reprimido por la coestimulación con IL-12.

En la figura 19, presentamos los genes del clúster 1 que estuvieron sobre expresados en las células neonatales no estimuladas y no cambiaron significativamente después de la estimulación con el TCR o TCR/IL-12. Estos genes estuvieron asociados con factores transcripcionales importantes para las células precursoras, proteínas G triméricas o monoméricas, citoesqueleto, señalización celular, respuesta innata, e inflamación. Asimismo, incluyen genes inflamatorios como el receptor de IL-1 (IL1R) y la prostaglandina G/H sintasa 1 (PTGS1), una enzima clave en la síntesis de prostaglandinas.

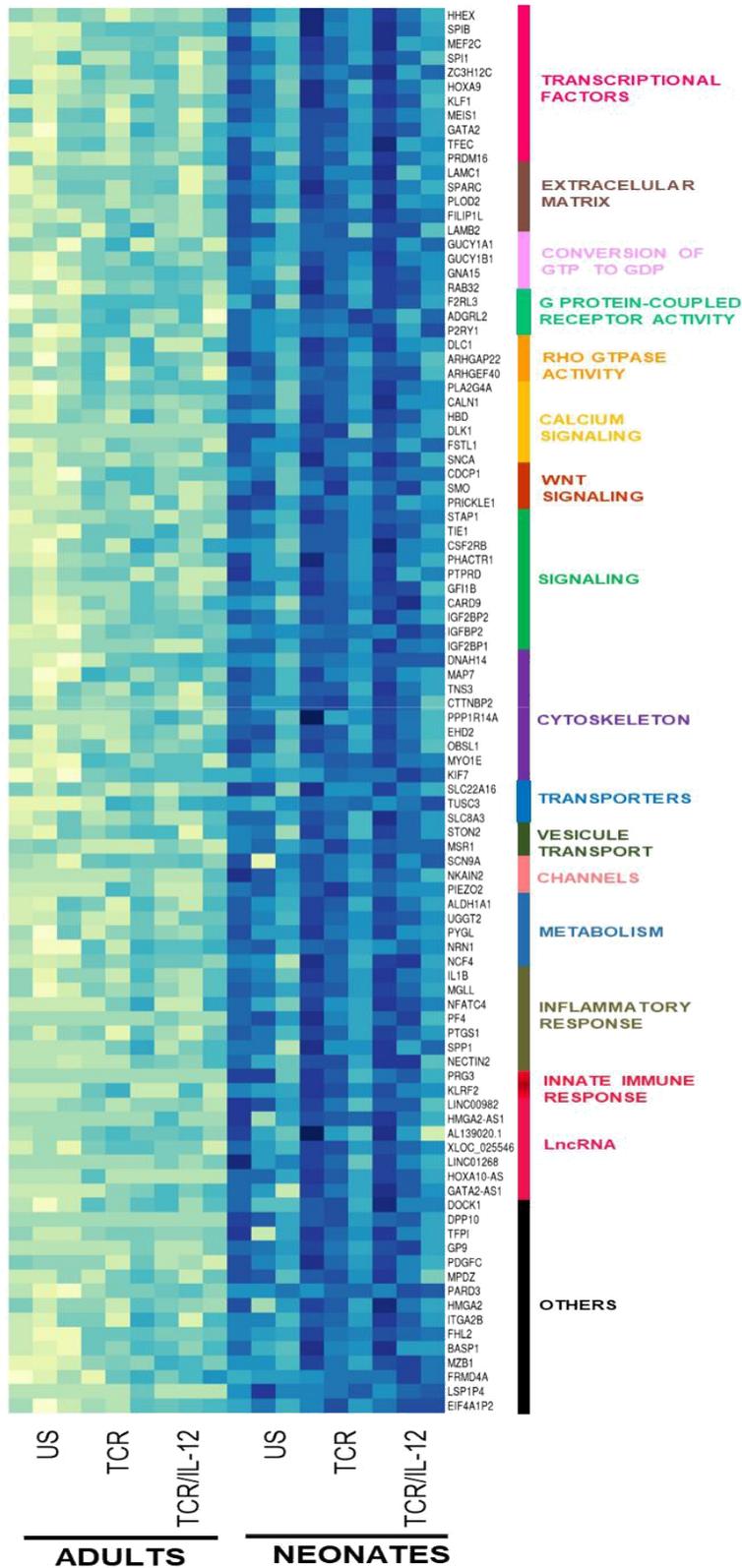
A

Figura 19. Genes neonatales sobreexpresados que no cambian por la estimulación. Heatmap con anotación manual de genes que no cambiaron por la estimulación, tomados del Clúster 1 de K-means.

Después, analizamos los genes que su expresión fue alta en las células neonatales a nivel basal y mostraron una respuesta exacerbada a las señales del TCR/IL-12 (Figura 20). Estos genes fueron manualmente anotados como factores transcripcionales, metabolismo y genes de señalización. MEOX1 es un factor transcripcional que es un miembro de una subfamilia de genes homeobox con un importante papel en el desarrollo y división celular.

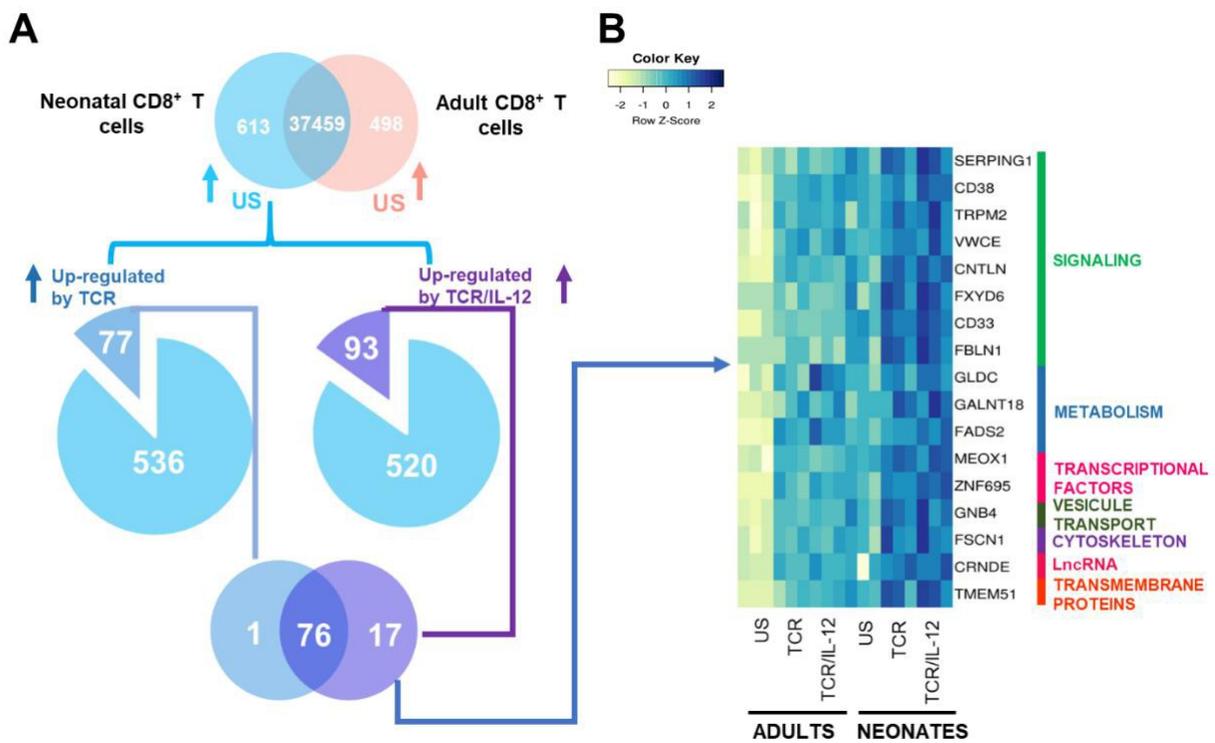


Figura 20. Genes neonatales sobreexpresados, con una respuesta exacerbada a las señales TCR/IL-12. A) Diagramas de Venn mostrando los genes analizados y B) heatmaps con anotaciones

manuales de los genes con una respuesta exacerbada a las señales del TCR y TCR/IL-12 en las células T CD8⁺ neonatales (adjusted p-value < 0.05 y log2 fold change >2).

El canal de calcio TRPM2 está involucrado en la respuesta a TGF α y la activación del inflammasoma NLRP3. CD33, un receptor transmembranal con un dominio inhibitorio basado en el inmunoreceptor de tirosina (ITIM) está potencialmente involucrado en la señalización negativa para la activación en células T. CD38, es una proteína de adhesión con un dominio de hidrolasa ADP ribosa cíclica que está involucrado en la regulación del calcio intracelular (Figura 20). Estos resultados indican que una proporción de genes proinflamatorios e innatos se mantuvieron expresados en las células T CD8⁺ neonatales, a pesar de la maduración transcripcional inducida por la estimulación en la presencia de IL-12. Estos genes representan el 16.47% de los genes diferencialmente expresados (Figura 13, clústeres 1 y 6) en las células neonatales y pueden explicar la alta respuesta inflamatoria de los neonatos a infecciones.

Cambios en la metilación del DNA de los promotores inducidos por las señales del TCR o TCR/IL-12.

En nuestro estudio previo, reportamos que la firma transcripcional única de las células T CD8⁺ neonatales fue acompañada por una firma epigenética (Galindo-Albarrán et al., 2016). Evaluamos la densidad de la metilación del DNA en los promotores de un subgrupo de genes que fueron sobre expresados o menos expresados por las señales TCR/IL-12. Para esto, realizamos ensayos de MeDIP-PCR. En la figura 21 podemos observar que la metilación del DNA en los

promotores de los genes CEBPE, CTSG y DEFA4, se incrementó por la estimulación del TCR y aún más por las señales del TCR/IL-12 en las células neonatales (Figura 21),

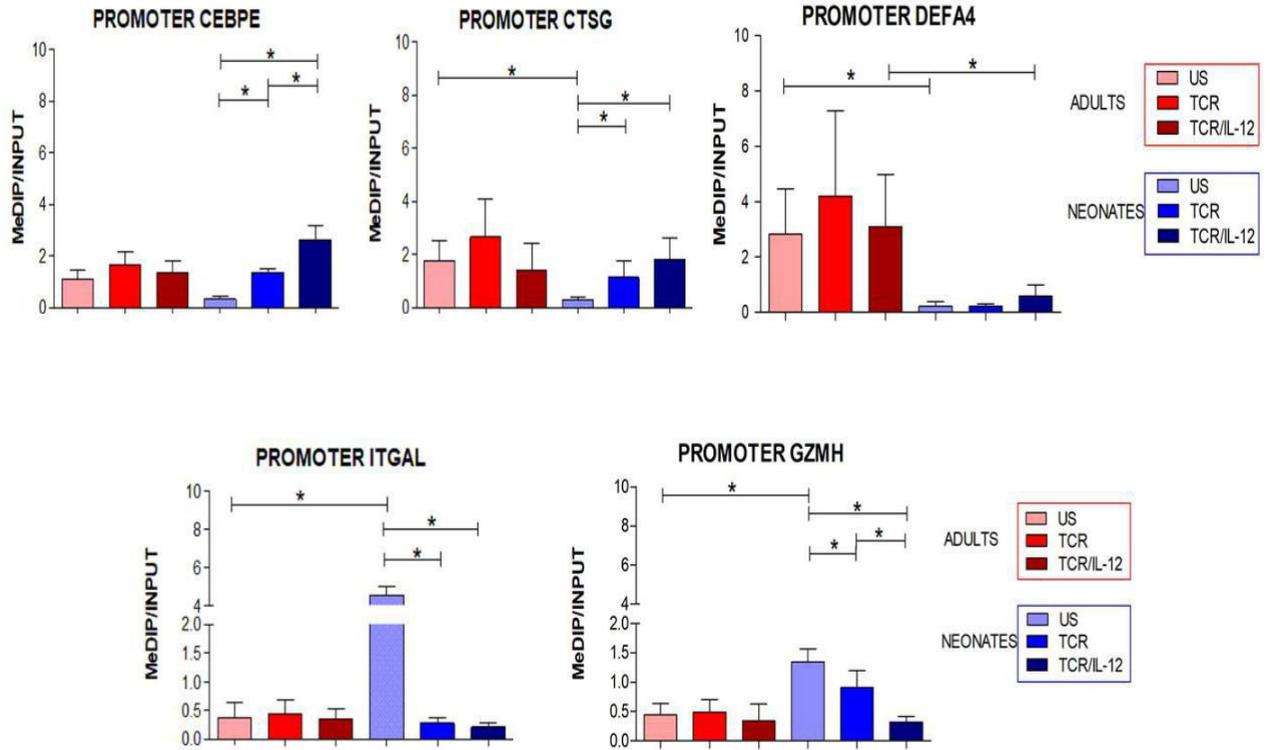


Figura 21. Cambios en la metilación de los promotores inducidos por las señales del TCR o TCR/IL-12. Histogramas muestran los cambios en los niveles de la metilación del DNA en los promotores de los genes seleccionados relacionados con inmunidad innata versus los genes relacionados a las funciones de células T CD8⁺. La metilación fue evaluada por MeDIP/qPCR de la cromatina inmunoprecipitada con la anti-Metilcitosina contra el DNA no tratado de la misma muestra (input). Todos los ensayos tienen una n=6. La significancia estadística fue hecha por t-test Student (no pareada; *p<0.05).

En contraste, la metilación de DNA del promotor de la integrina LFA1 y Granzima H disminuyeron significativamente ante la estimulación, en particular por el tratamiento del TCR/IL-12. Estos concuerdan con una reprogramación transcripcional de las células neonatales por la estimulación por señales del TCR/IL-12, que es acompañada por una modificación en el paisaje epigenético.

Conclusiones del Capítulo

En este capítulo encontramos que en las células T CD8⁺ neonatales, las señales de la IL-12 contribuyen a la reprogramación genética de los linfocitos neonatales. Pudimos observar la sobreexpresión de genes relacionados con la señalización de la célula, metabolismo y división celular en las células neonatales en presencia de las señales del TCR e IL-12. No solo la sobreexpresión de los genes estuvo presente cuando las células T CD8⁺ se encontraban en presencia de la IL-12, también observamos la inhibición de la expresión de genes relacionados con respuesta inmune innata, migración y algunos RNA no codificantes en las células T CD8⁺ de neonatos. También observamos a *NeST* el RNA no codificante de IFN γ , el cual se encontró disminuida su expresión cuando las células neonatales fueron estimuladas con TCR/IL-12. Siendo un mecanismo epigenético importante para la regulación de IFN γ en presencia de las señales de la IL-12. Además, las señales de la IL-12 contribuyeron a la inhibición del factor transcripcional firma de neutrófilos CEBPE y a otros genes relacionados con la inmunidad innata.

Encontramos que los resultados del qPCR correlacionaban con el transcriptoma, las señales de la IL-12 inducen el cierre de la cromatina de genes tipo neutrófilo y apertura de genes de citotoxicidad, sugiriendo que las señales de la IL-12 contribuyen a la reprogramación epigenética de los linfocitos T CD8⁺ neonatales.

Capítulo 2: Asociación de motivos de unión de factores transcripcionales con las regiones regulatorias del epigenoma de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

Introducción

Regulación de la expresión génica por el epigenoma

El control de la expresión de genes juega un papel importante en una variedad de procesos biológicos, como el desarrollo de organismos y la diferenciación celular, respuestas a estrés celular, homeostasis en los tejidos y en la inmunidad. Como mencionamos anteriormente, está regulado a diferentes niveles: el lineal, compuesto por enhancers y promotores, el epigenético y la localización nuclear. En este capítulo nos centramos en el nivel epigenético y para comprenderlo mejor, necesitamos comprender cómo está organizada la estructura del DNA.

La estructura de doble hélice del DNA es muy larga, por lo tanto está compactada dentro una estructura llamada cromatina. El primer paso de compactación del DNA es la formación de nucleosomas. Un nucleosoma es la unidad repetitiva de la cromatina formada de 147 pares de bases alrededor de un octámero, formado por dímeros de 4 histonas (H2A, H2B, H3 y H4)(Fessele & Wright, 2018). Las histonas están cargadas negativamente y están asociadas con la estructura de doble hélice del DNA que está cargado positivamente en el núcleo celular para compactar el DNA. Los nucleosomas se envuelven dentro de una espiral llamada solenoide, continuando la compactación del DNA para formar la cromatina.

La cromatina existe en dos grandes formas, la eucromatina y la heterocromatina. La Eucromatina es la menos compactada y por lo tanto acceden fácilmente las moléculas necesarias para la transcripción. La heterocromatina es altamente compactada y no es accesible para la transcripción. Esta accesibilidad del DNA está regulada por el epigenoma (Fessele & Wright, 2018). El epigenoma es una colección de componentes químicos que se adjuntan o sobrepone sobre la secuencia de DNA, sin alterar la secuencia de bases y afectan la expresión de los genes. El epigenoma está regulado por diferentes mecanismos epigenéticos, los cuales actúan sobre la cromatina para cambiar la transcripción génica.

Los mecanismos epigenéticos guían el crecimiento y desarrollo de un organismo, dirigen y mantienen la identidad celular y aseguran en cada tipo celular la expresión de los genes correctos, asociados con la función y la estructura de dicha célula (Fessele & Wright, 2018). Estos mecanismos epigenéticos son la metilación del DNA, las modificaciones covalentes de las histonas, los RNA no codificantes (ncRNA) y otros mecanismos complementarios que involucran el deslizamiento o eliminación de los nucleosomas. Para esto último, intervienen enzimas remodeladoras de la cromatina, dependientes de la hidrólisis de ATP, y el intercambio de variantes de histonas por histonas canónicas (Figura 22).

A continuación describiremos a grandes rasgos los mecanismos más estudiados, que son la metilación del DNA, los ncRNAs. Las modificaciones de histonas se describirán en la siguiente sección a más a detalle.

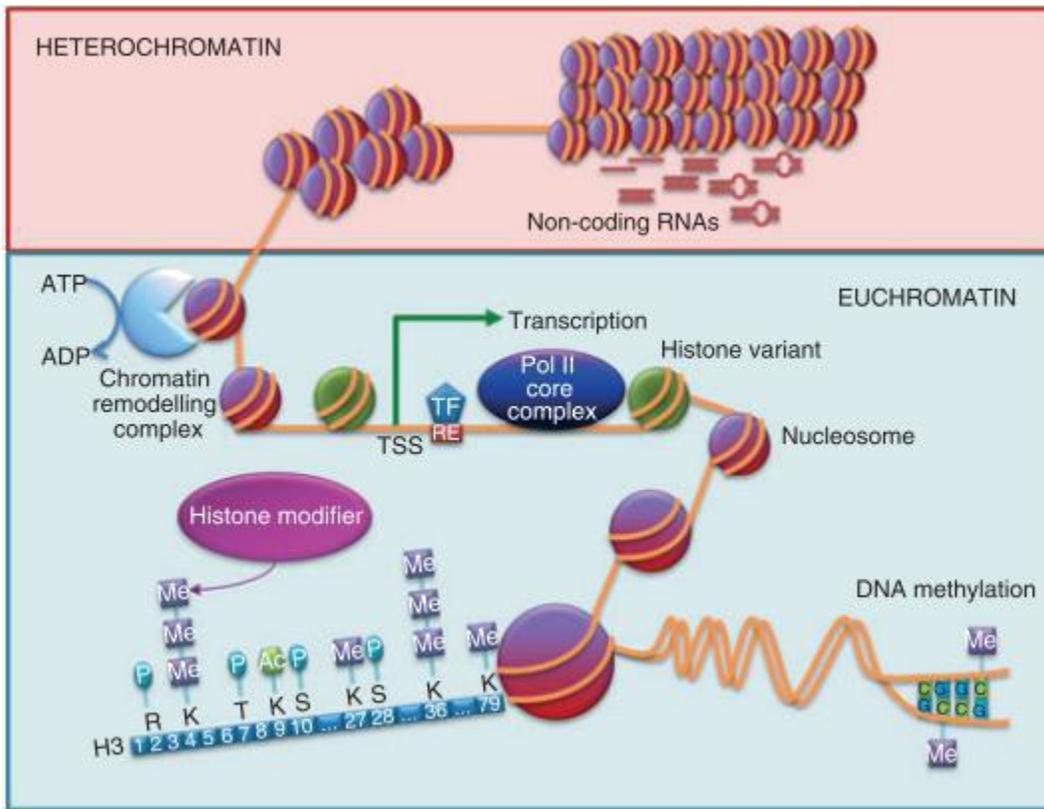


Figura 22. Mecanismos involucrados en la regulación epigenética. Los complejos de remodelación de la cromatina pueden reestructurar, reponer y desplazar los octámeros de histonas usando ATP para regular el acceso al DNA para la unión de factores transcripcionales a sus sitios de reconocimiento en el DNA, coactivadores y maquinaria basal de la transcripción incluida el complejo de la RNA Pol II. Las colas de las histonas pueden ser modificadas por la acción de diferentes modificadores de histonas como acetilasas de histona, metilasas de histona y cinasas de histona. La metilación del DNA que es asociada al cierre de genes es llevada a cabo por DNA metiltransferasas. Los RNA no codificantes mantienen la formación de la heterocromatina (Lim et al., 2013).

Uno de los mecanismos que participa en la regulación del epigenoma es la metilación del DNA, que se refiere a la adición del grupo metilo en la citosina del DNA. Esta ocurre principalmente en regiones ricas de islas CpG y esta reacción es llevada a cabo por las DNA metiltransferasas. Este mecanismo se caracteriza por participar en el silenciamiento de genes, en el imprinting genómico y en el silenciamiento del cromosoma X.

Otro mecanismo requerido para la regulación epigenética de la expresión de genes son los RNA no codificantes (ncRNAs). La mayoría de los ncRNAs pueden ser clasificados de acuerdo con su tamaño y función. Los RNAs no codificantes cortos (20-25 nucleótidos) incluyen a los micro RNAs (miRNA) y a los RNA no codificantes largos (LncRNAs), que se consideran cuando son mayores a los 200 nucleótidos (Fessele & Wright, 2018). Los miRNAs limitan la expresión de genes por la unión a la región 3'-Region no traducida (UTR) de los mRNAs.

Los LncRNAs regulan la expresión de genes a diferentes niveles: transcripción, degradación del RNA, splicing y traducción. Los LncRNAs también pueden incrementar la expresión de genes reclutando a factores transcripcionales. Un subconjunto de los LncRNAs, son los RNAs largos no codificantes intergénicos, que exhiben una alta conservación a través de las diferentes especies. Ellos guían a complejos de modificación de la cromatina a locis genómicos específicos, participando en el establecimiento de estados epigenéticos específicos del tipo celular (Inbar-Feigenberg et al., 2013).

Los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP, son otro mecanismo epigenético que participa en la regulación de la cromatina. Estos complejos tienen una ATPasa central que hidroliza el ATP y remueve o desplaza histonas del DNA. Estos complejos pueden clasificarse en cuatro distintos grupos en base a la homología de su secuencia de la subunidad de ATPasa: ISWI (Imitation Switch), INO80/SWRI (Inositol requiring/Sick With RA8 ts), CHD (Proteína de unión al cromodominio de la helicasa del DNA) y SWI/SNF (SWITCH/Sucrose Non Fermentable) (Lim et al., 2013).

El complejo ISWI está compuesto por las proteínas ISWI1 y 2 que también pueden interaccionar con 3 complejos de remodelación de la cromatina. Estos complejos son el factor de remodelación de nucleosoma (NNURF), el complejo de ensamblaje y remodelamiento de la cromatina (CHRAC) y el factor de ensamblaje y remodelación dependiente de ATP (ACF). Las proteínas ISWI pueden ensamblar los nucleosomas en DNA lineal y puede mover los nucleosomas (Lim et al., 2013). La familia CHD es caracterizada por dos motivos firmas: los cromodominios localizados en tándem en la región N-terminal y el dominio de ATPasa tipo SNF2. Estas proteínas están involucradas en diferentes procesos celulares, entre ellos: el ensamblaje de la cromatina, la regulación transcripcional, la reparación de DNA y la replicación del DNA. El miembro ScChd1 relocaliza los nucleosomas cerca a los centros de los fragmentos del DNA, otro miembro es el dChd1 que tiene la habilidad para ensamblar cromatina deficiente de la histona H1 (Concetta G.A. Marfella¹ and Anthony N. Imbalzano, 2007).

Los miembros del complejo INO80/SWR1 juegan papeles esenciales en la reparación del DNA, replicación del DNA, mantenimiento de telómeros y segregación de cromosomas. Este complejo está formado por SWR1 y SNF2, relacionados a la proteína activadora de CBP (SCRAP) en humanos y al complejo Inositol requerido 80 (INO80). SWR1 promueve el remplazamiento de los dímeros de nucleosomas H2A/H2B con H2A.Z/H2B, mientras que INO80 cataliza la reacción inversa de intercambio de los dímeros (Jianhao Wang et al., 2019). El complejo mejor caracterizado es SWI/SNF, que contiene como subunidad de ATPasa a Brahma (Brm) o gen 1 relacionado con Brahman (BRG1). Estas ATPasas son capaces de actuar solas para remodelar los nucleosomas. Se cree que el complejo SWI/SNF es dirigido hacia genes específicos por la interacción de factores transcripcionales, correguladores o componentes de la maquinaria de la transcripción (Lim et al., 2013). Estos complejos remodeladores de la cromatina pueden unirse a sus genes blancos y reorganizar la cromatina, que a su vez influencia la actividad de los genes.

Modificaciones de Histonas

El DNA está empaquetado en las células como cromatina, una estructura dinámica compuesta de nucleosomas. Un nucleosoma está compuesto de un octámero de histonas que contiene dímeros de cuatro histonas H3, H4, H2A y H2B sobre las cuales se enreda un segmento de DNA de 147 pares de bases. Las histonas tienen una N-terminal o C-terminal saliente llamado “colas” que se extienden del nucleosoma y contienen aminoácidos modificables que ayudan a determinar como el DNA es compactado dentro de la cromatina.

Las modificaciones postraduccionales sobre las colas de las histonas pueden alterar la carga entre las histonas y el DNA, impactando en la organización de la cromatina y también son sitios de reclutamiento de los complejos remodeladores de la cromatina, que abren o cierran el acceso al DNA.

Existen diferentes modificaciones postraduccionales que pueden sufrir las histonas, tal es el caso de la metilación, acetilación, fosforilación y ubiquitinación que son las modificaciones más estudiadas. También existen otras modificaciones como son la sumolación, ADP ribosilación, citrulinación, deaminación, formilación, O-GlcNAcilación, propionilación, butirilación, crotonilación y la isomerización de la prolina (Audia & Campbell, 2016a).

La cromatina transcripcionalmente activa o la silenciada, se caracterizan por las distintas modificaciones postraduccionales en las histonas y más aún por su combinación. Los dominios de cromatina activa están caracterizados por un distintivo arreglo de marcas de histonas. Por ejemplo, la cromatina transcripcionalmente activa se caracteriza por tener la siguiente combinación: altos niveles de acetilación de las lisinas en las colas de H3 y H4, la trimetilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4me3) y la dimetilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me2); cercanos al sitio de inicio de la transcripción (Holtzman & Gersbach, 2018). La marca H3K4me3, está relacionada con la elongación transcripcional y la eucromatina activa (K. Zhang et al., 2002), cuando este sitio sólo está demetilado, se relaciona con eucromatina permisiva; mientras que la marca de monometilación en esta misma lisina (H3K4me1) es marcador de potenciadores o *enhancers*.

Otra marca relacionada a apertura de la cromatina, marcadora de promotores activos, es la acetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9ac)(M. Lawrence et al., 2016). Otras 2 marcas asociadas a los cuerpos de genes que se transcriben activamente son la acetilación de la Lisina 27

en la histona 3 (H3K27ac) y la marca de trimetilación en la lisina 36 en la histona 3 (H3K36me3), ambas asociadas con descompactación de la cromatina, siendo que H3K36me3 está más relacionada a la elongación transcripcional (M. Lawrence et al., 2016). Otros ejemplos de modificaciones de histonas asociadas a eucromatina son: la acetilación en la lisina 16 de la histona H4 (H4K16ac) y la acetilación en la Lisina 8 (H4K8ac), que reducen la compactación de la cromatina e incrementan la transcripción y están asociadas a reparación del DNA. También marca de apertura es la fosforilación de la serina 10 en la histona 3 (H3S10P), que están involucradas en la activación transcripcional, meiosis y mitosis en la célula (M. Lawrence et al., 2016). Así como hay marcas de apertura, también existen marcas de cierre o compactación de la cromatina, tal es el caso de la trimetilación y dimetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9me3/2), que están asociadas con heterocromatina constitutiva, regiones cromosomales silenciadas, imprinting y metilación del DNA. Otra trimetilación y dimetilación relacionadas con el silenciamiento de la cromatina son H3K27me3/me2, que se encuentran en regiones silenciadas por el complejo represivo Polycomb 2 (PRC2). Estas están relacionadas con la inactivación del cromosoma X y se pueden encontrar en genes bivalentes (Holtzman & Gersbach, 2018). Otras modificaciones asociadas a heterocromatina, que han sido menos estudiadas, son la dimetilación y trimetilación de la Lisina 20 en la histona 4 (H4K20me2/me3), que se relaciona con la condensación de la cromatina. Asimismo la acetilación de la lisina 12 en la histona 4 (H3K12ac), también es asociada al silenciamiento de los telómeros, que puede tener un efecto dual, ya que también se ha visto asociada a activación transcripcional y reparación del DNA (M. Lawrence et al., 2016).

La marca H3K79me3 es también encontrada en regiones genómicas reprimidas, de hecho se ha observado enriquecimiento de esta marca en alelos metilados (M. Lawrence et al., 2016). Las modificaciones de histonas están influenciadas por otras modificaciones de histonas.

H3K79me3 se encuentra en regiones genómicas enriquecidas en H3K4me3, ambas se colocalizan en cromatina activa. La metilación de la marca H3K79 depende de la deposición de la marca de histona H2BK123Ub. También se observado que H3K79me1 está enriquecida en regiones donde H3K4me3 y H3K27me3 también se encuentran (M. Lawrence et al., 2016).

Las marcas H3K4me3 y H3K27me3 coexisten en regiones bivalentes o *poised*. Similar a H3K79me3, H3K122ac colocalizan no solo con H3K4me3, sino también con la marca acetilada de H2A.Z y H3.3, que están asociadas a regiones transcritas. También H3K122ac se encuentra en enhancers activos junto con las marcas.

Estados de la cromatina

Podemos estudiar la localización de las modificaciones de histonas individualmente a través de ensayos de Inmunoprecipitación de cada marca y secuenciación masiva. Esto nos permite localizar la marca en cuestión en localizaciones precisas del genoma, como son los sitios de inicio o en los límites de los exones, en los telómeros, lo largo del cuerpo del gen, entre otros sitios. Las señales emitidas por las modificaciones de histonas pueden ser estrechas o dominios amplios.

Las modificaciones de histonas se encuentran recurrentemente en combinaciones en los promotores, *enhancers* y regiones reprimidas (Figura 23). La combinación de las marcas de histona y las proteínas de unión al DNA que se encuentran en una región específica del genoma se define como “Estado de la cromatina”(Figura 23) (Jiang & Mortazavi, 2018).

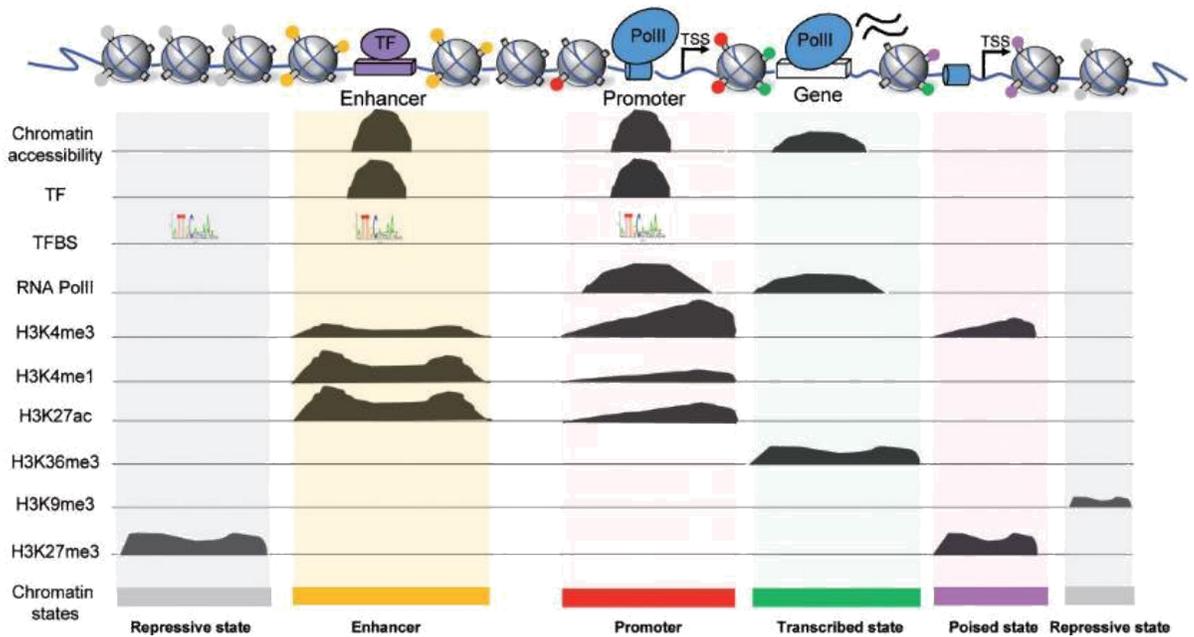


Figura 23. Estados de la cromatina son definidos por diferentes modificaciones de histonas, FTs y la unión de RNA Pol II. Esta figura es un ejemplo, de un estado represivo (gris) caracterizado por la alta señal de H3K27me3 o H3K9me3, un estado de enhancer (amarillo) que ocupan la marca de H3K4me1, en el estado de los promotores (rojo) está presente H3K4me3 y H3K27ac así también la presencia de la unión de RNA Pol II, mientras que los promotores en estado *poised* o bivalente (magenta) se muestran marcas de H3K4me3 y H3K27me3. Región transcritas activamente (verde) es caracterizada por H3K36me3 con alguna unión RNA Pol II a lo largo del cuerpo del gen (Jiang & Mortazavi, 2018).

Estos estados de la cromatina pueden usarse para anotar regiones regulatorias en los genomas. Esto nos ayuda a tener una mejor clasificación de la cromatina en las distintas regiones regulatorias del genoma, como son promotores, enhancers, insulators, regiones repetitivas, reprimidas, transcritas y regiones bivalentes o *poised* (Jiang & Mortazavi, 2018)(Baker, 2011). Dependiendo de la combinación de las marcas de histonas podemos describir las regiones regulatorias.

Con los estados de la cromatina podemos definir por ejemplo, a los promotores activos en los sitios de inicio de la transcripción (TSS) activos, por la presencia de H3K4me3 y H3K27ac. La primera, además promover la apertura de la cromatina, recluta directamente al complejo de transcripción mientras que H3K27ac es marca de cromatina relajada (Kimura, 2013). Las regiones de transcripción activa se pueden definir principalmente por la presencia de la trimetilación de H3K36, que está asociada con los cuerpos de genes que están transcribiéndose activamente. La metiltransferasa de histona SETD2, que media la metilación de H3K36, está acoplada a la transcripción, ya que se une a la RNA pol II durante la elongación. Otra marca que puede estar presente en los cuerpos de los genes, pero a niveles bajos de enriquecimiento es H3K4me1 (Kimura, 2013)(Figura 24).

Los enhancers activos son generalmente marcados por H3K4me1 y la acetilación de H3K27 (H3K27ac), también pueden estar asociados con la marca H3K4me3. Sin embargo, esta marca puede estar en sitios de inicio de la transcripción, pero los niveles de H3K4me3 tienen un menor enriquecimiento en los enhancers comparado con H3K4me1 como se muestra en la figura 24 , en enhancers activos la demetilación está regulada por el complejo KDM5C/JARID1C (Kimura, 2013).

Las marcas asociadas a estados bivalentes o “*poised*” son la coexistencia de la marca de apertura H3K4me3 y la marca asociada a cierre de la cromatina H3K27me3. Estas marcas nos ayudan a definir los enhancers y promotores que se encuentran en estado *poised* en la célula (Figura 23 y 24) (Kimura, 2013)(Audia & Campbell, 2016a). Los promotores en estado bivalente o *poised*, tienen como característica la presencia de ambas marcas de apertura y represión H3K4me3 y H3K27me3. Los enhancer en estado *poised* tienen la presencia de H3K4me1 junto con las marcas de H3K4me3 y H3K27me3(Audia & Campbell, 2016b).

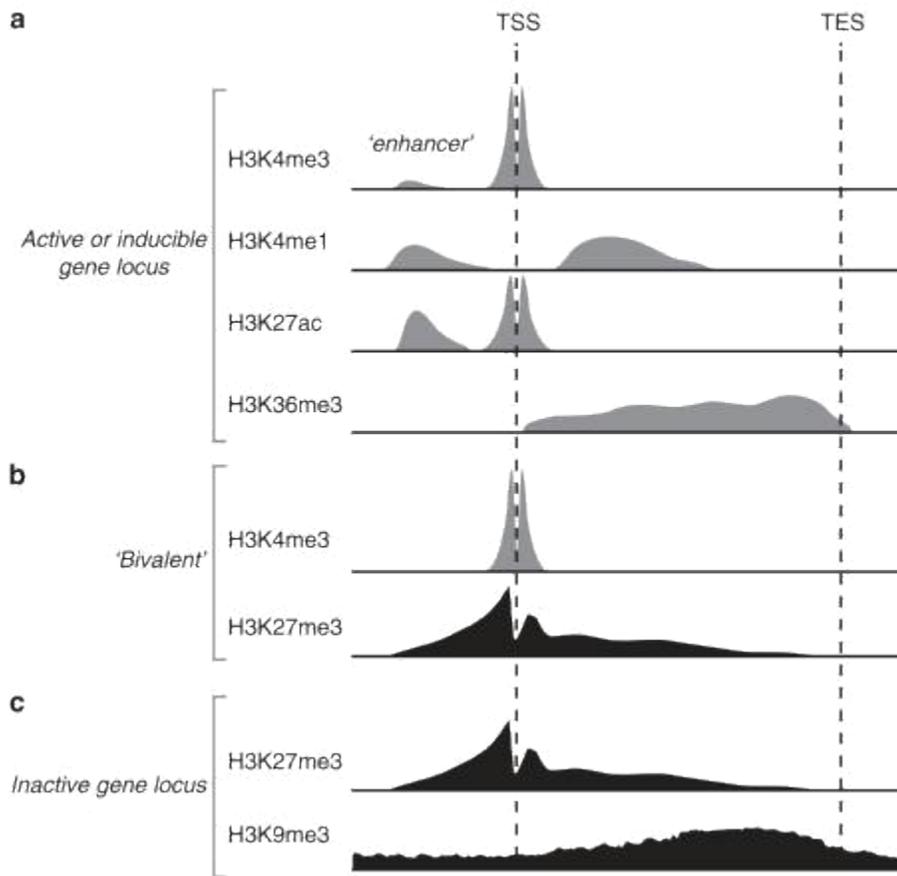


Figura 24. Distribución de las modificaciones de histonas. Se muestra la distribución de seis modificaciones de histonas. TSS, sitio de inicio de la transcripción, TES, sitio final de la transcripción. H3K4me3 está enriquecida alrededor de los TSSs. H3K4me1 es enriquecida alrededor de los *enhancers* y río abajo. H3K27ac está enriquecida en *enhancers* activos y TSSs. En células madre no diferenciadas, ambas marcas H3K4me3 y H3K27 están enriquecidas en TSSs en algunos genes. H3K27me3 está enriquecida alrededor de TSS inactivos en células somáticas. H3K9me3 está distribuida a lo largo en regiones inactivas. H3K27me3 y H3K9me3 usualmente no colocalizan juntas. (Kimura, 2013).

La represión de los genes puede estar mediada por dos mecanismos distintos involucrando H3K9me3 y H3K27me3. H3K27me3 está asociado con heterocromatina facultativa. Esta trimetilación de H3K27 es adicionada por el complejo de represión Polycomb. Por lo que el alto enriquecimiento en esta marca define promotores silenciados. Otras marcas que pueden estar presentes a muy bajos niveles junto a H3K27me3 son las marcas de H3K4me1 y H3K4me4. Esta combinatoria nos permite definir a promotores silenciados o reprimidos por el complejo Polycomb. También podemos encontrar a H3K27me3 en *enhancers* silenciados, con niveles similares de enriquecimiento que la marca H3K4me, que marca los *enhancers* (T. Zhang et al., 2015).

Las regiones de heterocromatina constitutiva se caracterizan por la presencia de la trimetilación de H3K9. Esta trimetilación es adicionada por la metiltransferasas SUV39H1 y ESET/SETDB1 y removida por KDM4A/JMJD2A/JHDM3A. Esta marca se ha observado en dominios densos de DNA alrededor de la periferia nuclear y nucleolo (Kimura, 2013).

Diferentes herramientas computacionales se han desarrollado para la identificación de las combinaciones de las modificaciones de histonas. Las herramientas más utilizadas son ChromaSig y ChromHMM (de Pretis & Pelizzola, 2014). ChromaSig identifica los clústeres de las modificaciones de histonas usando mapas de genoma amplio de las marcas de la cromatina. Mientras que ChromHMM, analiza las modificaciones de histona permitiendo identificar los distintos estados de la cromatina a partir de modelos de Markov Hidden Multivariados (HMM), también es capaz de clasificar la cromatina en regiones fuertemente depletadas de modificaciones de histona (de Pretis & Pelizzola, 2014).

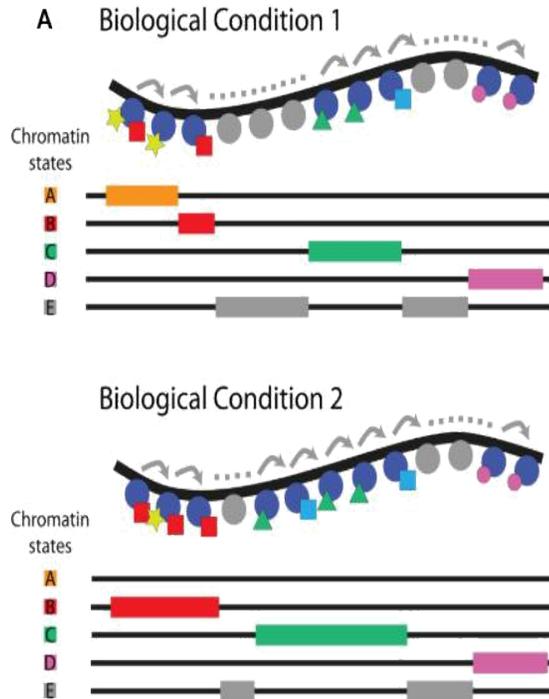


Figura 25. La adopción de los estados de la cromatina para descifrar la interacción entre las marcas epigenéticas en múltiples condiciones biológicas. Representación de los estados de la cromatina relevantes basados en HMM, el DNA se representa en negro, las histonas como círculos grises o azules, y las diferentes modificaciones de histonas son representadas en diferentes formas coloreadas. A) los estados de la cromatina se pueden comparar con diferentes tipos de células o condiciones biológicas; las flechas representan el cambio entre diferentes estados (de Pretis & Pelizzola, 2014).

Estas herramientas permiten visualizar la firma combinatoria de las modificaciones de histonas y la asociación de complejos de la cromatina con elementos funcionales del genoma (Figura 24). También nos permiten tener una referencia visual de los elementos regulatorios críticos en el genoma que le otorgan las diferentes características a las células en las diferentes condiciones biológicas o las diferencias entre los tipos celulares (Figura 25) (de Pretis & Pelizzola, 2014).

En este capítulo describiremos algunas de las regiones regulatorias a partir de las modificaciones que pueden estar presentes en los estados de la cromatina.

Métodos para analizar la jerarquía de la accesibilidad de la cromatina

El DNA se compacta y organiza para formar la cromatina. La estructura cromosómica del DNA puede ser categorizada como de “alto orden” y de “orden primario” de acuerdo a su complejidad de enrollamiento (Figura 26) (Fessele & Wright, 2018).

La estructura del genoma de alto orden es más visible durante la mitosis, cuando las fibras de la cromatina son enrolladas en cromosomas. Cada cromosoma puede ser confinado a un compartimiento genómico. Dentro de estos compartimientos, los cromosomas interactúan entre sí y estas regiones de interacción son conocidas como dominios de asociación topológicos (TADs). Los TADs activos están ricos en genes, marcas de cromatina abierta, factores transcripcionales y sitios de hipersensibilidad a la DNAsa-I (Figura 26) (Chang et al., 2018).

El orden primario de la cromatina se refiere a la fibra de cromatina no empaquetada, donde los nucleosomas son expuestos. Como lo hemos mencionado anteriormente, los nucleosomas son la unidad fundamental de la cromatina. La cromatina puede ser categorizada en eucromatina y heterocromatina. La eucromatina se refiere a las regiones con pérdida del empaquetamiento, ricas en genes que se transcriben y factores transcripcionales y la heterocromatina representa a la parte menos accesible del genoma.

La expresión de genes y las funciones biológicas están relacionadas con las interacciones entre las regiones de estructuras de alto orden y la accesibilidad de la cromatina a nivel de

estructuras de orden primario, que son regulados por complejos proteicos y modificaciones epigenéticas (Fessele & Wright, 2018).

El conjunto de proteínas asociadas y las modificaciones epigenéticas que están en un determinado tiempo en una región genómica constituyen el estado de la cromatina. Dentro de las últimas técnicas de secuenciación, ahora es posible detectar las interacciones de la cromatina y su accesibilidad. A continuación describiremos las últimas técnicas para evaluar la accesibilidad del DNA de alto orden y de orden primario.

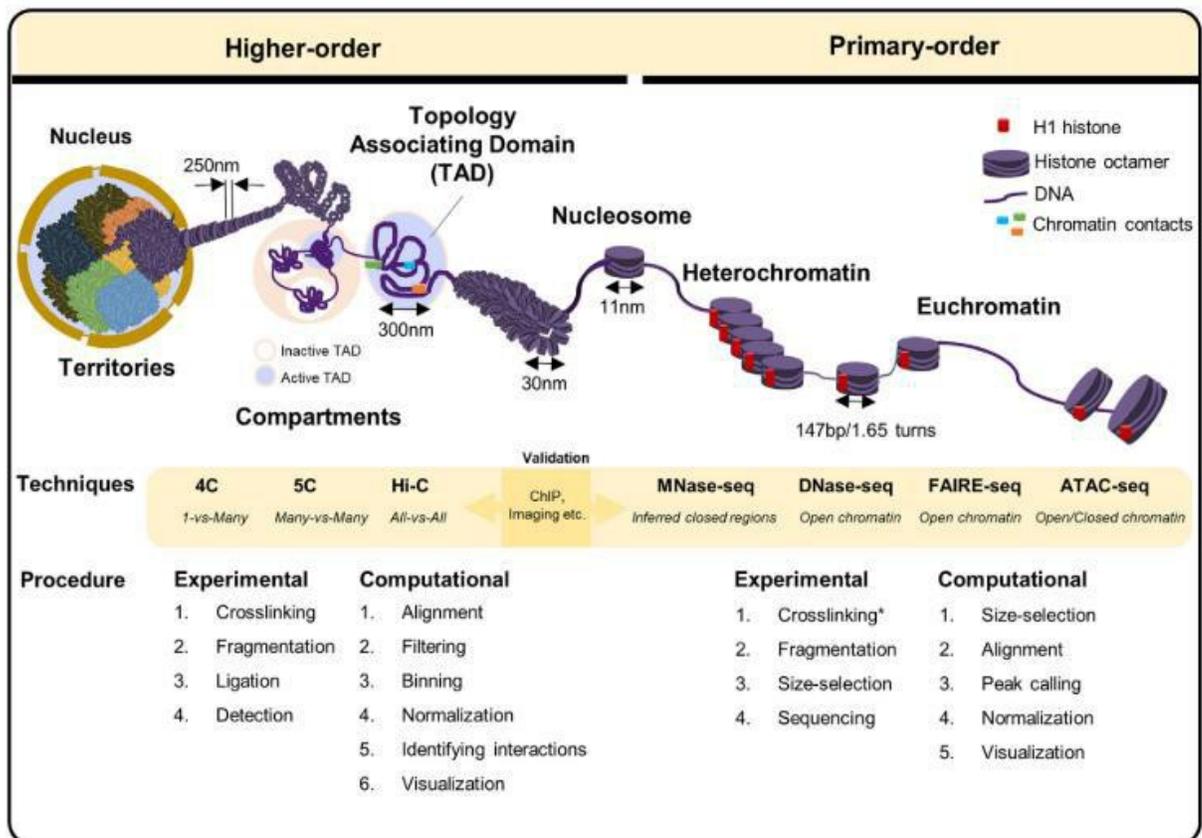


Figura 26. Organización del genoma en eucariontes de ordenes altos a ordenes primarios. Características de la organización de la cromatina de alto orden al primario. Técnicas experimentales y procedimientos computacionales para el acceso a la jerarquía de la cromatina. Los círculos activos representan TADs ricos en genes y muestran replicación temprana. Los círculos inactivos representan TADs que tiene muy pocos genes y muestran replicación tardía (Chang et al., 2018).

Para la estructura de alto orden de la cromatina, se comenzaron a utilizar microscopios de alta resolución de 50-100 nm, revelando la forma y distribución de los cromosomas en las células pero fallaban en proveer más detalle de la interacción espacial. El desarrollo del microscopio electrónico y la fluorescencia de la hibridación in situ proporcionaron evidencia de los territorios cromosomales y compartimientos, la organización de los TADs y la organización no azarosa de los loci genómicos dentro de la periferia nuclear. En la década pasada, diversos métodos basados en captura (3C) de la conformación del cromosoma permitieron la detección de las estructuras de alto orden. El método convencional 3C determina las interacciones físicas de la cromatina entre las regiones genómicas. Para poder hacer este tipo de experimentos, típicamente se tratan las células con formaldehído para fijar los contactos in vivo, se fragmenta el DNA por enzimas de restricción y se ligan los extremos digeridos. La selección de las enzimas de restricción depende del tamaño del fragmento a analizar, por lo general es un tamaño pequeño de 10-20 Kb. Esto permite ligar regiones de DNA que se encuentran muy cercanas entre sí, aunque de una manera lineal estén muy alejadas, o incluso pertenezcan a otros cromosomas. Para ver estas interacciones, se pueden secuenciar estas regiones ligadas de DNA o si se sospecha de una interacción particular, por ejemplo entre un potenciador y genes a distancia, se pueden evaluar por PCR, que después de la ligación, se encontrará en un solo fragmento. Recientemente, se han descrito tecnologías basadas en 3C, como son 4C, 5C y Hi-C (Chang et al., 2018), donde incorporan a la nueva generación de

secuenciación para caracterizar todas las TADs a lo largo del genoma y de una manera cuantitativa, tanto para para intra(cis)interacciones como para inter (trans)interacciones cromosomales .

Las funciones celulares están reguladas también en la escala primaria de la organización de la cromatina. La compactación de la cromatina está determinada por la densidad de los nucleosomas. Las regiones genómicas con nucleosomas densos son altamente empaquetados, mientras que las regiones depletadas tienen más accesibilidad para las interacciones con reguladores, considerándose las ubicaciones principales de las regiones regulatorias del genoma. Los métodos más recientes utilizados para analizar estas regiones de accesibilidad de orden primario son MNasa-seq, DNasa-seq, FAIRE-seq y ATAC-seq.

La técnica de MNasa-seq consiste en la utilización de una endo-exonucleasa (MNasa) que corta el DNA ligado entre los nucleosomas, resultando en secuencias de DNA unidas a nucleosomas. Las regiones de DNA con una alta densidad de lecturas de MNasa-seq representan a la cromatina altamente empaquetada o cerrada. Este método es elegido para proveer información acerca del posicionamiento del nucleosoma a lo largo del genoma (Chang et al., 2018). La técnica de DNasa-seq fue desarrollada para identificar las regiones de cromatina abierta, con base en la hipersensibilidad de la endonucleasa DNasa I en regiones accesibles del genoma. La digestión de la endonucleasa se da en regiones abiertas que no están protegidas por nucleosomas, que son cortadas en fragmentos menores a 150 pb. Este método basado en enzimas puede emplearse para identificar factores transcripcionales unidos al DNA usando librerías con fragmentos de tamaño de un nucleosoma hasta 25 pb que facilitan la identificación de los nucleosomas y los sitios de unión de los FTs (Chang et al., 2018). La técnica de FAIRE (elementos regulatorios de aislamiento asistido por el formaldehído)-seq es un método para identificar regiones abiertas en el genoma. El DNA es entrecruzado a los nucleosomas usando formaldehído, que es subsecuentemente removido

con la extracción de fenol-cloroformo. El DNA restante, libre de proteínas, se secuencian y proporciona las regiones accesibles. Este procedimiento es simple pero tiene una baja resolución, debido a una alta relación entre la señal y el ruido (Chang et al., 2018). En la siguiente sección describiremos la técnica de ATAC-seq con más detalle, ya que se utilizó en el presente estudio.

ATAC-seq

Para revelar las regiones accesibles de la cromatina en tiempo real a lo largo del genoma, se creó el método llamado ensayo de accesibilidad a la cromatina por transposasa (ATAC-seq), el cual identifica regiones de la cromatina abiertas (Figura 27).

El ATAC-seq utiliza la transposasa Tn5 y el DNA transponible como adaptadores, la Tn5 corta en fragmentos el DNA de las regiones abiertas de la cromatina y permite introducir el adaptador dentro de la cromatina accesible. Después del corte, Tn5 inserta las secuencias del adaptador dentro de los sitios integrados, eliminando los pasos de ligación adicional antes de la secuenciación.

El principio básico de esta técnica viene de la transposición del DNA, que requiere que la cromatina del sitio de inserción este abierta. La primera parte de la transposición es el corte de este DNA accesible. Posteriormente, la transposasa acarrea secuencias de DNA conocido para ser artificialmente adicionadas a los sitios cortados, que etiquetan cada hebra con secuencias de DNA conocido, para construir una librería para secuenciarse. La transposasa más común utilizada es la Tn5, que puede transponer en la cromatina accesible más frecuentemente que en la cromatina inaccesible. Esta transposasa actúa con un mecanismo de corte y pegado, ya que el transposón

puede ser simultáneamente fragmentado, lo que protege las regiones del DNA con secuencias de adaptadores.

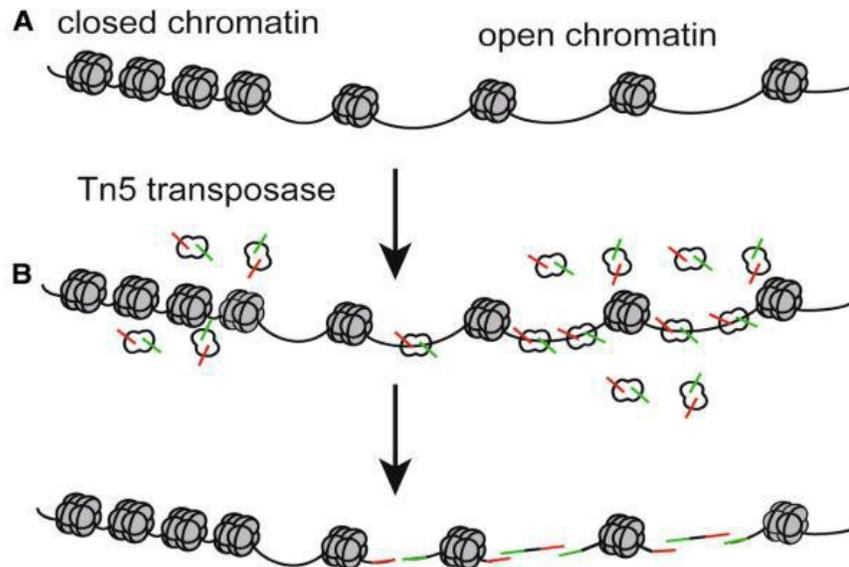


Figura 27. Mecanismo de identificación de accesibilidad de la cromatina usando la transposasa Tn5. A) Cromatina cerrada y abierta, B) Cuando la accesibilidad de la cromatina es incrementada, la transposasa Tn5 se une más en la cromatina abierta que en la cromatina inaccesible. Después la Tn5 corta la cromatina abierta y coloca los adaptadores para generar fragmentos de DNA. El símbolo verde representa el adaptador 1 de la transposasa, mientras que el rojo representa el adaptador 2 (Sun et al., 2019).

La construcción de las librerías del ATAC-seq consiste en tres pasos (Figura 28). El primer paso, es la generación de núcleos crudos en células frescas (Figura 28A). El segundo paso consiste en la reacción de transposición para fragmentar el DNA (Figura 28B). Finalmente, el DNA transpuesto es amplificado para generar las librerías para la secuenciación (Figura 28C). La reacción de transposición de la enzima a la cromatina de la muestra es el paso clave del experimento de ATAC (Sun et al., 2019).

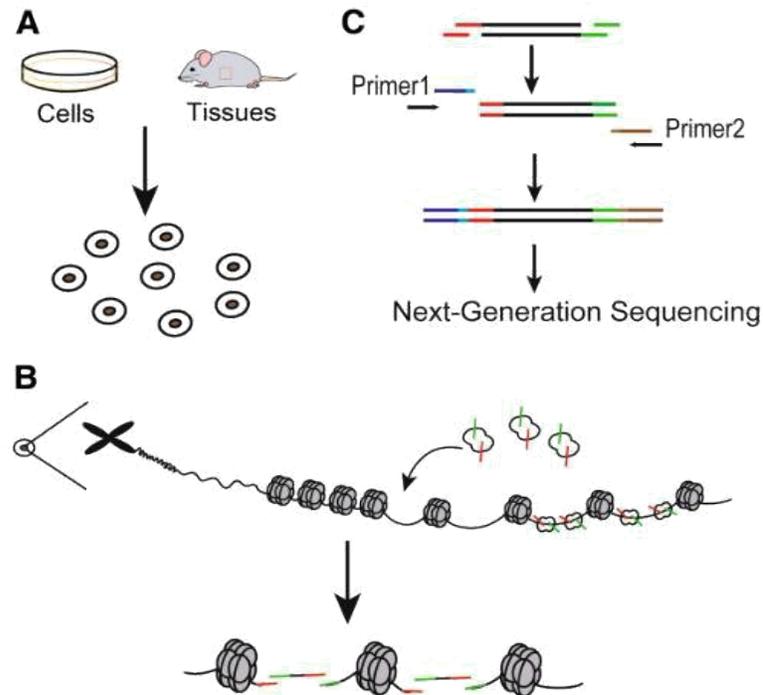


Figura 28. Los principales pasos del procedimiento del ATAC-seq. A) Preparación de los núcleos: las células blancas son lisadas en el buffer de lisis para colectar los núcleos. B) Reacción de Transposasa: Se adiciona la transposasa Tn5 para la tagmentación del DNA genómico. El símbolo verde representa el adaptador 1 de la transposasa y el rojo representa al adaptador 2. C) Amplificación por PCR: El primer 1 y 2 del PCR son utilizados para generar la librería para la secuenciación. El primer 1 y 2 son dos primers universales de PCR, que capturan fragmentos con una longitud especial y adiciona los códigos de barra apropiados para la secuenciación (Sun et al., 2019).

Además de ser un procedimiento sencillo, el ATAC-seq generalmente requiere de dos a cuatro veces menos células o tejidos en comparación con otros métodos de evaluación epigenéticos. La mayoría de los experimentos de ATAC-seq se realizan en células frescas, sin embargo recientemente se informó que la fijación con formaldehído no afecta la eficiencia de la tagmentación de la Tn5 en núcleos intactos (Chang et al., 2018). Para los experimentos de ATAC-

seq son requeridas alrededor de 50,000 células frescas, opuesto en otras técnicas como son MNasa-seq o DNasa-seq que se requieren de 10^6 - 10^7 células (Sun et al., 2019). Las diferentes aplicaciones del ATAC-seq han avanzado la comprensión de la maquinaria de la regulación de la expresión de los genes, como son la accesibilidad a la cromatina entre diferentes muestras, el posicionamiento de nucleosomas, los sitios de unión a lo largo del genoma de los factores transcripcionales. El ATAC-seq nos ayuda a revelar el paisaje de la accesibilidad de la cromatina, la relación que existe con las modificaciones epigenéticas en el desarrollo embrionario, en la tumorigénesis y en los potenciales biomarcadores de enfermedades (Sun et al., 2019). La alta resolución y la pequeña cantidad de muestra requerida hace al ATAC-seq una excelente herramienta para analizar el perfil de accesibilidad del genoma.

Factores transcripcionales

Los factores transcripcionales (FTs) son reguladores clave para la regulación de la expresión de genes, son heterogéneos estructural y funcionalmente y pueden clasificarse en 4 categorías, que se describirán a continuación.

La clase A de FTs controlan la expresión de genes housekeeping, estos FTs son expresados en todas las células, operan en promotores abiertos, que se caracterizan por ser ricos en islas CpG. Algunos ejemplos, de estos FTs son proteína específica 1 (SP1), Yin Yan 1 (YY1), Factor Respiratorio Nuclear 1 (NRF1) y la familia de FTs con dominios ETS (ELF)(Pope & Medzhitov, 2018).

Los FTs de la clase B, también llamados genes de respuesta primaria, son dependientes de señales intracelulares. Están presentes en las células no estimuladas en un estado inactivo o latente

hasta recibir las señales estimuladoras. Estas señales pueden ser sensores intracelulares (por ejemplo, Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)), receptores membranales (por ejemplo, receptores tipo toll), ligandos específicos (por ejemplo, hormonas esteroideas, citocinas, lípidos). Una vez activados, éstos pueden activar o reprimir a sus genes blanco. Algunos ejemplos de estos FTs, son factor de respuesta a suero (SRF), el factor elemento de unión de respuesta a cAMP (CREB), Factor Nuclear relacionado a Eritrocitos 2 (NRF-2), Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B (NF-kB), el Factor Nuclear de células T activadas (NFAT), la familia de proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (STATs), factor transcripcionales SMADs (abreviación en inglés de small Moters against Decantaplegic), proteína de tumor 53 (p53) y algunos receptores nucleares (Pope & Medzhitov, 2018).

Para los FTs clase C, su expresión es inducida por FTs de clase B, por lo que son llamados genes de respuesta secundaria, porque la inducción transcripcional de sus genes depende de la síntesis de nuevas proteínas. Se clasifican en 3 subclases: Los FTs clase C1, son inducidos en algunos tipos celulares por señales de amplio rango como son las fosforilaciones o a nivel de su expresión. Ejemplos de estos factores transcripcionales son c-Fos, FosB, JunB, c-Myc y ERG1 (Pope & Medzhitov, 2018). Los FTs clase C2, son inducidos por señales específicas y regulan la expresión de un pequeño grupo de genes especializados en una particular función. Un ejemplo de estos FTs son los de la familia E2F, que son inducidos por señales mitogénicas y regulan genes de ciclo celular. Los FTs de clase C3, son inducidos transcripcionalmente solamente en tipos celulares específicos, donde regulan la expresión de genes especializados para estas células. Un ejemplo de esta clase de FTs es C/EBPS en macrófagos (Pope & Medzhitov, 2018).

Los FTs de clase D, son FTs restringidos a linajes que controlan la diferenciación celular y expresión de genes específicos de un tipo celular. Estos trabajan en pares antagónicos, por lo que dos FTs de clase D en una célula progenitora suprimen la expresión mutua, promoviendo un destino celular y suprimiendo el destino alternativo. Algunos ejemplos de esta clase de FTs, son MyD, que participa en la diferenciación a Miocitos o Pax5 que participa en la diferenciación a células B (Pope & Medzhitov, 2018).

Los Factores Transcripcionales participantes en la regulación del epigenoma

El control de la expresión de genes no solamente depende de la unión de Factores transcripcionales específicos a las secuencias blanco del DNA, también depende de la accesibilidad a la cromatina que es controlada por el propio empaquetamiento de los nucleosomas dentro del núcleo. Los factores transcripcionales pueden interactuar con diferentes complejos modificadores de la cromatina, que pueden actuar como coactivadores que desplazan nucleosomas o modifican covalentemente a las histonas para que el DNA sea más accesible (Brettingham-Moore et al., 2015). También estos modificadores de la cromatina pueden tener función como correpresores, favoreciendo el cierre de la cromatina.

Existen dos tipos de modificadores de la cromatina en base a su mecanismo de acción: los modificadores de histonas y los complejos de remodelamiento de nucleosoma dependiente de ATPasa. Los modificadores de histonas son los responsables de la amplia variedad de modificaciones covalentes en las histonas. Entre estos modificadores de histonas encontramos a las metiltransferasas, acetilasas, fosfatasas y cinasas de histonas (T. Zhang et al., 2015). La segunda clase de modificadores de la cromatina, son los remodeladores tipo ATPasa, que pueden afectar directamente el grado de compactación de la cromatina por reposición o desplazamiento de los nucleosomas a lo largo del DNA. Como se han descrito en el tema de “Regulación de la

expresión génica por el epigenoma”, estos remodeladores dependientes de ATP se clasifican en 4 familias: SWI/SNF, ISWI, CHD y INO80 (Kadonaga, 1998).

Los modificadores de la cromatina son reclutados por factores transcripcionales para ser guiados a sus regiones blanco, ya que los factores transcripcionales proveen los dominios de unión a secuencias específicas del DNA. Por ejemplo, las acetiltransferasas pueden interactuar con el factor transcripcional basal (TAFII250), que es una de las subunidades del factor transcripcional II D (TFIID), que forma parte del complejo de la RNA polimerasa II en la transcripción de genes. Estas enzimas también pueden interaccionar con otros coactivadores como GCN5, p300/CBP y P/CAF, que a su vez se asocian con FTs (Kadonaga, 1998). Otros factores transcripcionales que interaccionan a través del complejo Polycomb con las metiltransferasas de histonas son OCT4 y NANOG (Kadonaga, 1998). También se ha observado al factor transcripcional RUNX1, que interacciona con acetiltransferasas de histonas como CBP y p300, que potencian la activación transcripcional de RUNX1, permitiendo la transcripción de sus genes blancos (Brettingham-Moore et al., 2015). Estos y otros ejemplos, que se describirán más adelante, nos hablan de como los factores transcripcionales pueden modificar el paisaje de la cromatina por la interacción de los diferentes modificadores de histonas.

Mecanismos epigenéticos en los linfocitos T CD8⁺

Las células del sistema inmune deben estar preparadas ante la presencia de diferentes estímulos, que provocan cambios en la expresión de diferentes genes, que conducen a la activación y diferenciación celular. Para que estos genes puedan silenciarse o expresarse deben ser regulados por diferentes mecanismos epigenéticos, que describimos anteriormente.

La expresión de los genes de los linfocitos T CD8⁺ no son la excepción, estos también son regulados por diferentes mecanismos epigenéticos. Cada etapa del desarrollo de las células T está definido por su programa epigenético. Uno de los estudios en los que se detectaron mayores cambios en la accesibilidad de la cromatina es durante la maduración de los timocitos, en la transición de DN2 a DN3 (doble negativas 2 y 3)(Henning et al., 2018). También el gen del correceptor CD8 es controlado por la metilación del DNA, en dos sitios de Enhancer E8I-E8V y E8II-E8V (Morales-nebreda et al., 2018). En la diferenciación de las células CD8, CD8a mantiene la marca H3K4me3, mientras que la H3K27me3 reaparece en el locus de CD8a en células CD4 positivas, por lo que la transcripción de este locus es reprimida (Henning et al., 2018).

Así también, las diferencias epigenéticas se pueden observar durante la diferenciación de células T CD8⁺ vírgenes en células efectoras. La comparación de metilomas del DNA de células T vírgenes y efectoras durante la infección del virus de la coriomeningitis linfocítica, identificó diferencias entre las regiones metiladas entre los dos estados de diferenciación de las células T CD8⁺, donde algunas regiones metiladas diferenciales se muestran enriquecidas en sitios de unión a factores transcripcionales importantes para el desarrollo y función de los linfocitos T, como son STAT3, IRF4, NFATC1, c-JUN, NF B, HIF1A y NR4A1(Scharer et al., 2013). En células T CD8⁺ vírgenes se encontraron marcas represivas (H3K27me3) y permisivas (H3K4me3) en genes relacionados con la proliferación y diferenciación (Schmidl et al., 2018), mientras que la marca H3K4me2 se encontró en genes de funciones efectoras en células vírgenes (Scharer et al., 2013).

Durante la diferenciación de las células vírgenes a células efectoras y de memoria, se encontraron modificaciones asociadas a la activación del linfocito T CD8⁺ como son H3K4me3 y H3K9ac. Estas marcas se pierden mientras que otras se hacen presentes como la metilación del DNA. La marca H3K27me3 se encontró en genes de factores transcripcionales asociados al 97

fenotipo de memoria como son FOXO1, KLF2, LEF1 y TCF7, cuya expresión esta disminuida en células T CD8⁺ efectoras. Alternativamente, los genes de factores transcripcionales asociados al fenotipo efector como son TBX21 y PRDM1 y genes asociados a funciones efectoras como son GZMA, GZMB, PRF1, IFNG y KLRG1 tienen disminuidas las marcas represivas e incrementadas las modificaciones de activación en las células T CD8⁺ efectoras (Henning et al., 2018). Asimismo, se encontraron cambios progresivos en la metilación del DNA en genes como CCR7 y SELL en células diferenciadas en los diferentes subtipos de células de memoria, como son células T de memoria tipo célula madre, células T de memoria central y células T de memoria efectora (Henning et al., 2018). Las células T CD8⁺ vírgenes, células T CD8⁺ de memoria central y células T CD8⁺ de memoria efectora mostraron firmas de modificaciones de histonas presentes en estados bivalentes en genes que su expresión es inducida después de la activación de células T, incluyendo BMI1, TBX21, EOMES e IRF4 (Henning et al., 2018).

Antecedentes

El término de epigenética se usó por primera vez por el británico Conrad H. Waddington en el campo de la Biología del Desarrollo (Loison, 2019). Sin embargo los mecanismos moleculares y su implicación en el control de la expresión genética de todas las células sólo se consideró hasta 1996, en que se definió a la epigenética como el estudio de los cambios heredables que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia del DNA.

La importancia de la epigenética en la Inmunología surge con un artículo publicado por el grupo de Richard Flavell en el 2005, donde se explica la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ en los fenotipos Th1 y Th2 por interacciones intercromosomales ((Spilianakis et al., 2005)).

Este fenómeno se explica porque los cromosomas interactúan entre sí, en lo que coloquialmente se llamó “chromosome kisses” o besos cromosomales (Cavalli, 2007). Las regiones de interacción entre los cromosomas son conocidos como dominios de asociación topológicos (TADs). Los eventos de besos entre los cromosomas pueden estar involucrados en la transcripción o el silenciamiento de los genes. Los TADs se pueden asociar con regiones de besos cromosomales activos en la transcripción de genes. Estas regiones son ricas en genes, marcas de cromatina abiertas, factores transcripcionales y sitios de hipersensibilidad a la DNAsa-I (Maass et al., 2019). La expresión de genes que se encuentran en TADs activos son regulados por la accesibilidad de la cromatina a nivel de estructuras de orden primario. Es decir, que son principalmente regulados por complejos proteicos y modificaciones epigenéticas (Chang et al., 2018). Por otra parte, los eventos de silenciamiento en los cuales están involucrados los besos cromosomales están asociados a las proteínas del complejo Polycomb (PcG), que se unen a elementos específicos del DNA llamados elementos de respuesta a PcG (PREs). Los PREs pueden interactuar en regiones TADS a distancia y silenciar la transcripción de genes (Cavalli, 2007).

Esto lo podemos ver reflejado durante la activación de células T vírgenes a través del TCR y receptores de citocinas, que activan a diferentes factores transcripcionales que se unen a regiones regulatorias de genes de citocinas, ya que proporcionan los dominios de unión al DNA. Esto permite dar la dirección en el genoma donde estos factores transcripcionales atraen a complejos remodeladores de la cromatina que promueven o silencian la expresión de los genes, aumentando o disminuyendo la accesibilidad de las regiones reguladoras.

Los complejos remodeladores de la cromatina y los factores transcripcionales que llevan estos cambios epigenéticos en las regiones regulatorias cis, son determinantes en la diferenciación de células Th. Se ha reportado que un sitio de hipersensibilidad localizado en el *enhancer* del gen

IL4 y otro sitio de hipersensibilidad a DNasa-I en el intrón del locus de *ifng*, son importantes para la diferenciación de las células Th hacia Th1 o Th2 (Ansel et al., 2003). Estos sitios son relevantes por que se ha observado la correlación entra la presencia del factor transcripcional NFAT y la sensibilidad a la digestion por la DNasa I en estos sitios después de la estimulación con el TCR (Ansel et al., 2003). En la diferenciación hacia Th2, p300, GATA3 y la helicasa con cromodominio de unión a DNA 4 (Chd4) forman un complejo transcripcional en el loci de las citocinas Th2 y activan la expresión de las mismas, mientras que reprimen la expresión de IFN (A. Wang et al., 2019). La diferenciación hacia el fenotipo Th1 es dependiente de la activación del factor transcripcional STAT4 y el efecto que STAT4 tiene en sus genes blanco. Esta diferenciación esta limitada por la DNMT3a, que suprime la expresión de genes antivirales relacionados con el perfil Th1 por la metilación en sus regiones promotoras, lo que habla de una regulación muy fina de la diferenciación en células efectoras (A. Wang et al., 2019).

Algunos otros ejemplos de la interacción de los factores transcripcionales y remodeladores de la cromatina en los linfocitos T son: La diferenciación en el linaje de células T CD8⁺ en lugar de CD4⁺ se debe al reclutamiento de la G9a N-metiltransferasa de lisina 2 que es reclutada por los factores transcripcionales Runx1 y Runx3 en los genes que se deben silenciar (A. Wang et al., 2019). La expresión de una de las proteínas importantes en la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺, Granzima B, se regula por la interacción entre el factor transcripcional CREB1, el coactivador p300 y el dominio de Notch2, que remodelan este gen para ser expresado (A. Wang et al., 2019).

En un estudio transcripcional de linfocitos T CD8⁺ neonatales realizado en el laboratorio, se encontraron factores transcripcionales sobreexpresados en los linfocitos T CD8⁺ neonatales, y que pudieran estar relacionados con el paisaje epigenético único de los linfocitos T CD8⁺

neonatales (Galindo-Albarrán et al., 2016). Entre ellos se encuentran los factores transcripcionales asociados a la vía canónica de Wnt TCF1 y LEF1. En una primera aproximación a la implicación de esta vía en la baja actividad de las células neonatales, evaluamos dentro de los genes sobreexpresados en los linfocitos T CD8⁺, aquellos que tenían motivos de unión a TCF1/LEF1. Se encontró en el laboratorio que al menos 58 de estos genes contenían al menos dos motivos de unión para TCF1/LEF1 en sus promotores (Pedroza-Ocampo, 2014). Otro estudio realizado en el laboratorio mostró que al hacer el Knockdown del factor transcripcional TCF1 mediante siRNA, los linfocitos T CD8⁺ neonatales respondían a la activación por el TCR con una mayor expresión de CD69 (marcador característico de células activadas) y una mayor transcripción de IL-2 en comparación con las células sólo transfectadas sin siRNA (Castillo, 2016). Un estudio adicional de la implicación de esta vía en la activación de los linfocitos T CD8⁺ neonatales arrojó que algunas proteínas de los complejos proteicos reclutados por β -catenina son diferentes en las células neonatales y de adulto. Estas proteínas pudieran ser las responsables de llevar a las células neonatales a tener un alto umbral de activación y mantenerlas en proliferación homeostática sin diferenciarse (Hernández-Acevedo et al., 2019).

En estudios realizados en linfocitos T CD8⁺ de ratón, se ha reportado que el factor transcripcional TCF1 tiene actividad de desacetilasa de histona. Esta función de desacetilasa de histona silencia la transcripción de genes que participan en funciones efectoras de los linfocitos T CD8⁺, a menos que TCF1 interactúe con otras proteínas, como CBP o p300 asociadas con β -catenina, que permiten la transcripción de los genes blanco (Xing et al., 2016). También se ha observado que ambos factores transcripcionales LEF y TCF pueden asociarse con diferentes modificadores de la cromatina; ya es el caso de la asociación de TCF1/LEF1 con su correpresor GROUCHO, este último tiene asociación con las DNA metiltransferasas 3A y 3B (DNMT3A Y

DNMT3B) (Sanjeevkumar et al., 2013), que participan en la metilación del DNA. Así como también con las metilasas de histonas SUV39H1/2 y EZH2, involucradas en el silenciamiento y transcripción de diversos genes (Sanjeevkumar et al., 2013)..

Otros factores transcripcionales potencialmente importantes pudieran también estar participando en el transcriptoma único de las células neonatales, por lo que en este proyecto nos preguntamos como una primera aproximación ¿Cuál o cuáles motivos de unión a factores transcripcionales se encuentran en los promotores de genes característicos de los linfocitos T CD8⁺ neonatales?

Planteamiento del Problema

Como mencionamos en la introducción de esta tesis, los neonatos no controlan eficientemente infecciones por patógenos intracelulares y paradójicamente tienen procesos inflamatorios exacerbados. Avanzar en la comprensión de los mecanismos responsables del paisaje transcriptómico y epigenético de las células T CD8⁺ neonatales, principales responsables de la eliminación de patógenos intracelulares, es necesario para mejorar la atención a esta población tan vulnerable.

Los perfiles transcriptómicos determinan el fenotipo y función de las células, este proceso es controlado por diferentes factores transcripcionales, los mecanismos epigenéticos y las interacciones con la cromatina. En el sistema inmune, la estimulación celular por señales extracelulares, (por ejemplo citocinas, señales a través del TCR), modifica la cromatina a través de la activación de factores transcripcionales específicos y modificadores de la cromatina.

En este capítulo seguimos dos estrategias para caracterizar los motivos de unión a factores transcripcionales que pudieran ser centrales para determinar las redes de regulación responsables de las características únicas del transcriptoma de los linfocitos T CD8⁺.

La primera estrategia consistió en evaluar los motivos de unión a factores transcripcionales en los genes diferencialmente expresados de nuestro estudio anterior, que se agruparon en clústeres de genes con funciones relacionadas entre sí.

En la segunda estrategia, realizamos un estudio global, obteniendo de los estados de la cromatina de las células T CD8⁺ neonatales y de adultos, mediante el análisis de datos crudos de ChIP-seq de marcas de histonas obtenidas del Consorcio Blueprint, para encontrar los motivos de unión asociados a regiones de cromatina abierta o cerrada.

En ambos casos se realizaron validaciones para asegurarnos que los motivos de unión a factores transcripcionales realmente representaban sitios reales. Esto es importante porque se trata de secuencias cortas de DNA, que por simple azar, pudieran encontrarse en la inmensidad del genoma.

La primera validación consistió en hacer un análisis paralelo de datos de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP) de los factores transcripcionales descritos, que se encontraban en bases de datos disponibles en la red. Aunque las células no fueron las mismas, el solapamiento de los datos del ChIP de las bases de datos con un motivo de unión a ese factor, encontrado en nuestro estudio, nos habla de que efectivamente es un sitio de unión al mismo.

La segunda validación consistió en realizar experimentos de ATAC-seq, que permitieron hacer un solapamiento de regiones abiertas de la cromatina, con los motivos de unión encontrados en nuestro análisis, validando así que esos sitios son accesibles a la unión de los FT. Una muesca en

el pico de ATAC-seq, causado por la unión del factor transcripcional se considera como una prueba de que en ese punto se encontraba ese FT al hacer los experimentos de ATAC-seq.

Objetivos del capítulo

Objetivo General:

Encontrar y validar los motivos de unión a factores transcripcionales en las regiones del DNA características de las células neonatales.

Objetivos Particulares:

- Identificar y validar los sitios de unión de factores transcripcionales en los Clústeres de Genes diferencialmente expresados entre las células de neonatos y adultos previamente identificados.
- Definir y validar las regiones regulatorias diferentes en linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos mediante la identificación de motivos de unión a factores transcripcionales que se encuentran en distintos Estados de la Cromatina, característicos de las células T CD8⁺ neonatales y de adultos.
- Analizar el enriquecimiento funcional de las regiones regulatorias de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos

Hipótesis:

Encontraremos diferencias en los motivos de unión a factores transcripcionales en los distintos clústeres de genes y de regiones de la cromatina que nos arrojaran información sobre las posibles vías de señalización que llevan al perfil único de transcripción y paisaje epigenético de las células T CD8⁺ neonatales.

Metodología

Metodología Experimental:

Purificación de Linfocitos T CD8⁺ vírgenes

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de adultos sanos y sangre de cordón umbilical de neonatos de término sanos, nacidos por parto vaginal. Esta sangre se obtuvo por convenio con el Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea y el Hospital “José G. Parres” de Cuernavaca. Se realizó la separación de células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs) de adultos y de las células mononucleares de sangre de cordón (CBMCs) de neonatos mediante gradiente de Ficoll. Este paso fue seguido de un paso de adherencia a plástico, para la eliminación de los monocitos. Se eliminaron las células que no eran Linfocitos T CD8⁺ mediante el kit de RosetteSep™ Human CD8⁺ T Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies; California, USA). Después, se eliminaron las células de memoria en las células de adultos por selección negativa mediante una mezcla de anticuerpos, 1 µg de anti-CD45RO (UCH-L1, TONBO biosciences; California, USA) y 1 µg de anti-CD44 (IM7, TONBO biosciences; California, USA) asociados a esferas magnéticas unidas a proteína A/G (Protein A/G magnetic Dynabeads® (10mg/mL, Thermo Fisher Scientific; Massachusetts, USA)). Para las células neonatales, se

eliminaron las células contaminantes con perlas magnéticas unidas a proteína A/G acopladas a 0.5 µg de anticuerpo anti-CD11b (ICRF44, TONBO biosciences; California, USA). El análisis de la pureza de los Linfocitos T CD8⁺ vírgenes de adultos y neonatos se realizó rutinariamente en todas las muestras mediante citometría de flujo (Anexo 1).

ATAC-seq:

Para la realización de esta técnica se partió de 5×10^4 células T CD8⁺ vírgenes de neonatos o adultos. Las muestras se separaron en dos tubos que se centrifugaron y lavaron con PBS frío. Después el pellet fue resuspendido en Buffer de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.1% IGEPAL CA-630), para después lavar los núcleos con PBS. Se observó la integridad de los núcleos obtenidos en el microscopio, posterior se descartó sobrenadante y se resuspendió el pellet en el mix de reacción de transposición (Buffer TD, Nextera Transposasa Tn5, H₂O libre de nucleasas) (Illumina Cat #FC-121-1030). Se incubó a 37°C durante 30 min. Después de los cuales se purificó el DNA en columnas (GeneAll) (J. Buenrostro et al., 2016) (Anexo 2). Se eluyó el DNA en Buffer de elución, se terminaron las librerías pair-end y se secuenció en un secuenciador Illumina NextSeq 500 sequencer.

Extracción de RNA y síntesis de cDNA:

Se obtuvo el RNA de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos por el método de Trizol (solución monofásica de fenol, isocianato de guanidina, Life Technologies ®), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de RNA fue con kits de intercaladores fluorescentes de Qubit (Qubit™ RNA Assay Kit, 100 assays (Q32852), Invitrogen) para el equipo Qubit (Life

Technologies). Para comprobar la calidad del RNA, se evaluó su integridad mediante gel de agarosa 1%. Se realizó la síntesis de cDNA usando oligo-dT y la reversa Transcriptasa RevertAid (EP0441, Thermo Fisher Scientific) (Anexo 3).

PCR-tiempo real:

Se amplificaron las secuencias de DNA mediante la técnica de SYBR Green en un equipo de PCR en tiempo Real StepOne (Life technologies). Los datos se analizaron mediante curvas de amplificación para cada región.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico, se utilizó el programa GraphPad Prism 5. Los datos fueron evaluados usando la prueba de U de Man-Whitney para datos no pareados. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$.

Metodología Bioinformática:

Definir Regiones Regulatorias:

Para definir las regiones regulatorias de las células T CD8⁺, se utilizaron datos de ChIP-seq obtenidos del consorcio Blueprint, que corresponden a 6 diferentes marcas de histonas de 3 réplicas biológicas de células T CD8⁺ vírgenes de neonatos y 3 más de células vírgenes de adultos humanos. 3 de estas 6 marcas están asociadas a apertura de la cromatina H3K4me3, H3K27ac y H3K36me3, una asociada a *enhancers* como es H3K4me1 y 2 marcas relacionadas a cierre de la

cromatina H3K27me3 y H3K9me3. Las regiones regulatorias en los linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos se definieron utilizando los siguientes pasos:

Procesamiento de Datos:

Se realizaron diferentes mini programas para sistematizar el análisis de los datos, esto lo realizamos con scripts hechos con el lenguaje R y básicamente contenían los análisis que se describen a continuación.

Calidad de Datos FASTQC:

Se utilizó el programa FastQC (*Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*, 2018), para el análisis de la calidad de cada uno de los datos. Estos correspondieron a cada una de las 6 diferentes modificaciones de histonas utilizadas en este proyecto. FastQC nos ayuda a checar la calidad de los datos fastq por el puntaje de calidad que esta codificado en código ASCII, guardado en este tipo de archivo. Este análisis nos sirve para saber qué tan buenos son nuestros datos y que tan confiables son las lecturas que se hicieron durante la secuenciación. Se evaluó la calidad de los datos fastq antes y después de cortar (trimming) de los datos de mala calidad y adaptadores, esto nos sirvió para saber si las calidades de nuestros datos mejoraron al remover la mala calidad

Remover Mala Calidad

Después de que se observó la calidad que tienen cada uno de los datos fastq, se procedió con el rasurado de las lecturas con el programa Trimmomatic (Bolger et al., 2014), esto nos permitió eliminar adaptadores y parte de la secuencia de mala calidad.

Alineamiento del Genoma:

Se alinearon las lecturas contenidas en los archivos fastq con la nueva versión del genoma humano (hg38). Esto se realizó con el programa Bowtie2 (Langmead and Steven L Salzberg, 2013). Este programa nos permitió obtener los picos correspondientes a las señales de cada una de las marcas epigenéticas.

Calidad de Alineamiento:

Se utilizó el programa realizado con el lenguaje python, autoría de la Dra. Alejandra Medina, el cual considera las métricas de calidad de ENCODE (Landt et al., 2012), que nos ayudan a observar la calidad de nuestro alineamiento y si este fue bueno. Esto nos permitió elegir los archivos que tenían un buen alineamiento y desechar los que no.

Peak Calling:

Este programa nos ayuda a definir las lecturas de los datos de secuenciación sobre el genoma de referencia. Una vez que se realizó el mapeo de los datos con respecto al genoma y que estos pasaron todos los filtros de calidad, se definió la señal de enriquecimiento de cada una de las marcas epigenéticas con el programa MACS2 (Y. Zhang et al., 2008) versión 1.4.2. Con este 109

programa obtuvimos los archivos “BED”, que contienen a los picos correspondientes a las señales de enriquecimiento de cada una de las marcas de histonas. Los picos representan el número de lecturas en cada región del genoma.

Reproducibilidad entre las réplicas:

Una vez obtenidos los picos de lectura, evaluamos la reproducibilidad de cada uno de los picos en las 3 réplicas biológicas, esto lo hicimos mediante el programa Irreproducible discovered rate (IDR, siglas en inglés) (Landt et al., 2012).

Visualización de los Picos:

Para la visualización de los picos correspondientes a la presencia de cada una de las marcas epigenéticas se utilizó el programa de UCSC Genome Browser (Kent et al., 2002) .

Definiendo Estados de la Cromatina:

A partir de los archivos de alineamiento “ BAM” de las distintas marcas epigenéticas, se obtuvieron las regiones regulatorias diferentes en los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos con el programa ChromHMM (Ernst & Kellis, 2012), el cual se basa en un modelo de Markov Hidden Multivariable que modela la presencia o ausencia de una marca de cromatina, definiendo así los diferentes estados de la cromatina a partir de los datos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP-seq) de las distintas marcas epigenéticas con las que contamos. Cada estado de la cromatina nos permitió definir un *enhancer* o un promotor en estado activo, inactivo o con marcas de apertura y cierre, lo que comúnmente se denomina *poised*.

Procesamiento de Datos:

Para realizar un análisis más preciso de las regiones regulatorias, generamos los datos de ATAC-seq de 3 replicados biológicos de células T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos. Se realizaron los siguientes pasos para el análisis de datos de ATAC-seq:

Utilizamos el programa FastQC (*Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*, 2018), el cual permite determinar la calidad de los datos en formato fastq obtenidos del ATAC-seq por el puntaje de calidad que está codificado en código ASCII. Se evaluó la calidad de los datos fastq antes y después del “trimming” de datos de mala calidad, esto nos servirá para saber si la calidad de nuestros datos mejora.

Después que se observó la calidad que tienen los datos fastq y se procedió con el rasurado de las lecturas de mala calidad y adaptadores con el programa Trimmomatic (Bolger et al., 2014).

Se alinearon las lecturas contenidas en los datos fastq del ATAC-seq que fueron obtenidos del programa Trimmomatic. Este alineamiento se hizo con respecto a la nueva versión del genoma humano (hg38), sirviéndonos del programa Bowtie2 (Langmead and Steven L Salzberg, 2013).

Se utilizó la paquetería de bioconductor ATACseqQC (Ou et al., 2018) para observar la calidad de nuestro alineamiento y si este fue bueno. Esto nos permitió observar otro parámetro de calidad que es el tamaño del fragmento y así elegir los archivos que tenían un buen alineamiento y desechar los que no.

Para la visualización de los picos correspondientes a la presencia de las regiones abiertas de la cromatina se utilizó el programa de Genome Browser (Kent et al., 2002).

Para el llamado de picos, utilizamos los datos mapeados que tenían buena calidad en el alineamiento, utilizamos el programa MACS 2 (Y. Zhang et al., 2008) versión 1.4.2, para realizar el llamado de picos del ATAC-seq.

Se tomaron los datos de los picos de los estados de la cromatina que pertenecían a regiones regulatorias asociadas a apertura de la cromatina obtenidos con el programa ChromHMM, junto con los datos de los picos del ATAC-seq de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos, se realizó la unión de los picos que sobrelapaban entre ambos tipos de datos, esto se hizo con el programa beedtools versión 2.7.1.

Se obtuvieron las regiones promotoras de los genes diferenciales entre linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos que se clasificaron en 10 diferentes clústeres, de acuerdo con datos anteriores del laboratorio. Estas regiones promotoras fueron obtenidas de la paquetería biomaRt, se consideraron los promotores con una longitud de 2000pb río arriba del TSS y 1000pb río abajo del TSS.

Se realizó la búsqueda de los motivos de unión de los factores transcripcionales que estuvieran en cada uno de los estados de la cromatina (tomando como background los estados de la cromatina de adulto o neonato). Así definimos las regiones únicas, activas, inactivas o *poised* de la cromatina de linfocitos T CD8⁺ y en las regiones promotoras (2000 pb upstream, 1000pb downstream) de los clústeres de genes diferenciados en linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos (Galindo-Albarrán et al., 2016). Para realizar esta búsqueda, utilizamos el programa peak-motifs de RSAT, que a partir de Matrices de posición de los Factores Transcripcionales (FTs), construye una matriz de posición en una región dada, el cual después relaciona esta matriz de posición con otras matrices de posición de diferentes FTs almacenadas en diferentes bases de datos. Así nos

arroja los Factores Transcripcionales más probables, que pudieran estar relacionados con esa matriz de posición.

A partir de las bases de Datos de Matrices de Posición de FTs Hocomoco (Base de Datos de Matrices de Humanos), Jasper (Base de Datos de Matrices de Vertebrados) y CisBPHuman (Base de Datos de Matrices de Humanos) se obtuvieron las Matrices de Posición de los Factores Transcripcionales.

Los motivos de los FTs utilizados en este análisis se eligieron porque se encontraron relacionados con los diferentes estados de la cromatina, y se encontraron sobre expresados a nivel de mRNA en linfocitos T CD8⁺ de Neonatos o de Adultos.

Se analizaron los diferentes estados de la cromatina de los linfocitos T CD8⁺ neonatales y de adulto, en regiones en las cuales se unieron las regiones activas, inactivas o en estado *poised* de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos y por último las regiones promotoras de los clústeres de genes diferenciales en linfocitos T CD8⁺.

Para observar que tan enriquecido se encuentra la Matriz del factor transcripcional, utilizamos el programa Matrix-Enrichment de RSAT. Este programa identifica los sitios de unión de factores transcripcionales que pueden estar enriquecidos o depletados en uno o diferentes sets de secuencias de DNA.

En las regiones regulatorias únicas en linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos, se realizó la búsqueda de genes cercanos a estas regiones y la vía de señalización al cual está relacionado. Esto se realizó con el programa GREAT. Sin embargo, para el uso de este programa fue necesario, cambiar la versión del genoma de los archivos, ya que el programa solo trabaja con la versión hg19 del genoma humano. Esto lo realizamos con el programa UCSC LiftOver utility.

Para el solapamiento de los datos de ChIP-seq de factores transcripcionales con regiones promotoras y regiones regulatorias, nos basamos en datos de ChIP-seq disponibles en la red. Se obtuvieron los datos de los picos de ChIP-seq de factores transcripcionales como son ATF3, BATF, BCL11A, CTCF, EGR1, EOMES, FOS, FOSL2, GATA1, IKZF1, JUN, JUNB, KLF9, LEF1, MAZ, MEF2A, MYB, NFATC1, NKX3-1, NR4A1, PRDM1, RUNX3, SP1, SP2, SP4, TBET, TCF4 y TCF7 en 10 diferentes líneas celulares GM12878, JURKAT, células Th1, células madre, Células CD34+, K562, HELA, LNCAP, MCF7 y HEPG2 en la base de datos de regiones regulatorias ReMap(Chèneby et al., 2020), estos datos de los picos de ChIP-seq de factores transcripcionales se solaparon con los datos de los picos de regiones regulatorias o con las regiones promotoras de los clústeres de genes diferenciales de linfocitos T CD8+, este solapamiento se realizó con el programa genómico association test (GAT) versión 1.0.(Heger et al., 2013).

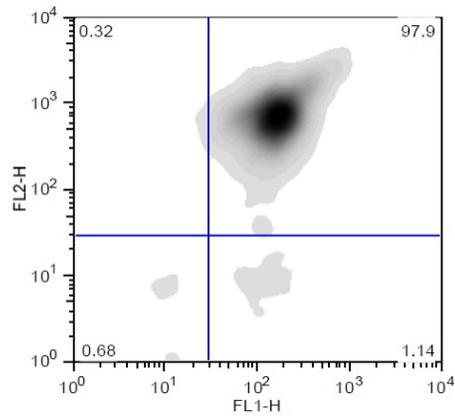
Resultados

Purificación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos

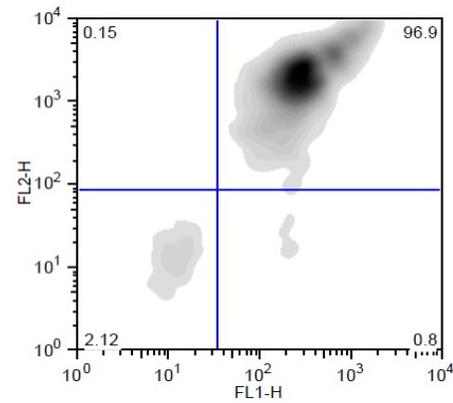
Se purificaron células T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos, que se utilizaron para realizar los experimentos de ATAC-seq, para determinar las regiones abiertas de la cromatina y para realizar ensayos de transcriptoma y pruebas de validación de expresión de genes por RT-qPCR y de inmunoprecipitación de la cromatina.

A)

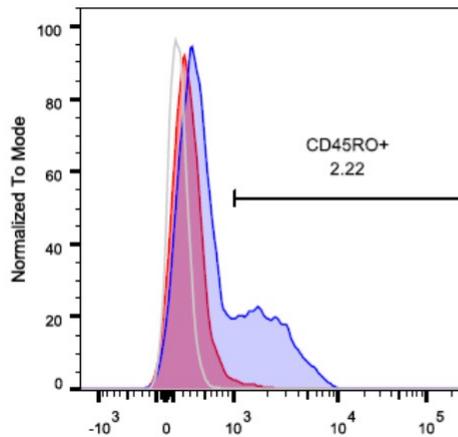
Linfocitos T CD8⁺ vírgenes de Adultos



Linfocitos T CD8⁺ vírgenes de Neonatos



B)



Sample Name	
	Sin teñir
	Linfocitos CD8 ⁺ totales
	Linfocitos CD8 ⁺ vírgenes

Figura 29. Pureza de Linfocitos T CD8⁺ vírgenes de adultos y neonatos utilizados en el ATAC-seq. A) Dot-plots representativos de la pureza de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de adultos (Izquierda) y neonatos (Derecha) utilizados en el ATAC-seq, en el eje horizontal se muestra a CD8-FITC y en el eje vertical a CD3-PE, B) Histograma de CD45RO-FITC de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de adulto (rojo) y de los linfocitos T CD8⁺ antes de eliminar las células de memoria (Células T CD8⁺ Totales, azul) del mismo adulto. Se tiñeron 1×10^6 células y se adquirieron en un citómetro FACs Canto II. Los datos de citometría fueron analizados en el software FlowJo versión X.

Se observaron niveles de pureza arriba del 96% en las células T CD8⁺ de adultos y neonatos (Figura 29A). Se eliminaron las células de memoria en las células de adulto y se midió la expresión del marcador de memoria CD45RO en células de neonatos y de adultos, encontrando una expresión de este marcador por debajo del 5% en ambas poblaciones celulares, con un nivel medio de fluorescencia bajo (Figura 29B). Las células de memoria tienen una expresión alta de este marcador, mientras que las vírgenes tienen una expresión baja o nula. Por lo tanto, concluimos que contamos con un buen nivel de pureza de células neonatales y de adulto vírgenes para todos los ensayos.

Objetivo 1: Definición de los motivos de unión a FT en los promotores de los Clústeres de genes diferencialmente expresados en células T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos.

En un trabajo anterior del laboratorio, encontramos que las células T CD8⁺ neonatales tienen un perfil transcriptómico y epigenómico único, sesgado hacia la inmunidad innata. En particular encontramos 9 Clústeres de genes característicos de las células neonatales y de adultos, a partir de su función en la célula o las vías de señalización en la que participaban.

Estos nueve clústeres son: 1: genes relacionados con especies reactivas de oxígeno (ROS), 2: genes asociados a citotoxicidad, 3: genes asociados a respuesta antiviral, 4: genes asociados a ciclo celular, genes de las vías de señalización del TCR y MAP cinasas (MAPK) sobreexpresados en linfocitos T CD8⁺ de adultos, 5: genes de las vías de señalización del TCR y MAPK sobreexpresados en linfocitos T CD8⁺ de neonatos, 6: genes de factores transcripcionales

sobreexpresados en linfocitos T CD8⁺ de neonatos y los genes de factores transcripcionales sobreexpresados en linfocitos T CD8⁺ de adultos (Galindo-Albarrán et al., 2016) (Figura 30).

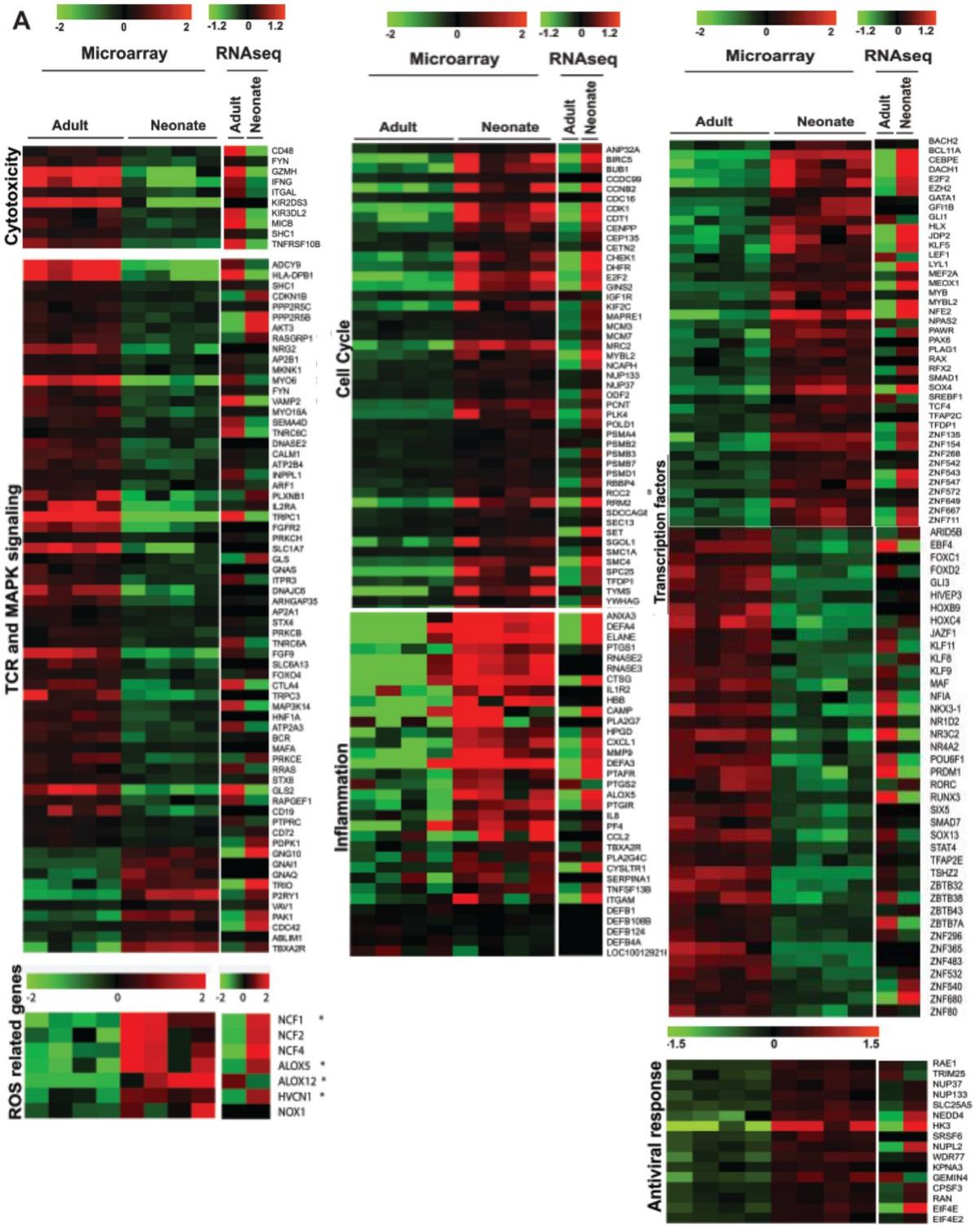


Figura 30. Los 9 clústeres de genes diferencialmente expresado en linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos. Los heatmaps muestran el nivel de expresión de los genes diferenciales entre linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos cuantificados por Microarreglos o por RNA-seq(Galindo-Albarrán et al., 2016).

Adicionalmente, en otro estudio del laboratorio, se reportó un clúster de genes asociados a tolerancia se encontraron sobreexpresados en linfocitos T CD8⁺ de neonato, conservados desde un modelo de tolerancia en ratón (Figura 31) (Santana et al., 2014)



Figura 31. Clúster de genes diferenciales asociados a tolerancia. Heatmap que muestran el nivel de expresión de genes diferenciales entre linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos asociados a tolerancia. Modificado de (Santana et al., 2014).

Partiendo de estos genes y de los factores transcripcionales sobreexpresados en las células neonatales y de adulto, evaluamos a los motivos de unión enriquecidos en los promotores de cada uno de los clústeres.

Se obtuvieron las regiones promotoras de los genes clasificados en los diez diferentes clústeres con el programa BioMart. Estas regiones correspondían a 2000 pb río arriba del TSS y 1000 pb río abajo del TSS. Una vez obtenidas las regiones promotoras de los genes pertenecientes a los diez clústeres, se continuó con los siguientes análisis.

Para encontrar los motivos de unión a FT en las regiones promotoras de los genes diferencialmente expresados, utilizamos la herramienta de peak-motifs de RSAT (Thomas-Chollier et al., 2012). En la tabla 2 se presentan los motivos de unión a FT enriquecidos en cada uno de los clústeres. En la mayoría de los clústeres se encontraron motivos de unión a FT que son miembros pertenecientes a la familia Homeobox tal es el caso de HMGA1 y HXA11, así como también factores transcripcionales miembros de la familia miocito *enhancer* factor (MEF), tal es el caso de MEF2A, MEF2B, MEF2C y MEF2D. Estos factores, que son organizadores generales de la cromatina, no nos arrojan ninguna información sobre las redes de señalización que pudieran relacionarse con el transcriptoma único de las células neonatales, ya que se encontraron tanto en clústeres de neonatos como de adultos.

Cytotoxicity	EVI1, Mecom, HXD12, HBX13, HXC13, HXA11, HMGA1, MEF2C, MEF2A, MEF2B, MEF2D.
TCR and MAPK signaling	KLF13, MECP2, HXA11, HMGA1, MEF2A, MEF2B, MEF2C, MEF2D, ETV2
Adults	

TCR and MAPK signaling Neonates	HXA11, HMGA1, MEF2C, MEF2A, MEF2B, MEF2D, EVI1, Mecom
Inflammation	HXA11, HMGA1, MEF2C, MEF2D, MEF2A, MEF2B
Ros related genes	No match
Transcriptional Factors Neonates	HXA11, HMGA1, MEF2A, MEF2B, MEF2C, MEF2D, MECP2.
Transcriptional Factors Adults	No match
Antiviral Response	HXA11, HMGA1, MEF2C, MEF2D, MEF2A, MEF2B, MECP2, NFATC2, NFAC4, NFAC2, NFAC3, NFAT5
Cell Cycle	KLF13, MECP2, HXA11, HMGA1, MEF2A, MEF2B, MEF2C, MEF2D, ETV2
Tolerance	ZFX, MECP2, NFATC2, NFAC4, NFAC2, NFAC3.

Tabla 2. Factores Transcripcionales relacionados con los motivos nuevos encontrados en las regiones promotoras de los diez clústeres de genes diferencialmente expresados en linfocitos T CD8⁺ de neonato y adulto.

Los únicos FT que si fueron específicos para las células neonatales fueron miembros de la familia NFAT, que se encontraron en el clúster de Respuesta Antiviral y Tolerancia. Estos miembros de la familia NFAT son NFATC2, NFAC2 (NFATC1), NFATC3 y NFATC4. Se ha reportado que en linfocitos T CD8⁺ NFATC1 es importante para la activación y funciones efectoras de estas células (Klein-Hessling et al., 2017), pero también se asocian con anergia y

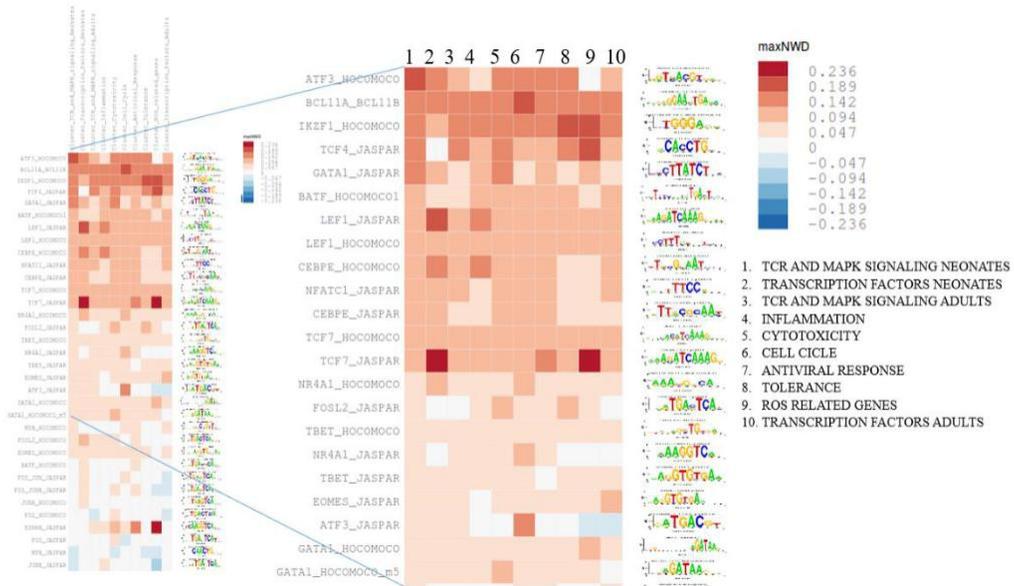
tolerancia, en particular cuando no se unen con los miembros de la familia AP-1 (Serfling et al., 2006)(Martinez et al., 2017).

Como los motivos de unión a factores generales que son organizadores de la cromatina son muy abundantes, su enriquecimiento es mayor y no se pueden observar los cambios sutiles en el enriquecimiento de los otros motivos de unión relevantes para el transcriptoma y epigenoma de las células neonatales. Por lo tanto, decidimos hacer una búsqueda dirigida, considerando los motivos de unión de los factores transcripcionales diferencialmente expresados en linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos y algunos FT adicionales que son relevantes en la inmunobiología de los linfocitos T.

Entre los FT, incluimos algunos organizadores generales de la cromatina, ya que se sobreexpresaron en las células neonatales. Por esta razón, dividimos el análisis de los motivos en tres secciones, para evitar el problema anterior de motivos de unión muy representados y no se pueden distinguir los cambios sutiles en el enriquecimiento del análisis de motivos de unión menos enriquecidos.

En los factores de alto enriquecimiento nuevamente sólo encontramos motivos de factores transcripcionales que son organizadores generales de la cromatina entre ellos los motivos de unión a los factores SP1 ,2 ,3 ,4, el factor MEF2 y el factor de crecimiento temprano 1 (EGR1) y el insulador CTSE, de poco interés para nuestro estudio (datos no mostrados).

A) Motivos de unión a FT con enriquecimiento intermedio



B) Motivos de unión a FT con enriquecimiento bajo

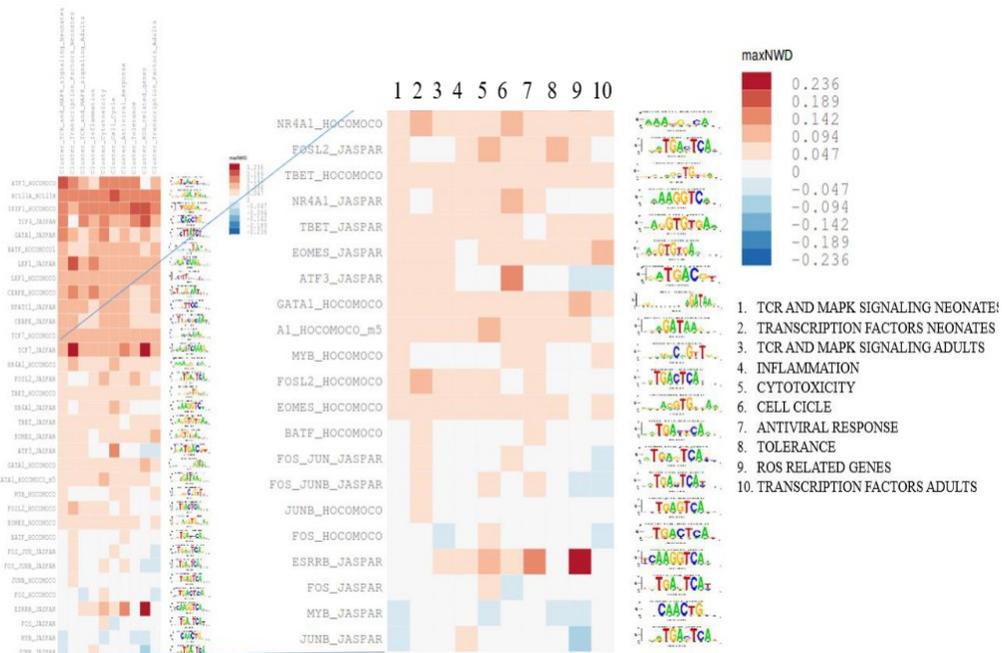


Figura 32. Análisis de motivos de factores transcripcionales con intermedio enriquecimiento en los clústeres de genes diferenciales de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

Al observar los clústeres con un enriquecimiento intermedio (Figura 32A), pudimos observar los motivos de unión a factores transcripcionales que se han descrito como importantes para los linfocitos T CD8⁺. Hubo un enriquecimiento importante de los motivos de unión a BCL11A y BCL11B en los clústeres relacionados con ciclo celular. BCL11A se encuentra altamente sobreexpresado en las células neonatales. Asimismo, los motivos de unión de NFAT y de la vía de Wnt, LEF1 y TCF7, se encontraron altamente representados entre los factores transcripcionales de neonatos, lo que nos habla de que la vía de Wnt pudiera estar controlando la expresión de algunos factores transcripcionales de las células neonatales. También se encontró enriquecido el motivo de unión a TCF4 entre los genes asociados a tolerancia, enriquecidos en las células T CD8⁺ de neonatos. Dada la importancia de la vía de Wnt en la inmunobiología de las células neonatales, como describimos en la sección de antecedentes, decidimos evaluar la expresión de estos factores en células de neonatos y adultos el nivel basal y después de la estimulación por señales del TCR.

Evaluamos expresión de los genes de los factores transcripcionales TCF1 y LEF1 por RT-qPCR en linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos.

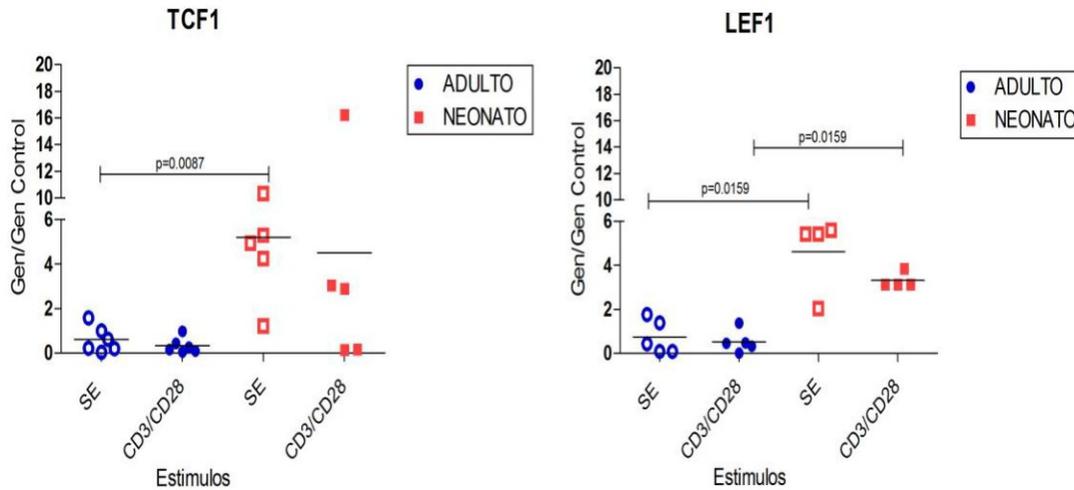


Figura 33. Expresión de los genes de los factores transcripcionales TCF1 y LEF1 en linfocitos T CD8⁺ neonatales y de adulto. (Izquierda) Expresión del gen de tcf-7 que codifica para el factor transcripcional TCF1 por RT-qPCR, (derecha) expresión del gen de lef1 que codifica para el factor transcripcional LEF1 por RT-qPCR. Los datos se normalizaron con el gen control GAPDH, n=3.

La expresión de los genes de TCF1 y LEF1 se encontró incrementada en los linfocitos T CD8⁺ vírgenes neonatales en comparación con las células de adultos (Figura 33). La expresión no cambió con la estimulación de las células con CD3 y CD28 durante 6 horas (que simula el encuentro con el antígeno). Entre los motivos con bajo enriquecimiento encontramos los motivos de factores transcripcionales para T-bet, Eomes y los miembros de la familia AP-1, Fos y Jun.

Finalmente, centrándonos en los factores transcripcionales de respuesta a las señales del TCR NFAT, NFkB y AP-1, encontramos que el motivo de unión al factor transcripcional NFAT se encontró muy representado en casi todos los clústeres, con excepción en los promotores de genes que participan en la señalización por MAP cinasas y el TCR. Por otra parte, los genes de AP-1 y NFkB se encontraron enriquecidos en genes de metabolismo relacionados con Especies

Reactivas de Oxígeno (glicolisis) y Citotoxicidad, implicando una distinción en las vías asociadas con las señales de calcio (NFAT) y diacilglicerol y MAP cinasas (AP-1 y NFAT).

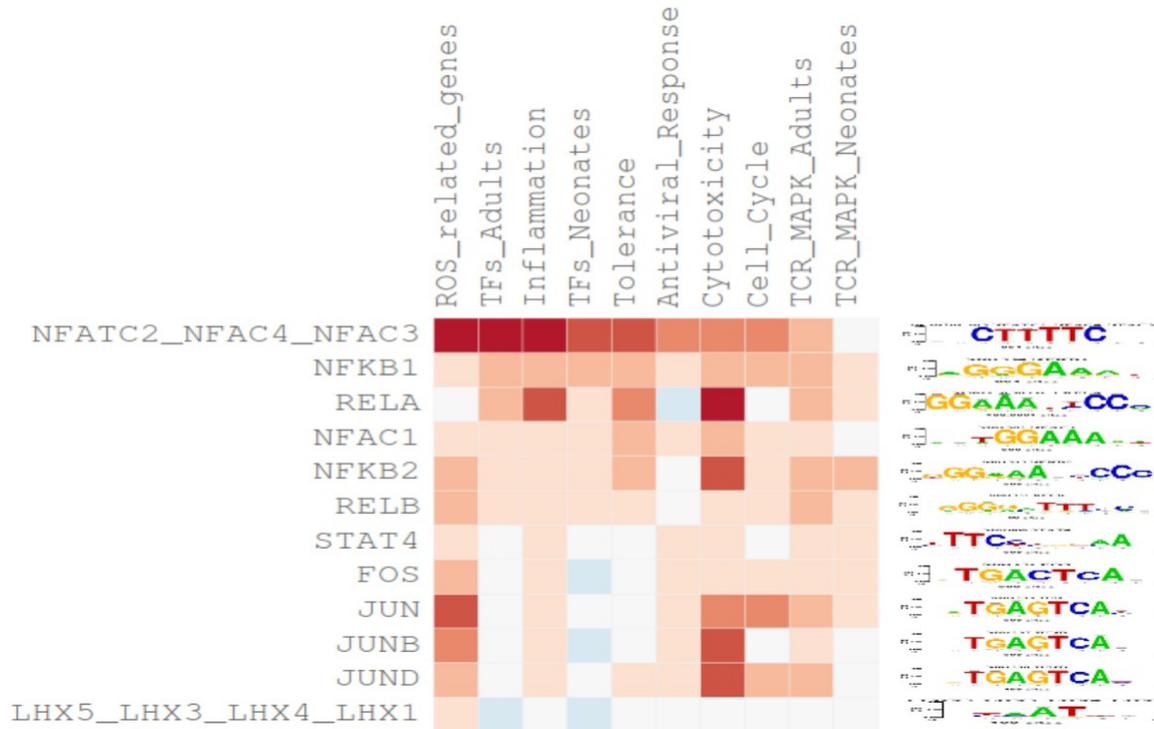


Figura 34. Enriquecimiento de motivos de factores transcripcionales involucrados en la activación de los linfocitos T en los promotores de genes de los diferentes clústeres.

Los motivos de unión a factores transcripcionales son secuencias muy pequeñas, que por azar pueden encontrarse enriquecidos en la enorme base de datos de genoma. Como una primera validación de que los motivos de unión de factores transcripcionales que encontramos son verdaderamente motivos de unión a estos factores, se hizo un análisis de solapamiento de las regiones encontradas con datos de ChIP-seq de factores transcripcionales, en distintos tipos celulares. Realizamos el análisis de solapamiento para todos los clústeres, que se muestran en el Anexo 8, validando que estos motivos efectivamente pueden ser ocupados por los factores transcripcionales

correspondientes. Sin embargo, aquí nos centraremos en la validación del último análisis de los factores de transcripción dependientes del TCR mostrados en la figura 34. Para realizar esta validación, utilizamos los ChIP-seq de los factores transcripcionales NFATC1, NFKB, FOS, JUN y STAT4 de 5 líneas celulares diferentes y de PBMCs encontrados en las bases de datos de ReMAP (Chèneby et al., 2020) y realizamos el solapamiento con las regiones promotoras de los genes de los distintos clústeres.

En este nuevo análisis encontramos que el LHX2 que es un factor transcripcional expresado en células de ojo que utilizamos como control negativo, no encontramos en ninguna de las regiones promotoras de los genes diferenciales pertenecientes a los diferentes clústeres (Figura 35). Por lo cual, fue un buen control negativo.

El ChIP-seq de STAT4 se encontró solapado con las regiones promotoras de los genes asociados a los clústeres de ROS, señalización de TCR y MAPK en neonatos y Citotoxicidad (Figura 35). Esto nos pudiera sugerir que STAT4 puede estar controlando la expresión de estos genes importantes en las funciones efectoras y activación de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

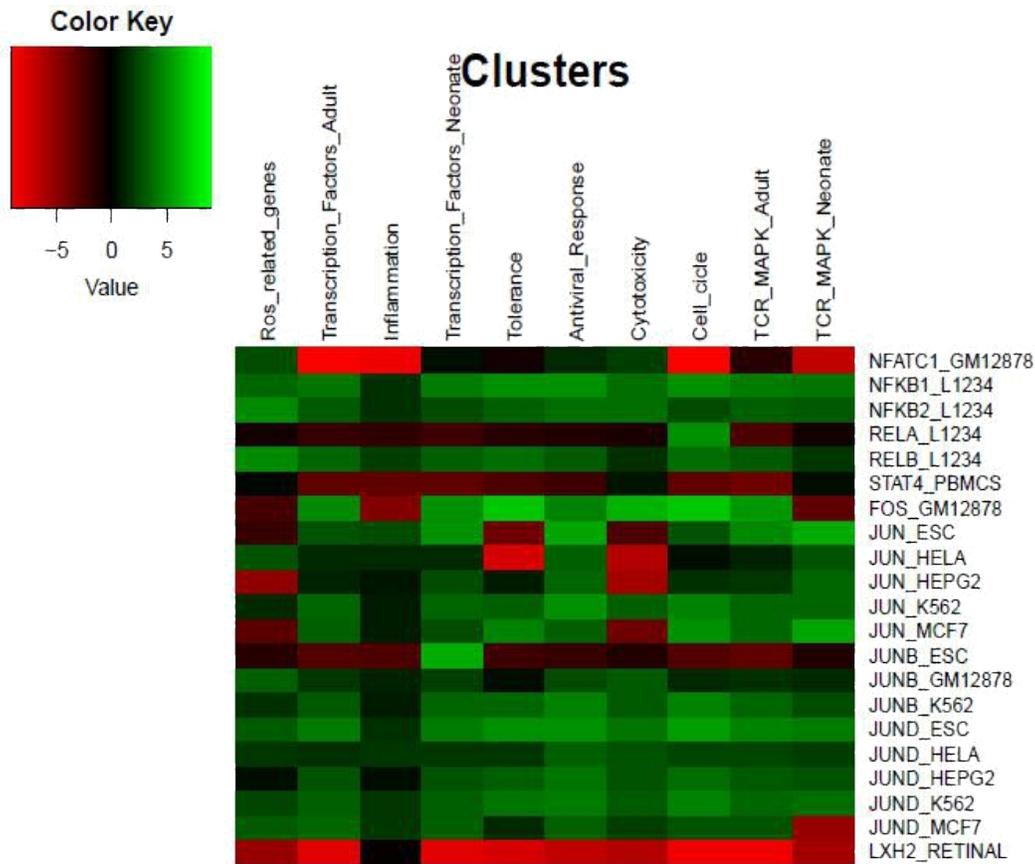


Figura 35. Sobrelape del ChIP-seq de los Factores Transcripcionales involucrados en la activación de los linfocitos T de diferentes líneas celulares en las regiones promotoras de genes de los diferentes clústeres. Se utilizó LXH2 como control negativo.

Observamos el sobrelape de los factores transcripcionales NF B 1 y 2 y RELB en todos los clústeres (Figura 35). Sin embargo, la subunidad p65 (RELA) solo se observó sobrelape en los clústeres de ciclo celular y señalización de TCR y MAPK en linfocitos T CD8⁺ neonatales.

El factor transcripcional NFATC1 se encontró sobrelapado en los clústeres de genes relacionados con ROS, factores transcripcionales de neonato, tolerancia, respuesta antiviral y citotoxicidad (Figura 35). También podemos observar a JUNB, JUN y JUND en casi todos los 128

clústeres a excepción de JUN y JUNB que no se encontró solapamiento en las regiones promotoras de genes asociados a tolerancia y citotoxicidad en células madre (Figura 35). Esto podría sugerir de que las células neonatales en los genes asociados a citotoxicidad dependen de los sitios de NFATC1 con la interacción de AP-1, de acuerdo con reportes en modelos murinos, en los que se reporta que la unión de NFAT sin AP-1 se asocia con anergia, mientras que NFAT-AP-1 se asocia con activación y diferenciación en células efectoras (Schietinger & Greenberg, 2014), aunque se tendrían que hacer más experimentos para poder realmente afirmar esto.

Objetivo 2: Definir y validar los sitios de unión a FT en regiones regulatorias de los distintos Estados de la Cromatina, característicos de las células T CD8⁺ neonatales y de adultos.

Para definir las regiones regulatorias en la cromatina de linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos, se obtuvieron los datos “fastq” de Blueprint, perteneciente al consorcio del epigenoma humano internacional (siglas en inglés, IHEC)(Stunnenberg et al., 2016). Estos datos fastq son de la secuenciación de la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-seq) de seis diferentes marcas de la cromatina: marcas asociadas a apertura como son H3K4me3, H3K27ac y H3K36me3, una asociada a potenciadores, H3K4me1, y 2 marcas relacionadas a cierre de la cromatina H3K27me3 y H3K9me3. Para el análisis de los datos de ChIP-seq, primero se realizaron todas las pruebas de calidad de los datos, que se presentan en el Anexo 9.

Después de todos estos análisis de calidad, los datos que se utilizaron para definir las regiones regulatorias a partir de los estados de la cromatina se muestran en la Tabla 3.

Marca De Histona	Código de Datos de Neonatos	Código de Datos de Adultos
H3K27ac	C0066PH1 y S00C2FH1	C003TS
H3K4me3	C0066PH1 y S00C2FH1	C005DFH1 y S0014WG
H3K36me3	C002YMH1 y S00C2FH1	S0014WG
H3K27me3	C002YMH1 y C0066PH1	C003TS
H3K9me3	C002YMH1 y C0066PH1	C005DFH1 y S0014WG
H3K4me1	C002YMH1 y S00C2FH1	C005DFH1 y S0014WG

Tabla 3. Datos seleccionados del ChIP-seq de las seis diferentes marcas de histonas en linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos para hacer el ChromHMM.

Análisis de los Estados de la Cromatina

Una vez seleccionados los mejores datos de ChIP-seq de las seis diferentes marcas de histonas, se realizó el análisis de los estados de la cromatina con el programa ChromHMM para definir las diferentes regiones regulatorias. Se definieron 11 diferentes estados de la cromatina en linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos, mediante la combinación de las marcas de histonas y el posicionamiento del estado de las histonas en las diferentes regiones del genoma (Figura 36). En la primera columna de la figura se muestran los distintos estados de la cromatina, en la siguiente columna (*Emission Parameters*), se muestran las marcas y su intensidad en cada uno de los Estados de la Cromatina. La tercera columna (*Fold Enrichments ADULTS*) muestra

que tan enriquecido esta cada uno de los Estados de la Cromatina y su posición en el genoma, ya sea intragénica o intergénica. La cuarta columna (Fold Enrichments NEONATES) muestra lo mismo, pero en el genoma de las células neonatales.

El primer estado que se definió presentó las marcas de cierre H3K9me3, H3K27me3 y a su vez marcas de apertura como es H3K4me3 y H3K4me1, por lo que esta región la definimos como *enhancers* en estado *poised* o bivalentes, El segundo Estado de la Cromatina agrupó las regiones quiescentes, que solo contiene la marca de H3K27me3 y el posicionamiento de esta marca se encontró en los cuerpos de los genes, característico de los genes silenciados. El tercer Estado de la Cromatina fue definido por las regiones sin señal, es decir, las regiones donde no encontramos ninguna de las 6 marcas de histonas evaluadas en este análisis.

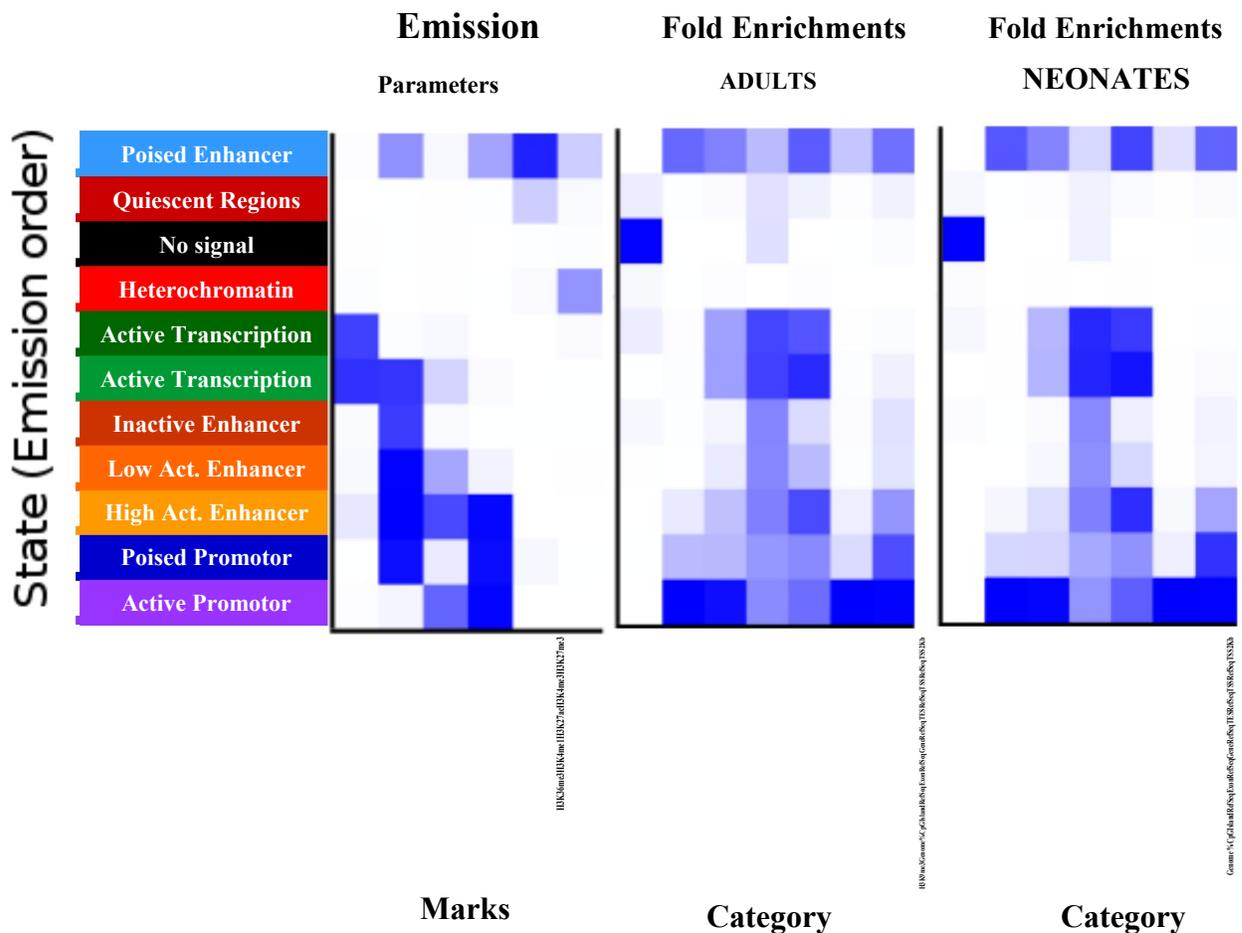


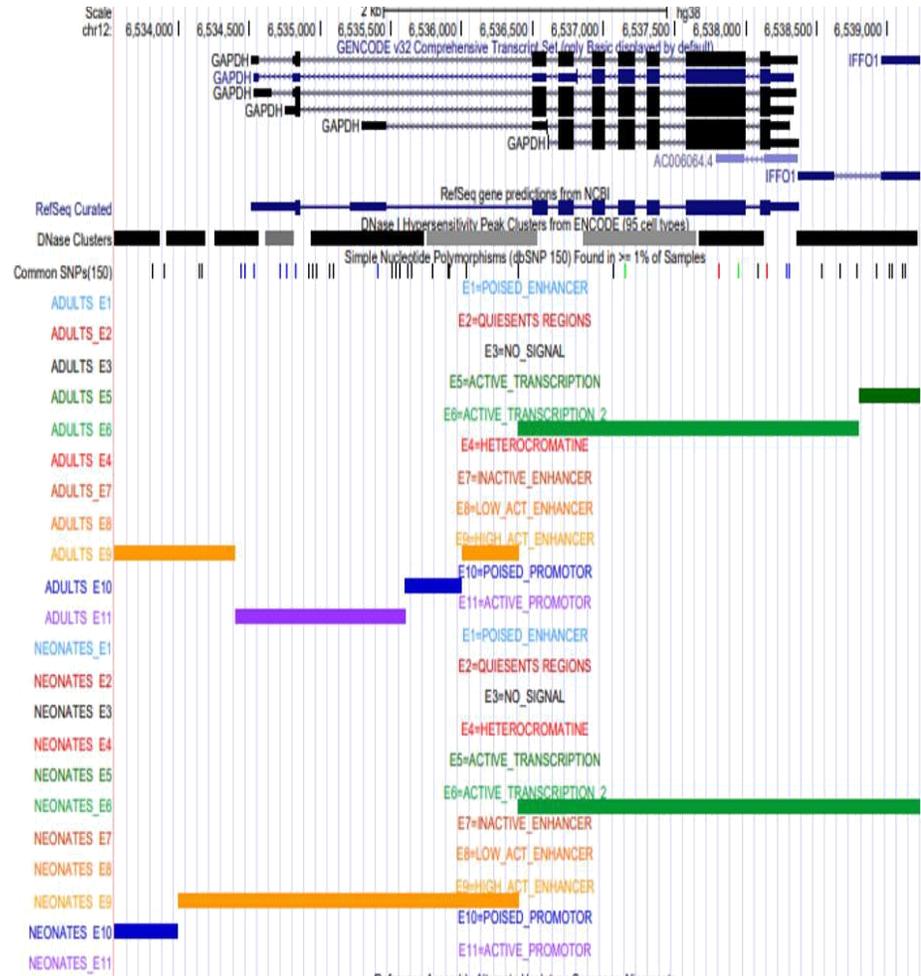
Figura 36. Estados de la cromatina de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos. (Izquierda) Frecuencia de emisión de cada una de las marcas de histonas (H3K4me3, H3K4me1, H3K27ac, H3K27me3, H3K36me3 y H3K9me3) presente en cada estado de la cromatina, (en medio) Enriquecimiento de cada estado de la cromatina en diferentes posiciones de la cromatina, *CpG island* regiones ricas en islas CpG, *RefSeqExon* regiones en la que se localizan exones de los genes, *RefSeqGenes* regiones donde se localizan los genes, *RefSeqTES* sitios de término de la transcripción, *RefSeqTSS* sitios de inicio de la transcripción, *RefSeqTSS2Kb* sitios de 2 Kilobases río arriba del sitios de inicio de la transcripción.

El cuarto Estado de la Cromatina que fue definido por las regiones de heterocromatina, ya que se observa la presencia de la marca H3K9me3 que se asocia con heterocromatina constitutiva (Kimura, 2013). Las regiones de transcripción activa fueron definidas en los estados 5 y 6, porque en estos estados se observa la presencia de la marca H3K36me3, que es característica de encontrarse en los cuerpos de los genes que se encuentran transcribiéndose (Figura 36). Sin embargo, en el estado 6 podemos observar otras dos marcas asociadas a apertura de la cromatina como H3K27ac que se encuentran en genes que se transcriben activamente y tenemos a H3K4me1 (Figura 36), que esta marca en esta región pudiera ser por la transición a H3K4me3 (Kimura, 2013). El séptimo Estado de la Cromatina se definió como la región de *Enhancer* en estado inactivo, ya que está presente la marca asociada a *enhancer* H3K4me1 y esta marca la encontramos en regiones 2 kb río arriba del TSS y al término del TSS. La región de

Enhancer, con una actividad baja, fue definido en el estado número ocho de la cromatina, ya que expresa H3K4me1 y señal baja de H3K27ac. Los *enhancers* con actividad alta se definieron en el estado nueve, ya que no solo presentan H3K4me1 sino también H3K27ac y H3K4me3. En el Estado de la Cromatina 10, se definieron los promotores en estado bivalente o *poised* (estado diez) por la presencia de H3K4me1 y H3K4me3. Finalmente, el último estado lo representan los promotores activos, definidos por H3K27ac y H3K4me3 en los sitios de inicio de la transcripción y la región promotora.

A)

GAPDH



B)

IVL



Figura 37. Visualización en el Genome Browser de los Estados de la cromatina en genes control.

A) Visualización de los 11 estados de la cromatina en el gen *GAPDH* y del B) gen de involucrina (*IVL*).

Para corroborar las regiones regulatorias definidas con los diferentes estados de la cromatina, se visualizaron las diferentes regiones en el programa de Genome Browser en dos diferentes genes control. El gen de *GAPDH* es un gen que se encuentra constitutivamente activo, por lo que en el observamos las regiones de transcripción activa, promotores activos, *enhancers*

activos (Figura 37A). En contraste, podemos ver un efecto opuesto para el gen de involucrina (*IVL*), en el que solamente vemos la presencia del estado de regiones quiescentes. Por lo que podemos suponer que las regiones regulatorias fueron bien definidas.

Análisis de las regiones regulatorias a partir de los estados de la cromatina de linfocitos T

CD8⁺ de neonatos y adultos

Para definir los motivos de unión de cada uno de los estados de la cromatina, se hicieron dos tipos de análisis, uno buscando nuevos motivos y otro buscando motivos de unión de factores transcripcionales de nuestro interés.

Se realizó la búsqueda de nuevos motivos en las once regiones regulatorias de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos que describimos anteriormente con el programa peak-motifs de RSAT (Thomas-Chollier et al., 2012). Para este análisis de búsqueda de nuevos motivos, utilizamos dos tipos de background, para el primer análisis se utilizó en el programa peak-motifs como background todo el genoma a este análisis se le llamo “primary motifs”. Para este primer análisis podemos observar que en las regiones regulatorias de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos de los factores transcripcionales relacionados a nuevos motivos, pertenecen en gran variedad a familias de factores transcripcionales que podemos encontrar a todo lo largo del genoma y que son considerados maestros reguladores, tal es el caso de los miembros de la familia de factores transcripcionales SP, TEAD, la familia de factores transcripcionales Homeobox (HOX) (tabla 4A y 6B). Podemos observar motivos de unión a NFATC1, NFATC3 y NFAT5 que son tres miembros de la familia NFAT en las regiones que tienen transcripción activa en los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos (Tabla 4A y 6B). Sin embargo, podemos observar que en este primer

análisis no encontramos factores transcripcionales que fueran diferentes entre los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

En un segundo análisis en la búsqueda de los nuevos motivos, se utilizó como background a las regiones regulatorias de neonatos y adultos, es decir, cuando queremos analizar las regiones regulatorias de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos, colocábamos como background las regiones regulatorias de los linfocitos T CD8⁺ de adulto y viceversa, a este análisis le llamamos “secondary motifs”. Pudimos observar una reducción en el número de motivos de unión a factores transcripcionales, sin embargo, estos factores transcripcionales en las diferentes regiones regulatorias continuaban siendo factores transcripcionales que se encuentran a lo largo del genoma, tal es el caso de los miembros SP1, SP2, SP3, SP4 miembros de la familia de SP (Tabla 4A y 4B). Solo pudimos observar a 2 miembros de la familia RUNX, RUNX1 y RUNX3 (Tabla 4A) en las regiones de *enhancers* con baja actividad en los linfocitos T CD8⁺ de neonatos en comparación con los adultos en los cuales se encontró al factor TBP, PO3F2 y los dos factores pertenecientes a la familia de factores homeobox CDX1 y CDX2 (Tabla 4B). En las regiones de heterocromatina, se encontraron muchos factores transcripcionales relacionados a la familia homeobox HDX12, HBX13, HCX13 y HXA1 y los miembros de la familia SP como son SP1, SP2 y SP3 (Tabla 4A) en linfocitos T CD8⁺ de neonatos, en estas mismas regiones de heterocromatina en linfocitos T CD8⁺ de adultos se encontró el motivo de CPEB1 (Tabla 4B).

MECP2,EGR4, HIC1 ZNF740, GLIS3, PLAG1, HXD3,mix- a,HXA2,NKX62,DLX3,POU6F1,LHX6,LHX2,MNX1,Dlx1,EN2,ALX3,MIXL1 ,GBX1,GBX2,RAX,HESX1,ESX1,LBX2,MEOX1,MEOX2,GSX1,GSX2,HOXA 2,HOXB2,HOXB3,EVX1,EVX2,EMX1,EMX2,PO6F2,LBX2,NOTO,PDX1,No box, HXD3,mixa,HXA2,NKX62,DLX3,POU6F1,LHX6,LHX2,NOTO,MNX1,Dlx1, EN2,ALX3,MIXL1,GBX1,GBX2,RAX,HESX1,ESX1,LBX2,MEOX1,MEOX2,G SX1,GSX2,HOXA2,HOXB2,HOXB3,EVX1,EVX2,EMX1,EMX2, MIXL1,PO6F2,LBX2,PDX1,Nobox, HXA11,HXD12,HXB13,HXC13, HMGA1. HXD3,mixa,HXA2,NKX62,DLX3,POU6F1,LHX6,LHX2,NOTO,MNX1,Dlx1, EN2,ALX3,MIXL1,GBX1,GBX2,RAX,HESX1,ESX1,LBX2,MEOX1,MEOX2,G SX1,GSX2,HOXA2,HOXB2,HOXB3,EVX1,EVX2,EMX1,EMX2,PDX1,Nobo x,PRRX2,Nkx2-5,MSX2,DLX2,HXD4,LBX1,PDX1,NKX6-1,NKX6- 2,BARX1,BSX,EN1,LHX9,ISX,Shox2,SHOX,Prx2,RAX2,PRRX1,UNCX,Dlx 2,DLX6,Dlx3,Dlx4,MSX2,MSX1,Msx3,PAX4,Lhx8,LMX1B,LMX1A,Lhx4,V AX1,VAX2,VSX1,VSX2, TEAD3,TEAD1,TEAD4, NFAC1,NFAT5,NFATC1,NFATC3, TEAD1,TEAD4, No match	CPEB1, FOXL1, FOXJ3. SP1,SP2,SP3, SP1,SP2,SP3, MAZ,SP4, ZN148,PO3F2, CDX1,CDX2, HXD12,HXB13,HXC13, HXA10, ZFHx3, PO6F1. CPEB1, FOXJ3 MAZ,SP4, SP1,SP2,SP3.
HXD3,mixa,HXA2,NKX62,DLX3,POU6F1,LHX6,LHX2,NOTO,MNX1,Dlx1, EN2,ALX3,MIXL1,GBX1,GBX2,RAX,HESX1,ESX1,LBX2,MEOX1,MEOX2,G SX1,GSX2,HOXA2,HOXB2,HOXB3,EVX1,EVX2,EMX1,EMX2, PDX1,NOBOX,Nobox, MIXL1,PO6F2,LBX2,NOTO, TEAD3,TEAD1,TEAD4, NFAC1,NFAT5,NFATC1,NFATC3, TEAD1,TEAD4. BPTF, FOXM1, FOXP3, HXA11, HMGA1, HXD12,HXB13,HXC13.	MAZ,SP4, SP1,SP2,SP3,ZN148 SPI1,BC11A,IRF4, EHF,ELF2, SPIB,SPI1,SPIC,RUNX2,RUNX2,RUNX3, RUNX3,RUNX1,PEBB,RUNX1, UBIP1 No match
SP1,SP1, ZN740, SP1,SP1, ZNF740.	
MECP2, EGR4.	SP1,SP2,SP3, MAZ,SP4, KLF16,TBX15, MAZ,SP4, SP1,SP1, WT1,EGR1 TFDP1, SP1,SP2,SP3,
SP1,EGR4, KLF6,EGR1, ZN148,SP2, KLF16.	ZN148,WT1,EGR1.

Tabla 4A. Análisis de motivos de Factores transcripcionales en regiones regulatorias de linfocitos T CD8⁺ de neonatos humanos.

MECP2,ZN740, EGR1, ZN148,SP2, EGR4 TEAD3,TEAD1,TEAD4,NFAC1,NFAT5,NFATC1,NFATC3,HXD3,mixa,HXA2,	MAZ,SP4, SP1,SP2,SP3, TFDP1 SP1,SP2,SP3, ZN148, KLF16,MAZ,SP4,
NKX62,DLX3,POU6F1,LHX6,LHX2,NOTO,MNX1,Dlx1,EN2,ALX3,MIXL1, GBX1,GBX2,RAX,HESX1,ESX1,LBX2,MEOX1,MEOX2,GSX1,GSX2,HOXA2 ,HOXB2,HOXB3,EVX1,EVX2,EMX1,EMX2,PO6F2,LBX2,PDX1,Nobox. HXD3,mixa,HXA2,NKX62,DLX3,POU6F1,LHX6,LHX2,NOTO,MNX1,Dlx1, CPEB1,	TFDP1, TBX15,
EN2,ALX3,MIXL1,GBX1,GBX2,RAX,HESX1,ESX1,LBX2,MEOX1,MEOX2,G SX1,GSX2,HOXA2,HOXB2,HOXB3,EVX1,EVX2,EMX1,EMX2, MIXL1,PO6F2,LBX2,PDX1,Nobox, SOX4,SOX9,Sox3,Sox6, Foxd3, HXA11, HMGA1, HXD12,HXB13,HXC13 HXD3,mixa,HXA2,NKX62,DLX3,POU6F1,LHX6,LHX2,NOTO,MNX1,Dlx1, No match	
EN2,ALX3,MIXL1,GBX1,GBX2,RAX,HESX1,ESX1,LBX2,MEOX1,MEOX2,G SX1,GSX2,HOXA2,HOXB2,HOXB3,EVX1,EVX2,EMX1,EMX2, PDX1,NOBOX,Nobox, MIXL1,PO6F2,LBX2,TEAD3,TEAD1,TEAD4, NFAC1,NFAT5,NFATC1,NFATC3.	
BPTF, FOXD3,FOXF1,FOXJ2, FOXJ3.	CPEB1
BPTF, FOXM1, FOXP3, HXA11, HMGA1, HXD12,HXB13,HXC13.	ARX,PROP1,Phox2b,PHOX2A,ALX3,UN C4,PHX2B,DRGX,PHX2A,ALX1,ALX4,RA X2, CPEB1.
CPEB1, BPTF, FOXM1, FOXP3,HXA11, HMGA1, HXD12,HXB13,HXC13.	TBP, PO3F2, CDX1,CDX2
SP1,THAP1, KLF6, ETV2, BPTF, FOXM1.	FOXG1, CPEB1, FOXJ3,
MECP2, KLF6.	CPEB1, FOXG1, FOXJ3,FOXL1
SP1,KLF6, EGR4, EGR1, ZN148,SP2, KLF16.	UBIP1, SMAD1

Tabla 4B. Análisis de motivos de Factores transcripcionales en regiones regulatorias de linfocitos T CD8⁺ de adultos humanos.

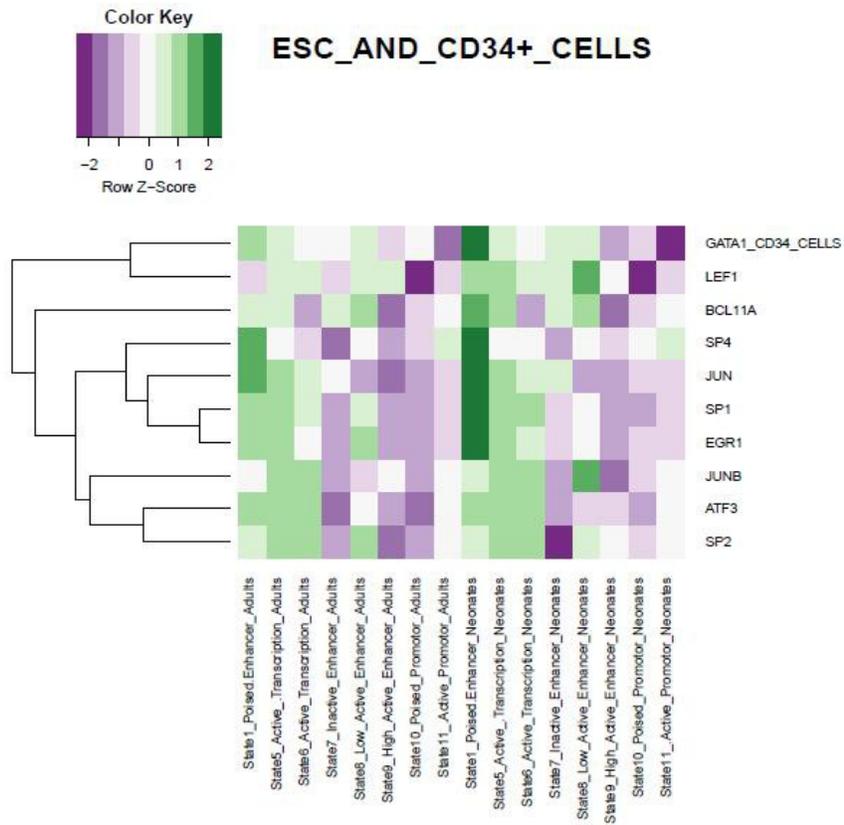
Con estos resultados podemos concluir que los factores transcripcionales miembros de las familias SP, TEAD y Homeobox son relevantes en las regiones regulatorias de los linfocitos T CD8⁺.

Análisis de sobrelape del ChIP-seq de Factores Transcripcionales de líneas celulares con las regiones regulatorias de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

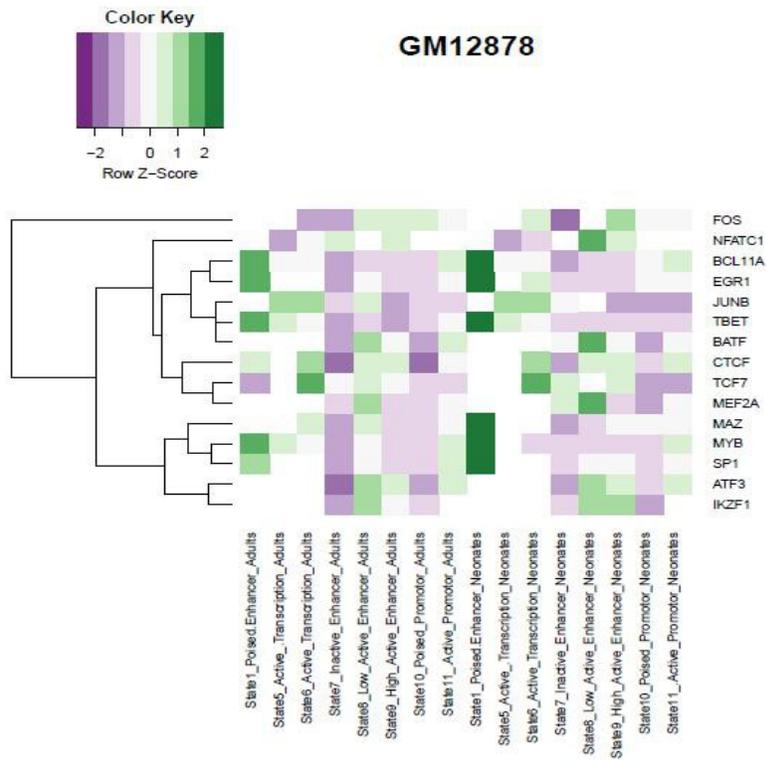
Para validar los sitios de factores transcripcionales relevantes en las regiones regulatorias de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos, se utilizaron los datos de picos de ChIP-seq de factores transcripcionales en 2 líneas celulares (GM12878 y JURKAT) y 3 diferentes tipos de células (células madre, células CD34⁺ y células T CD4⁺ fenotipo Th1) que fueron obtenidos de la base de datos ReMap (Chèneby et al., 2020). Se realizó el análisis de sobrelape de los picos de ChIP-seq de estos factores con los datos de los picos de las regiones regulatorias definidas anteriormente con los Estados de la Cromatina obtenidos del ChromHMM.

Se observó un mayor sobrelape de los ChIP-seq de los factores transcripcionales SP1, SP2 y SP3 de las células madre en las regiones de *enhancer* en estado bivalente, en las regiones de transcripción activa 1 y 2 en los linfocitos T CD8⁺ de neonatos (Figura 38A), este resultado nos corrobora no solo la presencia de los motivos de estos factores transcripcionales (Tabla 4A), sino también de que el factor transcripcional puede unirse en esas regiones. Sin embargo, en las regiones regulatorias de los linfocitos T CD8⁺ de adulto no se encontraron nuevos motivos relacionados a los miembros de la familia SP (Tabla 4B), aunque sí pudimos observar la presencia de los miembros SP1, SP2 y SP3 en las regiones de *enhancer* en estado *poised* o bivalente, transcripción activa 1 y 2.

A)



B)



C)

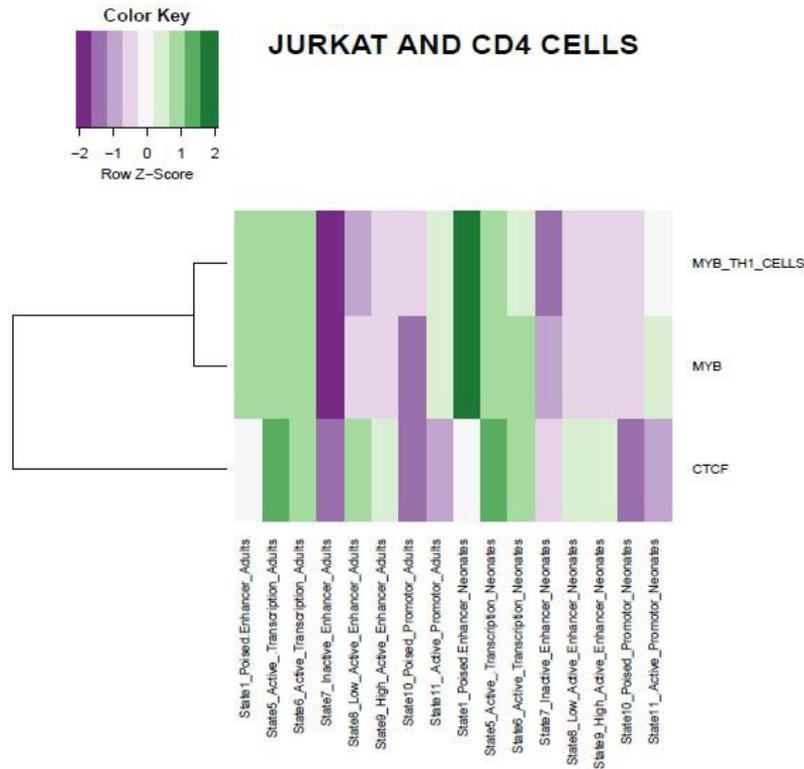


Figura 38. Sobrelape de los ChIP-seq de Factores Transcripcionales de líneas celulares con las regiones regulatorias de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos. Sobrelape de los ChIP-seq de los diferentes factores transcripcionales en células A) CD34⁺ y células madre, B) en la línea celular GM12878 y C) en linfocitos T CD4⁺ fenotipo Th1 y Jurkats con las regiones regulatorias de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos que fueron significativos con un q-value < 0.05.

También encontramos que los ChIP-seq de dos factores transcripcionales BCL11A y LEF1 de células madre tienen un mayor sobrelape con las regiones de *enhancer* inactivos, transcripción activa 1, regiones de *Enhancer* con baja actividad en linfocitos T CD8⁺ de neonato en comparación con los linfocitos T CD8⁺ de adultos (Figura 38A). Los genes de estos dos factores

se habían reportado sobreexpresados en los linfocitos T CD8⁺ neonatales (Galindo-Albarrán et al., 2016).

También se pudo observar una mayor presencia del factor GATA1 en seis regiones regulatorias de linfocitos T CD8⁺ de neonatos en comparación con los adultos (Figura 38A). Este factor transcripcional es importante ya que regula la hematopoyesis (Caramori et al., 2001).

En el caso de la línea celular GM12878 que es una línea celular linfoblastoide, pudimos observar una mayor presencia de los factores transcripcionales MYB, SP1, BCL11A, MAZ y TBET en las regiones de *enhancer* en estado bivalente o *poised* en linfocitos T CD8⁺ de neonatos en comparación con las células de adulto (Figura 38B).

Un factor importante en la tolerancia y activación de las células T CD8⁺ es NFATC1. Los motivos de unión a este factor se observaron en las regiones de potenciadores con baja y alta actividad en los linfocitos T CD8⁺ de neonatos. Sin embargo, en las células de adulto pudimos observar la presencia de este factor transcripcional en las regiones de *enhancer* inactivos y con baja actividad, definiéndose como uno de los factores transcripcionales potencialmente definitorios en el paisaje transcriptómico y epigenético de los linfocitos T CD8⁺ neonatales (Figura 38B).

Se pudo observar una mayor presencia del factor transcripcional Myb del ChIP-se de células Jurkat, que son células CD4⁺ transformadas en las regiones promotoras activas, *enhancer* en estado *poised*, regiones de transcripción activa 1 y 2 de linfocitos T CD8⁺ de neonatos en comparación con las células de adulto. Este factor transcripcional en los linfocitos T CD8⁺ se ha descrito como un factor importante en el mantenimiento y generación de linfocitos T CD8⁺ de memoria tipo célula madre.

En resumen, de esta sección se perfilaron como FT potencialmente relevantes en el perfil transcripcional de los linfocitos T CD8⁺ neonatales a BCL11A y LEF1 en las regiones de *enhancer* inactivos, transcripción activa 1 y regiones de *enhancer* con baja actividad en linfocitos T CD8⁺ de neonato y a NFATC1 en los potenciadores de las células neonatales.

Análisis de las regiones regulatorias filtradas con el ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos

Para profundizar en el análisis de las regiones regulatorias de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos, se realizó un análisis más fino de las regiones regulatorias de los linfocitos T CD8⁺, realizamos experimentos de ATAC-seq en nuestras células T CD8⁺ de neonatos y adultos. Los picos de este tipo de análisis denotan cromatina abierta y se pueden utilizar para validar a los motivos de unión a TF, ya que cuando hay un FT unido a estos sitios de cromatina abierta, los picos de ATAC-seq muestran una muesca debido a la unión del FT. Los pasos que se siguieron para analizar los datos de ATAC-seq se muestran en el Anexo 9.

Los picos obtenidos de los datos seleccionados del ATAC-seq de neonatos y adultos humanos se utilizaron para filtrar las regiones regulatorias de los Estados de la Cromatina. Las regiones regulatorias filtradas con el ATAC-seq fueron las regiones de cromatina abierta. Esto es: los *enhancers* con baja actividad, alta actividad y en estado *poised*, y los promotores activos y en estado *poised* y los estados de transcripción activa 1 y 2. Se utilizaron los datos de los picos de las regiones regulatorias junto con los datos de los picos de ATAC-seq para realizar el análisis de la búsqueda de motivos de factores transcripcionales y el análisis de las vías de señalización enriquecidas en las regiones regulatorias.

A continuación, se presentan los análisis que se realizaron con las regiones regulatorias filtradas con el ATAC-seq de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

Análisis de peak-motifs en las regiones regulatorias de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos

Se realizó una búsqueda de nuevos motivos de factores transcripcionales, que pudieran estar asociados a estas regiones con el programa peak-motifs de RSAT (Thomas-Chollier et al., 2012), en las regiones regulatorias asociadas a apertura definidas con los estados de la cromatina y filtradas con los datos de ATAC-seq.

En este análisis se encontraron factores transcripcionales que se habían reportado anteriormente como sobreexpresados en los linfocitos T CD8⁺ de neonato y adulto (Galindo-Albarrán et al., 2016) (Tabla 5, FTs marcados rojo (adultos) y azul (neonatos) y otros motivos de factores transcripcionales que son relevantes en la activación y diferenciación de los linfocitos T (Shin et al., 2009) (Priyadharshini et al., 2012) (Tabla 4, marcados en morado).

Entre los factores que parecen ser importantes tanto para células neonatales como para las de adulto, se encontraron motivos de unión a FT de la familia TEAD, que se encuentran relacionados con vías de metabolismo y miembros de la familia de las cinasas activadas por p21 (PAK), en regiones de *enhancer* en estado bivalente o *poised* (Tabla 4), se ha descrito que TEAD1 induce la regulación de la diferenciación de células Treg (Landin-Malt et al., 2016). Otro motivo que se encontró en diversas regiones regulatorias como son en *enhancers* en estado *poised*, en promotores activos y en estado *poised* en los adultos y en los *enhancers* con alta actividad fue motivo del factor transcripcional de respuesta a crecimiento epidermal EGR1, el cual se ha descrito

que interacciona con NFATC2 y regula la expresión de CD40L. También se encontraron FT con actividad de Zn-finger, que todavía no se les ha descrito funciones.

De manera notoria, los motivos de factores transcripcionales de elementos de respuesta a interferón como son IRF3 e IRF2 se encontraron exclusivamente en regiones de transcripción activa en adultos (Tabla 5). Como los motivos de unión de los IRFs no se encontraron en las regiones de cromatina activa en los neonatos, correlaciona con el fenotipo neonatal, lo que sugeriría que la activación de estos factores, quizás por señales TLRs o de IFN tipo 1 pudieran llevar a la activación de linfocitos T CD8⁺ neonatales.

Por otra parte, aunque encontramos motivos de unión a los factores NFAT en los potenciadores activos tanto en células neonatales como de adulto, una diferencia notoria fue que se encontraron motivos de unión a NFATC2 sólo en los potenciadores de las células neonatales y sólo a NFATC1 en los potenciadores activos de las células de adulto (Tabla 5). Se han reportado muchas diferencias en la actividad de estos dos miembros de la familia NFAT, que se discutirán más adelante.

Sample	Chromatin State	Primary Motifs
Neonate	State 1: Poised Enhancer	TEAD3, TEAD1, TEAD4, ZNF354CK
Adult	State 1: Poised Enhancer	TEAD3, TEAD1, TEAD4, KLF13, WT1, EGR1 , ZNF740 .
Neonate	State 5: Active Transcription	No match
Adult	State 5: Active Transcription	Nr2e1, IRF3, IRF2
Neonate	State 6: Active Transcription	No match
Adult	State 6: Active Transcription	No match
Neonate	State 8: Low Active Enhancer	ELF3, ELK3, ETV6, ELF5, ETV2, ETS10 , ETV5, FEV, ETV1, ETV4, FLI1, ERG, ELK1, ERF, ETV3, PAX5, TBX4 , TBX5 , MGA, TBX15 , TBX1 , RUNX2, RUNX3 , RUNX1 , PEBB, ZNF354C
Adult	State 8: Low Active Enhancer	NFATC2 , NFAC4 , NFATC3 , FLI1, FEV, ETS2, ELK4 , GABP1 , Gabpa , ELK3, RUNX2, RUNX3 , RUNX1 , PEBB, ZNF354C, ETV7, EHF, ELF2
Neonate	State 9: High Active Enhancer	KLF13 , WT1, EGR1 , ZNF740 , NFATC2 , NFAC4 , NFATC3 , NFAT5 , NRF1, ZN639
Adult	State 9: High Active Enhancer	ELF5, ETV2, ELK1, ETS1, ETV6, ETV5, FEV, ETV1, ETV4, FLI1, ERG, ELK3, ERF, ETV3, RUNX2, RUNX3 , RUNX1 , PEBB, GLI2 , ZNF354C, TEAD3, TEAD1, TEAD4, NFAT5 , NFATC1 , NFATC3 ,
Neonate	State 10: Poised Promotor	SP1, SP2, SP3, WT1, EGR1 , KLF1, KLF5 , KLF4, KLF12, KLF14, SP8, KLF16, ZN148.
Adult	State 10: Poised Promotor	RUNX2, RUNX3 , RUNX1 , PEBB, ZNF354C, MECP2 , KLF13, WT1, EGR1 , ZNF740 .
Neonate	State 11: Active Promotor	SP1, EGR4, KLF1, KLF5, KLF4, KLF12, KLF14, SP8, KLF16, SP3, NRF1, ZN639
Adult	State 11: Active Promotor	SP1, EGR4, KLF16, EGR1 , ZN148, SP2

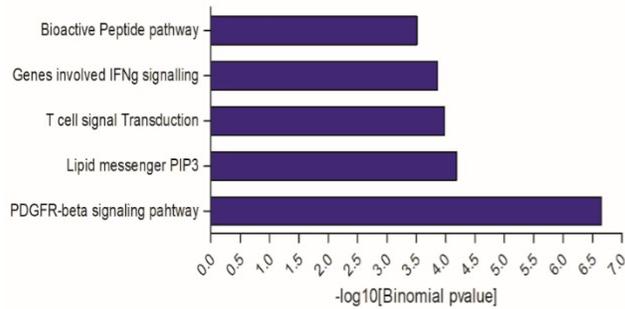
Tabla 5. Análisis de motivos de Factores transcripcionales en regiones regulatorias filtradas con el ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos. FTs únicos (Negritas) en todos los estados de la cromatina de neonato y adultos, FTs que están sobreexpresados en los datos de microarreglos de linfocitos T CD8⁺ de neonatos (Azul) y adultos (Rojo), FTs importantes en la activación y diferenciación del linfocito T (Morado).

Análisis de vías de señalización en las regiones regulatorias filtradas con el ATAC-seq de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

Para concluir nuestro análisis, se evaluaron las vías de señalización de los genes cercanos en las regiones regulatorias combinadas con las regiones del ATAC-seq en células T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos. A continuación, se muestran las vías de señalización obtenidas en 3 regiones regulatorias diferentes: *i*) regiones transcripcionalmente activas, *ii*) regiones con alta actividad de *enhancers*, y *iii*) regiones con *enhancers* con baja actividad (Figuras 38, 39 y 40).

Como se puede observar en la Figura 39, en las células de adulto se encontraron en las regiones transcripcionalmente activas, vías de señalización asociadas con la transducción de señales a través del TCR, como con metabolismo y señalización por IFN γ , mientras que en las células neonatales, sólo se encontró la vía de activación de células T.

A) Adultos



B) Neonatos

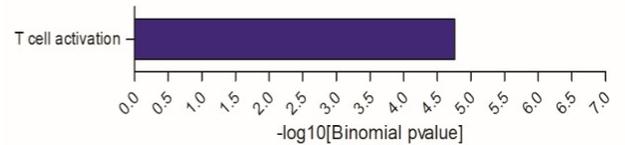
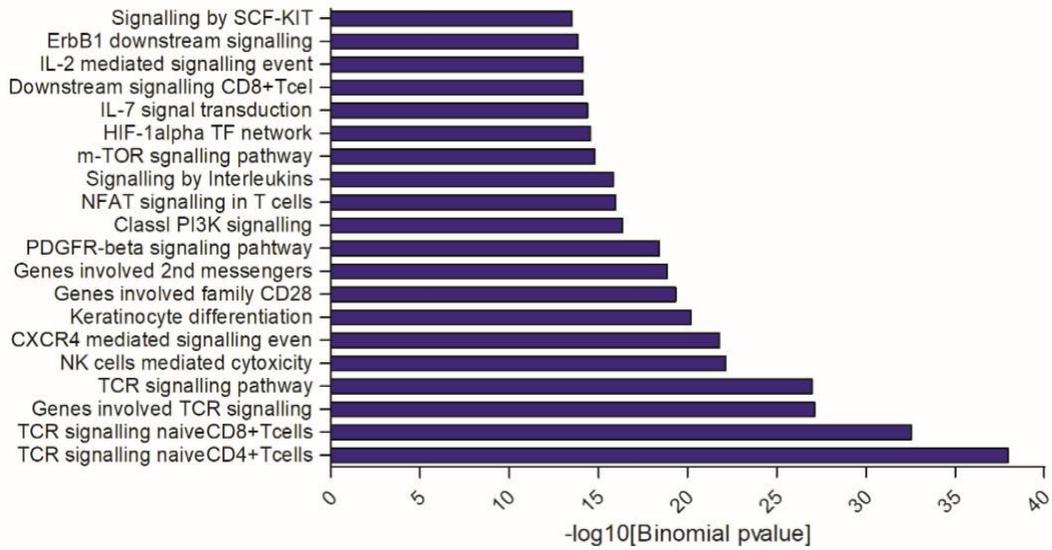


Figura 39. Análisis de vías de señalización en regiones transcripcionalmente activas de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos. A) vías de señalización en regiones de transcripción activa de linfocitos T CD8⁺ de adultos y B) neonatos significativas con un p value<0.05.

En *enhancers* con una alta actividad en las células T CD8⁺ de adulto, pudimos observar que las vías de señalización asociadas a estas regiones que participan en señalización asociada al TCR, activación de linfocitos, señalización mediada por NFAT y actividad citotóxica en las células de adulto (Figura 40). En células neonatales, en cambio, encontramos vías de señalización asociadas al procesamiento del RNA, splicing alternativo, elongación, transcripción (Figura 40B). Estos resultados, coinciden con datos publicados anteriormente (Galindo-Albarrán et al., 2016).

A) Adultos



B) Neonatos

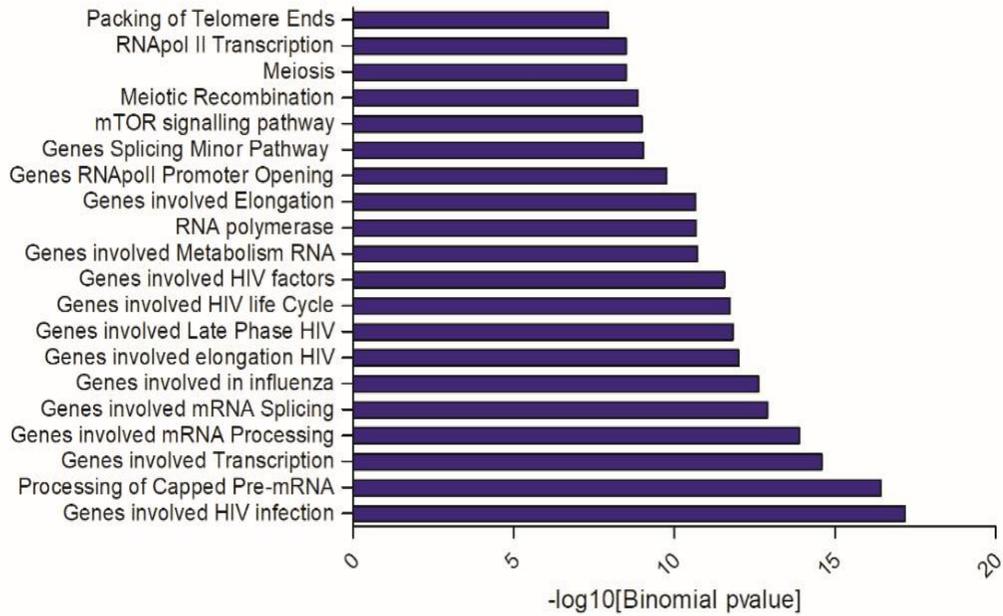
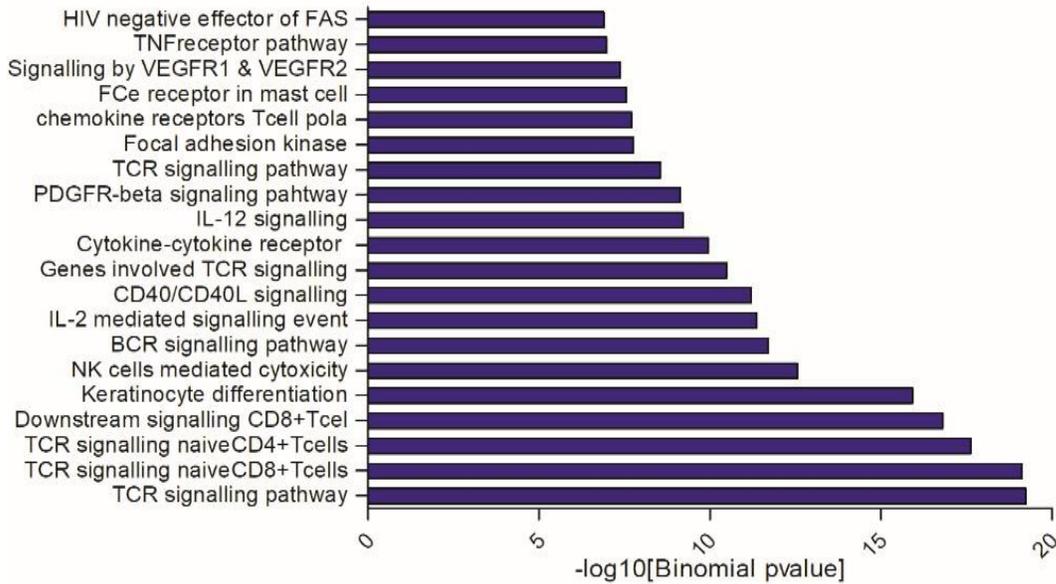


Figura 40. Análisis de vías de señalización en regiones de enhancers altamente activos de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos. A) vías de señalización en regiones de enhancers altamente activos de linfocitos T CD8⁺ de adultos y B) neonatos significativas con un p value<0.05.

En el caso de enhancers con baja actividad, pudimos observar que aunque son compartidas algunas de las vías de señalización entre las células de neonatos y adultos, como es el caso de la señalización del TCR y señalización de TCR en células T CD8⁺ y CD4⁺ de adultos (Figura 41), hubo vías de señalización exclusivas de las células neonatales y de adulto, como las asociadas a citotoxicidad en adulto y a hematopoyesis y metabolismo en las células neonatales.

A) Adultos



B) Neonatos

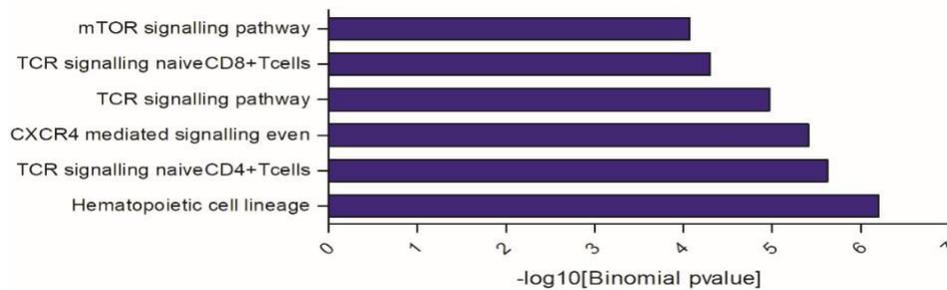


Figura 41. Análisis de vías de señalización en regiones de enhancers baja actividad de linfocitos

T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos. A) vías de señalización en regiones de *enhancers* de baja actividad de linfocitos T CD8⁺ de adultos y B) neonatos significativas con un p value < 0.05.

Conclusiones del Capítulo

En conjunto, el trabajo presentado en este capítulo nos permitió caracterizar Factores Transcripcionales importantes, cuyos motivos de unión se encuentran diferencialmente localizados tanto en los genes diferencialmente expresados en las células neonatales (Objetivo 1) como en regiones que definen los distintos estados de la cromatina de estas células (Objetivo 2).

Entre los factores transcripcionales reiteradamente encontrados a lo largo del trabajo, se encontraron BCL11A, TCF1 y LEF1, potencialmente asociados al cierre de la cromatina en las células neonatales. Por otra parte, encontramos que distintos miembros de la familia NFAT que pudieran participar en la expresión de genes específicos neonatales.

Faltaría evaluar los sitios duales AP-1-NFAT en comparación con sitios NFAT solos, ya que los primeros se han asociado con activación de células T, mientras que los segundos con

anergia, tolerancia y estado exhausto (Martinez et al., 2017). En particular, la dicotomía NFATc1 en los *enhancers* activos de las células de adulto y NFATc2 en las células neonatales pudiera ser definitoria de las diferencias transcriptómicas entre células neonatales y de adultos. Por falta de tiempo no pudimos realizar la búsqueda de estos sitios únicos y duales de AP-1/NFAT y su comparación con el transcriptoma de los linfocitos T CD8+ de neonatos y adultos.

Discusión General

En esta tesis encontramos que las células T CD8⁺ neonatales son capaces de reprogramar su transcriptoma en células similares a las del adulto bajo las señales fuertes proporcionadas por el TCR/IL-12. Esto se logró por la reducción de la expresión de genes de inmadurez y de genes inflamatorios tipo neutrófilo y la sobreexpresión de genes de citotoxicidad y señalización celular; y la reprogramación de la expresión de genes asociados con el metabolismo y la migración celular. El significado biológico de este estudio abre posibilidades de intervención en el campo de las vacunas y de tratamientos de neonatos en situaciones de infecciones graves, ya que demostramos que las células neonatales son capaces de madurar. Otra consideración importante que arroja este estudio es que hay un perfil inflamatorio que persiste en las células neonatales. El caracterizar la alta expresión de la sintasa de prostaglandinas y el eje IL-1 abre las puertas a cuáles pudieran ser moléculas diana para el tratamiento de estados inflamatorios severos en los neonatos.

Asimismo, avanzamos en la comprensión sobre los potenciales factores transcripcionales asociados con el particular paisaje epigenético y transcriptómico de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes neonatales. La potencial participación de los factores transcripcionales Bcl11A, Bcl1B, TCF1y LEF1 en las regiones promotoras de los genes sobreexpresados en las células T CD8⁺ neonatales. Esto nos da un primer indicio de la participación biológica de estos factores en mantener este perfil ligado a la proliferación homeostática y actividades dentro de la inmunidad innata. Esto permitiría hacer estudios de inferencia sobre las posibles vías que llevan al establecimiento de la inmunidad neonatal. Por otra parte, la presencia de los sitios de unión en regiones de enhancer de alta actividad de NFATc2 en las células neonatales y NFATc1 en las células de adulto es interesante porque nos hace preguntarnos si estos dos factores tienen funciones diferenciales a nivel de enhancers y diferentes asociaciones con otros factores de transcripción. Estos resultados nos sugieren a estos FTs como posibles candidatos que pudiera explicar la regulación del perfil transcriptómico y epigenético único de las células T CD8⁺ vírgenes neonatales.

Reprogramación transcripcional por las señales de la IL-12

En la primera parte reportamos que la estimulación de las células neonatales en la presencia de la IL-12 indujo la expresión de genes de señalización y citotoxicidad, permitiendo la maduración de las células T CD8⁺ neonatales (McCarron & Reen, 2010). Además, la estimulación por señales del TCR/IL-12 permitieron cambios importantes en el metabolismo y funciones celulares que pueden explicar el mejoramiento de la expansión clonal y la función de las células neonatales. Previamente mostramos que las células T CD8⁺ neonatales tienen una firma

transcriptómica y epigenética únicas, denotando inmadurez e inflamación tipo neutrófilo, con la baja señalización celular y actividad de genes de citotoxicidad (Galindo-Albarrán et al., 2016).

Nuestro trabajo mostró que la presencia de la IL-12 durante la estimulación indujo la reprogramación transcripcional de estas células únicas, para llegar a ser más cercanas a las células vírgenes de adulto (Figura 11 y 12). Observamos que la IL-12 incrementó el número de los genes expresados significativamente en ambas células, de adulto y neonatales (Figura 11). Los genes inducidos fueron asociados con la respuesta citotóxica y las funciones de las células T bona fide, con la inducción de IFN γ , T-bet, LFA1, Granzimas y FASL. Entre los genes inducidos por la estimulación del TCR/IL-12 encontramos a la IL-10, aunque los receptores para esta citocina se encontraron disminuidos en su expresión en condiciones de alta estimulación, presumiblemente permitiendo que las células neonatales disminuyan su alto umbral de activación, manteniendo la tolerancia en otras células. También se publicó que la IL-10 es mayor en las células neonatales y es inducida transitoriamente por la estimulación en presencia de la IL-12 (Rainsford & Reen, 2002).

También, la IL-12 indujo un estatus metabólico permisivo por la activación de las células T, fomentando el glucolisis, metabolismo NADH y NADPH, cadena respiratoria y síntesis de ácidos grasos, necesarios para el crecimiento de la célula y la membrana. Recientemente publicamos un modelo lógico que representa el papel de los reguladores metabólicos en la activación del TCR, enfocándonos en particular en las células T neonatales (Sánchez Villanueva et al., 2019). Este estudio indicó que la alta glucolisis y especies reactivas de oxígeno en la mitocondria de las células T CD8⁺ neonatales pueden ser responsables de la baja activación de las mismas por las señales del TCR. Esto se puede atribuir al poder reductivo resultado de la glucolisis, presumiblemente excretado de las células neonatales en la forma de H₂O₂ (Sánchez Villanueva et

al., 2019). Tentativamente, los cambios metabólicos inducidos por la estimulación del TCR/IL-12 pueden superar el metabolismo inmaduro, conduciendo a la activación propia de las células.

Las quimiocinas también cambiaron su expresión por las señales del TCR/IL-12, CCR9 y CXCR4 que permiten la migración al intestino y médula ósea fueron regulados negativamente, mientras que CCR1, que permite la migración a tejidos inflamatorios fue inducido. Nosotros y otros hemos sugerido que la migración de las células T esta alterada en neonatos (Labastida-Conde et al., 2018) (Lines et al., 2010) y CXCR4 fue encontrado previamente con baja expresión en las células T CD8+ neonatales bajo condiciones estimuladoras altas (Liang et al., 1998). Sin embargo, el efecto de la IL-12 en las células neonatales no solo se relacionó a la inducción de los genes sino también a la represión del 34.74% de los genes sobreexpresados en las células neonatales. Los genes que bajaron su expresión se asocian con inmadurez, respuesta tipo neutrófilo y migración hacia los órganos linfoides generativos y tejidos de mucosas. La expresión de los tres factores transcripcionales relacionados a hematopoyesis y el desarrollo de células T se encontraron con menor represión por las señales a través de TCR/IL-12, los cuales son HOXA3, MEOX1 y BCL11A. Los factores transcripcionales HOXA3 y MEOX1 se relacionan con el desarrollo de timocitos (S. Spicuglia comunicación verbal, datos no publicados). Sabemos que los factores transcripcionales HOXA se expresan ampliamente y juegan un papel en el control de la identidad celular y diferenciación de las HSC y progenitores (Taghon et al., 2003)(Magli et al., 1997). La expresión de estos factores es silenciada en células T cuando llegan a ser células completamente maduras (H. J. Lawrence et al., 1996).

Un perfil parcialmente inmaduro e inflamatorio se mantuvo en las células neonatales, ya que el 9.54% de los genes neonatales altamente expresados no respondieron a la estimulación (Figura 13, Clúster 1). Además, el 6.21% de los genes tuvieron una respuesta exacerbada a la

estimulación (Figura 13, clúster 5). Estos pueden explicar la alta respuesta inflamatoria de los neonatos a las infecciones.

Finalmente, evaluamos el estado de metilación del DNA de los promotores de un grupo de genes sobreexpresados y con baja expresión. De acuerdo con la inhibición de la expresión de los genes relacionados a neutrófilo, la metilación de los promotores de los genes que codifican para CEBPE, DEFA4 y CTSG se encontraron incrementados en las células neonatales durante la estimulación, particularmente en la presencia de IL-12. CEBPE es el factor transcripcional firma de neutrófilos. En contraste, la metilación de los promotores de los genes inducidos que codifican para LFA1 y GZMH disminuyó. Estos cambios fueron solamente observados en las células neonatales, sugiriendo un mecanismo epigenético que conduce a la reprogramación transcripcional inducida por la IL-12. Diferentes RNAs no codificantes fueron también inducidos o reprimidos por la IL-12, varios de ellos asociados con la maduración del RNA y traducción (Tabla 1).

El lncRNA NeST se encontró altamente expresado en las células neonatales en condiciones basales pero con una baja expresión al adicionar la IL-12 a las condiciones estimuladoras, solamente en las células neonatales. Se reportó que este lncRNA controla epigenéticamente la expresión del gene de IFN γ , que concordó con nuestras observaciones (Gomez et al., 2013).

STAT4 es el factor transcripcional activado por la IL-12 que ha sido reportado para el control del paisaje epigenético de las células T CD4⁺ y está asociado con la cromatina tanto represiva como activa en las células T CD4⁺ (O'Sullivan et al., 2004). Por otro lado, STAT4 induce la expresión de la metiltransferasa MIL1, que es necesaria para la diferenciación de las células T al perfil Th1 y su proliferación. Por otro lado, STAT4 reprime la asociación de la DNA metiltransferasa 3A con el DNA (Pham et al., 2014), que es un antagonista del fenotipo Th1. STAT4 es necesario para el remodelamiento del locus de CD25 durante la activación y junto con

T-bet recientemente se encontró que controlan los cambios de la metilación del DNA de IFN γ (Kevin Range, 2012).

En conjunto, nuestros resultados muestran que la estimulación en presencia de la IL-12 induce la reprogramación transcripcional de las células T CD8⁺ neonatales, que conducen a su maduración y funcionabilidad, presumiblemente a través de mecanismos epigenéticos.

Un elemento importante durante la activación y diferenciación de las células T son las células presentadoras de antígeno como son las células dendríticas, porque son las principales productoras de la IL-12. Sin embargo, las células dendríticas se encuentran en menor proporción en los neonatos en comparación con los adultos (Basha et al., 2014), además estas células neonatales tienen reprimido el gen de la subunidad p35 de la IL-12, en consecuencia los neonatos no expresan IL-12 (Vanden Eijnden et al., 2006). Previamente se reportó que al regular la producción de IL-12 en las células dendríticas neonatales favorece la producción de IFN γ y disminuye la apoptosis en las células Th1 (Lee et al., 2008). Estos resultados nos sugieren, que sería importante evaluar en el futuro la producción de la IL-12 en las células dendríticas neonatales y su efecto en las células T CD8⁺ de neonato *in vivo*.

Motivos de unión de factores transcripcionales ligados a regiones regulatorias.

La segunda parte del trabajo consistió en encontrar los motivos de unión a factores transcripcionales en las regiones promotoras de los clústeres de genes previamente definidos en el laboratorio como sobreexpresados en células T CD8⁺ vírgenes neonatales y de adulto. Estos análisis nos arrojaron dos resultados importantes. Por una parte la potencial participación de los factores transcripcionales Bcl11A, Bcl1B, TCF1y LEF1 en las células neonatales. Asimismo,

encontramos motivos de unión de factores transcripcionales NFAT, validados en casi todos los clústeres. Sin embargo, los factores transcripcionales que forman el factor AP-1 se encontraron enriquecidos sólo en el clúster de citotoxicidad. Esto sugeriría que los genes asociados a citotoxicidad dependen de los sitios de NFATC1 con la interacción de AP-1, de acuerdo con reportes en modelos murinos, en los que se reporta que la unión de NFAT sin AP-1 se asocia con anergia, mientras que NFAT-AP-1 se asocia con activación y diferenciación en células efectoras (Martinez et al., 2017)(Schietinger & Greenberg, 2014)

Para comprender el perfil único del transcriptoma y epigenoma de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes neonatales, en esta parte del proyecto se definieron 11 diferentes estados de la cromatina con el programa ChromHMM a partir de los mejores datos crudos de los ChIP-seq de seis marcas de histonas de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos (Figura 36). Estos once estados nos ayudaron a definir las regiones regulatorias en los linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos. Este análisis anteriormente se había realizado con datos preprocesados de los ChIP-seq de diferentes marcas de histona de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos por los consorcios Blueprint y Roadmap. mientras que nosotros partimos de varias repeticiones biológicas y datos crudos de un solo consorcio, que se sometieron a un escrutinio muy fuerte para filtrar la calidad de los datos. Aunque muchos de los resultados se corroboraron, obtuvimos mayor certidumbre en nuestro análisis. Además, pudimos reportar la localización de estos estados de la cromatina en las regiones del genoma, ayudando a tener un análisis más fino para definir las once regiones regulatorias.

Corroboramos la localización de cada región regulatoria definida, con los genes control de GAPDH e IVL, el control positivo para las regiones de apertura coincidió con el cuerpo del gen y la región promotora de GAPDH (Figura 37A), por otro lado el control positivo para las regiones

asociadas a heterocromatina y regiones quiescentes coincidieron con la región donde se encontraba el gen de IVL (Figura 37B).

Una vez que definimos las regiones regulatorias de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos, quisimos saber que sitios de unión a factores transcripcionales pudieran encontrarse en estas regiones. Por lo que se realizó un primer análisis de la búsqueda de sitios de unión nuevos de factores transcripcionales en las regiones regulatorias, en el cual se observó que la mayoría de sitios de unión encontrados en las regiones regulatorias de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos con el programa peak-motifs, eran miembros de la familia de factores transcripcionales Homeobox, miembros de la familia de proteínas con dominio TEA (TEAD) y miembros de la familia de proteínas específicas (SP) (Tabla 4A y B). También se encontraron. Motivos de unión a NFATC1, 2, 3 y NFAT5, aunque las diferencias entre células neonatales u de adulto no fue clara en este primer análisis.

Cabe mencionar que a TEAD1 se une a diferentes coactivadores formando diferentes complejos que regulan la expresión de genes que son clave para el desarrollo embrionario, formación de órganos como corazón y músculos y que están involucrados en la proliferación y muerte celular. Se reportó que al tener deficiente al coactivador TAZ y la sobreexpresión de TEAD1 en linfocitos T CD4⁺, se induce a la diferenciación a células Tregs (Geng et al., 2017). Así también, se reportó que TEAD1 en musculo esquelético en ratón induce genes que juegan un importante papel en las vías de señalización de MAPK, mTOR, receptor de células T, JAK-STAT, calcineurina y señalización por insulina y también induce la expresión de FOXO3A que su expresión puede ser regulada por calcineurina/MEF2/NFAT y IGF-1/PI3K/AKT en las células de musculo esquelético (Qiu et al., 2011). Esto nos pudiera dar un indicio de lo que genes blanco tiene TEAD1 en las regiones transcripcionalmente activas en los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y

adultos, también podría ser un candidato para regular la cromatina de los linfocitos T CD8⁺ ya que la interacción de TEAD1 con su coactivador YAP1, median la unión a la cromatina y permiten la activación de *enhancers* distales que son marcados con H3K27ac en diferentes líneas celulares de cáncer (Stein et al., 2015).

La saturación de los sitios de unión de factores transcripcionales que son considerados maestros reguladores, porque participan en diferentes procesos biológicos, nos opacó inicialmente la búsqueda de sitios de factores transcripcionales diferenciales en las células neonatales en comparación con los adultos. Decidimos hacer un segundo análisis de búsqueda de motivos de FTs, pero ahora colocando como background las regiones regulatorias de neonatos o de adultos. Este nuevo análisis, nos dio un número menor de FTs que pudieran estar relacionados a los motivos que se encontraron en la búsqueda. Sin embargo, nos volvieron a salir FTs pertenecientes a la familia SP y homeobox (Tabla 4A y B).

A pesar de que los motivos de los factores transcripcionales asociados a las regiones regulatorias en las células neonatales en su mayoría eran factores que podemos encontrar a lo largo del genoma. Se observó en las regiones de *enhancers* con baja actividad, estaban presentes los motivos de RUNX1, BCL11A e IRF4 (Tabla 4A). Estos factores anteriormente se reportaron sobreexpresados en los linfocitos T CD8⁺ vírgenes neonatales (Galindo-Albarrán et al., 2016).

También encontramos otro factor transcripcional reportado que se encuentra sobreexpresado en los linfocitos T CD8⁺ neonatales, Factor de respuesta a crecimiento temprano 1 (Early Growth response, siglas en inglés, EGR1) pertenece a la familia de proteínas de respuesta a crecimiento temprano que son proteínas de dedos de zinc que se pueden unir al DNA. Aunque la localización de este factor no fue claramente distinta entre las células neonatales y de adulto (Tabla 3A), pudiera ser relevante en la funcionalidad de ambos tipos celulares, asociado a otros

factores transcripcionales. Este factor transcripcional puede interactuar con NFAT e inducir la transcripción de diferentes citocinas proinflamatorias en los linfocitos T de sangre periférica (Decker et al., 2003), también se ha observado que participa en la regulación de la expresión del gen T-bet en células T activadas (Shin et al., 2009).

EGR-1 se asocia con otros factores transcripcionales, como SF-1 para la regulación de la hormona luteinizante 1 β (LH- β), con ReLA en la regulación de la transcripción de NFKB1 (p50)(Decker et al., 2003). La interacción con SP1 induce la expresión de M-CSF (Decker et al., 2003). Además, estos dos factores, junto con NFAT, son responsables de la coordinación de la expresión de las citocinas IL-2 y TNF (Decker et al., 2003). En megacariocitos, se reportó que EGR-1 interactúa con NFATc2, modulando la expresión de CD40L. Esto implica que la combinatoria de estos factores transcripcionales pudieran estar implicados en la regulación de la vía inflamatoria y actividad inmunomoduladora de las plaquetas (Crist et al., 2013).

Se ha reportado la interacción de EGR-1 con diferentes complejos que participan en la regulación del epigenoma, como CBP/p300 en la transcripción del gen de la lipoxigenasa (Spaapen et al., 2013). Con el complejo represivo Polycomb, este complejo es capaz de remodelar la cromatina silenciando genes importantes durante el desarrollo en células condrogénicas (Spaapen et al., 2013). Estas interacciones con complejos reguladores de la cromatina pudieran ser relevantes para ser un candidato para evaluar como regulador de la transcripción y epigenética de los linfocitos T CD8⁺ neonatales.

Una manera de confirmar los sitios de unión de los factores transcripcionales fue evaluar el sobrelape de los CHIP-se de los FTs, ya que no contamos con los CHIP-seq de todos los FTs en linfocitos T CD8⁺ de neonato o adulto. Decidimos utilizar los CHIP-seq de los FTs de cinco líneas

celulares GM12878, JURKAT, ESC, células CD34+ y linfocitos T CD4+ Th1 y sobrelapar estos ChIP-seq con las regiones regulatorias en linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

En este análisis observamos que el FT EGR1 de la línea celular linfoide GM12878 se encontró sobrelapado en los promotores activos y en estado *poised* (Figura 38B), esto coincidió con el motivo encontrado por peak-motifs (Tabla 4). Este resultado nos da más fuerza para creer que EGR1 tiene un papel importante en la regulación transcriptómica y epigenética de los linfocitos T CD8⁺ neonatales.

Otro FT importante que ya se había reportado sobreexpresado en las células neonatales es BCL11A. Se validó su motivo de unión por el sobrelape de los datos de ChIP-seq de este FT en las regiones de baja actividad de *enhancers* en las células madre (Figura 38).

Los factores transcripcionales pertenecientes a la familia SP, se evaluaron en las distintas líneas celulares. Sin embargo para estos factores no coincidieron con los motivos de unión que encontramos en las regiones regulatorias de los linfocitos (Figura 38 y Tabla 4).

Un esfuerzo adicional por observar los sitios de unión de factores transcripcionales diferenciales entre neonatos y adultos fue realizar los experimentos de ChIP-seq. Utilizamos las regiones abiertas, representadas por picos en el análisis de ATAC-seq obtenido en nuestro laboratorio de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos, para filtrar los motivos de unión a FT en cromatina abierta.

En este análisis de búsqueda de motivos en las regiones regulatorias filtradas con el ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos, encontramos que el motivo de unión al FT EGR1 estaba localizado en regiones promotoras en estado *poised* (Tabla 5), coincidiendo con el primer análisis (Tabla 4) y con el sobrelape del FT en estas regiones (Figura

38). También encontramos este FT en las regiones de *enhancers* con alta actividad. Se observo también en las regiones de *enhancers* en estado *poised*, promotores *poised* y activos en las células de adulto (Tabla 5).

En las regiones de transcripción activa de células T CD8⁺ vírgenes de neonato no encontramos FTs asociados a los sitios de unión generados por el programa peak-motifs. Sin embargo en las células de adulto, encontramos exclusivamente los sitios de unión de los FTs regulatorios de interferón (IRFs) 2 y 3 (Tabla 5). El Factor regulatorio de Interferón 2 (siglas en inglés, IRF2) pertenece a la familia de factores regulatorios de interferón (IRFs) que poseen dominios de unión al DNA hélice-vuelta-hélice. IRF-1 y IRF-2 funcionan como activadores y represores de los genes de IFN γ / β , IRF-2 actúa como regulador negativo, atenuando la transcripción de los genes inducidos por IFN γ / β (Taniguchi et al., 2001). También actúa como atenuador transcripcional del gen estimulado por interferón factor 3 (ISGF3) (Taniguchi et al., 2001). IRF-2 funciona como activador transcripcional de la molécula de adhesión vascular (VCAM-1) y del gen de la histona H4 (Taniguchi et al., 2001). IRF-2 contribuye a la expresión de IL-12 en macrófagos junto con el factor transcripcional IRF-8 (Taniguchi et al., 2001). Se ha reportado recientemente que es un activador transcripcional de la caspasa-4 y es importante en la activación de la vía no canónica del inflamasoma (Thygesen & Stacey, 2019). Otro papel regulatorio negativo asociado con IRF-2 es la neutralización de la IL-3, que disminuye el tamaño de la población de basófilos y la secreción de la IL-4, afectando la polarización hacia el perfil Th2 de los linfocitos T CD4⁺ en ratón (Hida et al., 2005). IRF2 también induce la expresión de TLR3 e impacta en las modificaciones de histonas H3K9ac, H3K14ac y H3K4me3 en el promotor de TLR3 en estado no estimulado en células Hela (Ren et al., 2015).

Otro factor relevante que encontramos en las regiones de transcripción activa en células de adulto es el factor regulatorio de interferón 3 (siglas en inglés, IRF3), se expresa constitutivamente en todos los tejidos, pero no es inducido por las infecciones virales o tratamiento con IFN (Taniguchi et al., 2001). Este factor transcripcional está involucrado en la regulación de las respuestas inmunes innatas, también sus genes blancos son de diferentes citocinas y quimiocinas CXCL10, RANTES, IL12p35, IL15, genes de IFN tipo I y la arginasa II (Yanai et al., 2018). En células T y células presentadoras de antígeno de ratón, IRF3 es requerido para una óptima función efectora en las células T, ya que se observó que las células T que son deficientes de IRF3 significativamente decrece la producción de IFN γ , IL-17 y Granzima B (Daniel Harris, BA, Lynn McNicoll, MD, Gary Epstein-Lubow, MD, and Kali S. Thomas, 2017). Se observo también que IRF3 contribuye en la expresión de Foxp3 (Daniel Harris, BA, Lynn McNicoll, MD, Gary Epstein-Lubow, MD, and Kali S. Thomas, 2017). Aunque se reportó que la deficiencia de IRF-3 no impacta la diferenciación de las células Th1, Th2 y Th17 y Tregs (Yanai et al., 2018), pudieran existir proteínas redundantes que suplen su rol. En el papel como regulador de la cromatina se ha observado que al activar IRF-3 en residuos específicos de serina por la cinasa TBK1 o el inhibidor de la cinasa de NF- κ B, se promueve su asociación con p300/CBP, favoreciendo la unión específica a IFN γ (Taniguchi et al., 2001).

En las regiones de potenciadores con baja actividad, pudimos observar en las células neonatales, se encontró el sitio de unión exclusivo del FT ETV6, el cual juega un papel importante en la hematopoyesis y en el desarrollo embrionario (Das C, Lucia MS, 2017). Además, en comparación con las células de adulto, se observó la presencia de dos miembros de la familia NFAT que son NFATC2 y 3. Estos factores no se encontraron en potenciadores con baja actividad en las células neonatales, ya que NFATC2 se encontró en potenciadores activos en neonatos (Tabla

5). El factor de activación de células T 3 (NFATC3), regula la expresión de diferentes genes involucrados en la activación de células T, regula la proliferación al controlar la expresión de IL-2 y se ha observado que regula a COX2 en células endoteliales (Urso et al., 2011).

Otras regiones en las que encontramos FTs relevantes en este estudio fue en las regiones de *enhancers* con alta actividad, en las células de adultos encontramos a los FTs RUNX3, NFATC1 y TEAD1 que se habían reportado anteriormente sobreexpresados en linfocitos T CD8⁺. En estas mismas regiones pudimos observar que en las células neonatales se encuentran otros miembros de la familia NFAT que son NFATC2, NFATC3 y NFAT5. Los diferentes papeles que juegan los diferentes miembros de la familia NFAT en la célula podrían ayudarnos a explicar la gran diferencia entre los linfocitos T CD8⁺ de neonato y adulto. Los miembros de la familia NFAT mejor estudiados son NFATc1 (NFAT2) y NFATc2(NFAT1). NFATc2 tiene una importante participación en la expresión de genes relacionados a anergia, mientras que la translocación nuclear de NFATc2 es bloqueada en células T anérgicas (Srinivasan & Frauwirth, 2007). NFATc1 regula las funciones efectoras de los linfocitos T CD8⁺ y es relevante en la reorganización del citoesqueleto y el reclutamiento de organelos citosólicos en la sinapsis inmunológica de los linfocitos T CD8⁺ (Klein-Hessling et al., 2017). La expresión de NFATc2 pero no de NFATc1 y la unión de NFATc2 en el promotor de TNF , mejora su síntesis a nivel de transcripción del gen en células T humanas, mientras que ambos NFATs son necesarios para la expresión de IL-2 (Kaminuma et al., 2008). La estimulación con la IL-15 en las células T promueve el reclutamiento de NFATc2 pero no de NFATc1 al promotor de CX3CR1 que es el receptor de la quimiocina CX3CL1, mientras que la IL-2 tiene un efecto opuesto en el reclutamiento de los NFATs(Barlic et al., 2004). NFATc2 activa genes relevantes para la diferenciación Th2, pero las proteínas NFAT también han demostrado median un ciclo de retroalimentación negativa que limita la transcripción

de IL-4, también es importante durante la diferenciación a Th17 porque juega un papel regulatorio por controlar la activación de las células T dependientes de IL-6(Hermann-Kleiter & Baier, 2010). Otra función atribuida para NFATc2 es que este factor es crítico para la generación de células T CD8⁺ efectoras mientras que NFATc1 promueve células T CD8⁺ citotóxicas de memoria(Xu et al., 2019). El factor transcripcional AP-1 (conformado por miembros de las familias de Fos y Jun) son los principales compañeros a los cuales se une las proteínas NFATs, activando a genes importantes en la activación de las células T como es el gen de IL-2(Serfling et al., 2006)(Wray, 2017). También al ser inducidas las células T con IL-12, favorece el perfil Th1, ya que se observa que NFAT puede interactuar con AP-1, T-bet, Runx3 permitiendo la transcripción genes como IFN y Tbx21 (Hermann-Kleiter & Baier, 2010). Sin embargo, cuando las células T primarias son infectadas con un retrovirus para que expresen constitutivamente a NFATc2 que es incapaz de unirse a AP-1 resulta en una fuerte inducción de anergia en las células T (Wray, 2017) (Martinez et al., 2017). También se ha observado que cuando las células T CD8⁺ expresan un NFATc2 incapaz de interactuar con AP-1 disminuye la señalización del TCR, incrementa la expresión de receptores inhibitorios e interfiere con la habilidad de las células T CD8⁺ para la protección contra Listeria, también se ha observado que NFATc2 con la cooperación de AP-1 promueve la expresión de genes relacionados al fenotipo exhausto en las células T CD8⁺ (Martinez et al., 2017).

Otro miembro de la familia NFAT que observamos en este análisis es NFATc3, el cual regula la transcripción de genes involucrados en la activación y desarrollo de las células T(Urso et al., 2011). Sin embargo, se ha descrito que NFATc3 también regula la expresión de COX2 y genes asociados a la angiogénesis en células endoteliales y en células T (Urso et al., 2011). NFATc2 y NFATc3 median el efecto de supresión de las Tregs en las células T responsivas convencionales (Serfling et al., 2006). También NFATc4 tiene un diferente papel, él puede interactuar con GATA-

4 y regular a un número de genes que controlan hipertrofia cardiaca (Serfling et al., 2006). El ultimo miembro que describiremos de la familia NFAT es NFAT5 que es relevante en el desarrollo de los timocitos y es relevante para la expresión de genes con función apoptótica, es importante en el balance de células Tregs y células T helper efectoras en diferentes modelos de inflamación, también incrementa su expresión en respuesta a hipertoncidad, productos microbianos y estímulos inflamatorios(Aramburu & López-Rodríguez, 2019).

Otra parte del análisis fue la evaluación de las vías de señalización a las que pertenecían los genes que estaban cercanos a estas regiones regulatorias. Este análisis se realizó con el programa GREAT. No se observaron cambios en las regiones promotoras *poised*, activas y en las regiones de heterocromatina y regiones quiescentes de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adulto. Sin embargo, se observó que las regiones transcripcionalmente activas en los linfocitos T CD8⁺ de adulto se asociaron vías de señalización de IFN γ , transducción de señales y metabolismo mientras que en las células neonatales que solo se encontraron genes relacionados a la activación de las células T (Figura 39).

En el caso de los *enhancer* de baja actividad, se observó que las vías de señalización cambiaban un poco más entre los adultos y neonatos. En las células de adulto se encontraron genes relacionados con la señalización río debajo de las células T CD8⁺, al TCR, señalización de IL-12, quimiocinas y citocinas y los receptores de citocinas, en comparación con las células neonatales encontramos la señalización del TCR, mTOR y todavía aparece linaje hematopoyético (Figura 41). Pero las regiones que más cambiaron entre los linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos fueron las regiones de *enhancer* con alta actividad. En estas regiones encontramos en las células de adultos vías de señalización asociadas a un linfocito T CD8⁺ maduro, como son la vía del TCR, IL-12, mTOR, IL-7 y la vías de señalización de PI3K, mientras que en las células neonatales, las

vías de señalización asociadas a estas regiones de *enhancer* con alta actividad muestran vías de señalización inmaduras tal es el caso de vías asociadas al procesamiento del mRNA, metabolismo del mRNA, splicing del mRNA y vías asociadas a la transcripción de genes (Figura 40).

Esto nos permite concluir que las regiones que tienen que ver más con las diferencias en el perfil transcriptómico de los linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos son las regiones de *enhancer* de alta actividad, así también la diferencia en los sitios de unión de los factores transcripcionales pertenecientes a la familia NFAT que son NFATC1 y NFATC2 en las regiones de *enhancer* de alta actividad.

Anexos

Anexo 1. Purificación

Purificación de PBMCs /CBMCs

Nota:

Adultos. Antes de iniciar checar paquetes de Buffy Coats que contengan aprox. 60-80 ml en total, ya que paquetes con mayor cantidad son provenientes de otro método de separación.

Neonatos. Si la cantidad total de sangre es 30ml separar en dos tubos 15 ml, si es menor a 20ml utilizarla toda en un solo tubo en el siguiente.

- Tomar 20 ml de sangre (proveniente de Buffy Coats o sangre de cordón) depositándola en un tubo falcón estéril.
- Colocar 15 ml de PBS 1X y mezclar por inversión.
Nota: Si la sangre contenida en el tubo es >20ml, aforar hasta 35 ml con PBS 1X.
- En otro tubo estéril poner 10 ml de Ficoll, verter lentamente la mezcla de sangre-PBS1X, sin romper el gradiente formado.
Nota: Entre más diluida la sangre, es más fácil romper el gradiente, hacer lo más lento posible.

Sangre adultos:

- Centrifugar a 20 °C por 30 min a 1500rpm sin desaceleración, desac=0 , acel=9.

Sangre neonatos:

- Centrifugar a 20 °C por 30 min a 1400rpm sin desaceleración, desac=0, acel=9.

- Extraer toda la interfase blanca con ayuda de una pipeta.

Nota: Si se va a realizar después la purificación de Linfocitos T CD8 o CD4, **guardar 2 ml de eritrocitos** (tomar los eritrocitos de la fase roja, la última capa que se formó en el Ficoll) y adicionar **8 ml de RPMI** suplementado 5% con SFB, colocarlo en una caja petri e incubar toda la noche a 37°C, 5% de CO2.

- Realizar un lavado, aforar a 50 ml con PBS 1x.

Sangre Adultos:

- Centrifugar a 20°C por 10 min a 1400 rpm.

Sangre Neonatos:

- Centrifugar a 20°C por 10 min a 1300 rpm.
- Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en seco.
- Adicionar 10 ml de medio RPMI 5% para realizar el conteo de células. Conteo de células

- Mezclar 10 µl de la muestra y 190 µl de PBS 1X.
- Tomar 20 µl de la mezcla de muestra/PBS1X.
- Agregar 20 µl de azul de tripán.
- Resuspender y colocar en la cámara de Neubauer.
- Realiza el conteo

de células x40x10000 = células/ml x 10 ml en los que están resuspendida la muestra =
#células totales

Adherencia a Plástico

- Poner 10 ml de RPMI c/células en una caja petri (Nota: La concentración de células por mililitro de medio es entre $7-9 \times 10^6$ células).
- Incubar toda la noche a 37°C, 5% de CO₂. (Para eliminar monocitos).

Perlas Magnéticas.

Realizar este paso en caso de querer eliminar células T de memoria en el caso de los adultos o eliminar células B, monocitos y CD4 contaminantes en el caso de neonato.

- ✓ En dos tubos eppendorf de 1.5 ml adicionar en cada tubo:
 - 20 ul de perlas magnéticas (PIERCE, PROTEIN A/G MAGNETIC BEADS, #PROD 88803) para el caso de adulto
 - 10 ul de perlas magnéticas en el caso de neonato parto natural.
 - 5 ul de perlas magnéticas en el caso de neonata cesárea.
- ✓ Adicionar 1 ml de Buffer de entrecruzamiento (PBS, 2% SFB).
- ✓ Unir a rack magnético durante 2-5 minutos.
- ✓ Sacar sobrenadante de cada tubo y desecharlo (Sin despegar el tubo del rack magnético).
- ✓ Adicionar 1 ml de Buffer de entrecruzamiento.
- ✓ Adicionar anticuerpos:

Muestra	Anticuerpos	Tubo 1	Tubo 2
---------	-------------	--------	--------

Adulto	CD45RO (Tonbo,0.5mg/ml) CD44 (tonbo,0.5mg/ml)	6ul (3ug) 2ul(1ug)	6ul(3ug) 2ul(1ug)
Neonato Parto Natural	B220 (Tonbo,0.5mg/ml) CD11b (Tonbo,0.5mg/ml)	1ul(0.5ug) 2ul(1ug)	1ul(0.5ug) 2ul(1ug)
Neonato Cesárea	B220* (Tonbo,0.1ug/ul) CD11b (Tonbo,0.5mg/ml) CD4* (Tonbo,0.1ug/ul)	1ul(0.1ug) 1ul(0.5ug) 1ul(0.1ug)	1ul(0.1ug) 1ul(0.5ug) 1ul(0.1ug)

*Anticuerpos diluidos que quedaron a una concentración de 0.1ug/ul.

Nota: Esto es para una sola muestra de Adulto o Neonato, máximo se puede poner en cada tubo para 3 muestras.

- Incubar a 4°C durante toda la noche (mínimo puede incubarse 8 hr.) en agitación en el “rostickero”.

Purificación de Linfocitos T CD8⁺ vírgenes

Al día siguiente de la adherencia a plástico:

- Recolectar las células en un tubo falcón, dando lavados a la caja petri con el mismo medio que contienen, para traernos las células que no se adhirieron.

Adultos:

- Centrifugar a 20°C por 10 min a 1400 rpm.

Neonatos:

- Centrifugar a 20°C por 10 min a 1300 rpm.
- Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en seco.
- Adicionar 5 ml de RPMI 5%
- Realizar el conteo de células.

Conteo de células

- Mezclar 10 µl de la muestra y 190 µl de PBS 1X.
- Tomar 20 µl de la mezcla de muestra/PBS1X.
- Agregar 20 µl de azul de tripán.
- Resuspender y colocar en la cámara de Neubauer.

- Realiza el conteo

de células $\times 40 \times 10000 = \text{células/ml} \times 10 \text{ ml}$ en los que están resuspendida la muestra =
#células totales

- Una vez realizado el conteo, guardar 2×10^6 de PBMCs para controles de tinción.
- Sacar la caja petri con los eritrocitos que se guardaron la noche anterior, dar lavados a la caja petri con el mismo medio que contiene, antes de adicionarlos al tubo de PBMCs.
- Adicionar 5 ml de Eritrocitos al tubo falcón con PBMCs,
 - Nota: EL volumen final de la mezcla de eritrocitos-PBMCs-RPMI es de 10 ml.
- Adicionar el RossetSep para CD8, adicionando la siguiente cantidad:

Por cada 300×10^6 células adicionar **110 ul de RossetSep** de CD8 (en el caso de **Adultos**) o **120 ul de RossetSep** de CD8 (en el caso de **Neonato parto/cesárea**).

- Dejar incubando a T.A. durante 42-45 minutos en agitación leve (Poner el agitador a una velocidad de rotación de ROTATE/ROCK =7:14).
- En un tubo falcón estéril poner 10 ml de Ficoll, verter lentamente las células con RossetSep, sin romper el gradiente formado.

Adulto:

- Centrifugar a 20 °C por 30 min a 1500 rpm sin desaceleración, desac=0, acel=9.

Neonato:

- Centrifugar a 20 °C por 30 min a 1400 rpm sin desaceleración, desac=0, acel=9.
- Extraer toda la interfase blanca con ayuda de una pipeta (En esta interfase se encuentran los linfocitos T CD8+).
- Realizar un lavado aforando a 50 ml con PBS 1x.

Adultos:

- Centrifugar a 20°C por 10 min a 1400 rpm.

Neonatos:

- Centrifugar a 20°C por 10 min a 1300 rpm.
- Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en seco.
- Adicionar 1 ml de medio RPMI 5%

NOTA: Guardar $\sim 2 \times 10^6$ de Linfocitos T CD8+ totales antes de eliminar memoria para el caso de los adultos.

En este punto decidir si ocupamos células vírgenes o de memoria (en el caso del adulto), si ocupamos vírgenes realizar la selección negativa con perlas magnéticas preparadas para adultos.

En el caso del neonato realizar la selección negativa con perlas magnéticas.

Selección Negativa Perlas Magnéticas.

Tomar el Tubo 1 de perlas magnéticas incubadas la noche anterior:

- ✓ Unir a rack magnético durante 2-5 minutos.
- ✓ Sacar sobrenadante de cada tubo y desecharlo (Sin despegar el tubo del rack magnético).
- ✓ Adicionar 1 ml de Buffer de entrecruzamiento, para realizar lavado y retirar el anticuerpo que no se pegó a las perlas.
- ✓ Unir a rack magnético durante 2-5 minutos.
- ✓ Sacar sobrenadante de cada tubo y desecharlo (Sin despegar el tubo del rack magnético).
- ✓ Adicionar el mililitro de RPMI c/ células
- ✓ Incubar a 4°C durante 1 hora en roscicero.
- Después de haber transcurrido el tiempo de incubación
- Unir a rack magnético durante 2-5 minutos.
- Sacar sobrenadante del tubo y ponerlo en un tubo nuevo (Sin despegar el tubo del rack magnético).
- Unir el tubo nuevo en el rack magnético durante 2-5 min.
- Realizar estos pasos por lo menos 3 veces más (Esto para asegurarnos de que el sobrenadante ya no tenga más perlas magnéticas, las cuales traen unidas las células que queremos eliminar).

- Antes de la última repetición realizar lo siguiente:

Tomar el Tubo 2 de perlas magnéticas incubadas la noche anterior:

- ✓ Unir a rack magnético durante 2-5 minutos.
- ✓ Sacar sobrenadante de cada tubo y desecharlo (Sin despegar el tubo del rack magnético).
- ✓ Adicionar 1 ml de Buffer de entrecruzamiento, para realizar lavado y retirar el anticuerpo que no se pegó a las perlas.
- ✓ Unir a rack magnético durante 2-5 minutos.
- ✓ Sacar sobrenadante de cada tubo y desecharlo (Sin despegar el tubo del rack magnético).

- ✓ Adicionar el mililitro de RPMI c/ células del Tubo 1 (Después de haberlo pasado 3 veces por el rack)
- ✓ Incubar a 4°C durante 2 horas en roscicero.

- Después de haber transcurrido el tiempo de incubación
- Unir a rack magnético durante 2-5 minutos.

- Sacar sobrenadante del tubo y ponerlo en un tubo nuevo (Sin despegar el tubo del rack magnético).
- Unir el tubo nuevo en el rack magnético durante 2-5 min.
- Realizar estos pasos por lo menos 5 veces más (Esto para asegurarnos de que el sobrenadante ya no tenga más perlas magnéticas, las cuales traen unidas las células que queremos eliminar).
- En el último paso ya no unir el tubo al rack magnético.
- Centrifugar a 3500 rpm durante 5 min
- Decantar sobrenadante
- Resuspender en seco

Si son Linfocitos T de neonato, realizar los pasos de lisis de eritrocitos (si el pellet se observa rojo todavía), sino adicionar 1ml de RPMI 5%.

Si son células de adulto adicionar 1 ml de RPMI 5% y contar las células y dejar restablecer por lo menos dos horas a 37°C, 5% de CO₂ antes de utilizarlas.

Lisis de eritrocitos

NOTA: Preparar el buffer de lisis de Eritrocitos 1X, tenemos el buffer al 10X, Adicionar 900ul de H₂O inyectable + 100ul de Buffer de Lisis de Eritrocitos 10X (realizar esto por muestra), realizar esto en fresco.

- Adicionar 1 ml de Buffer de lisis de Eritrocitos 1X
- Resuspender 10 veces con pipeta
- INMEDIATAMENTE: Centrifugar 4500 rpm, 5min.
- Decantar el sobrenadante.
- Resuspender en seco
- Adicionar 1ml de PBS 1X.
- Centrifugar 4500rpm,5min.
- Decantar el sobrenadante
- Resuspender en seco

Realizar estos pasos anteriores cuantas veces sean necesarias, hasta ver el pellet blanco.

- Adicionar 1ml de RPMI 5%.
- Realizar conteo.
- Guardar células en una caja de 24 pozos (máximo 10×10^6 células/ml), dejar restablecerse por lo menos 4 horas con 5% CO₂, 37°C.

Anexo 2. Protocolo ATAC-seq

- Cosechar células
- Centrifugar 3500 rpm, 5min
- Adicionar 1 ml de RPMI

Conteo de Células

- Tomar 10ul de RPMI/células +190 ul de PBS 1X (Dilución 1:20)
- Tomar 20ul de Dilución 1:20 + 20ul de Azul de tripano
- Resuspender y colocar en la cámara de Neubauer.
- Realiza el conteo

de células $\times 40 \times 10000 =$ células/ml \times 1ml en los que están resuspendida la muestra =
#células totales

- Tomar 50×10^5 células, colocar en un nuevo tubo.

NOTA: Repetiremos el procedimiento en otro tubo y manejaremos dos tubos, los siguientes pasos se realizará para ambos tubos solo que se indique lo contrario.

- Adicionar 1 ml de PBS 1 X frío
- Centrifugar 3500 rpm, 5min, 4°C
- Adicionar 50ul de PBS 1X frío
- Centrifugar 3500rpm,5min, 4°C
- Descartar sobrenadante
- Adicionar 50ul de Buffer de Lisis
- Resuspender con pipeta 20 veces

INMEDIATAMENTE

- Centrifugar 3500rpm, 10min, 4°C
- Descartar sobrenadante

Tubo 1

NOTA: No tardar demasiado con estos pasos y al mismo tiempo que se agrega el PBS 1X colocar en hielo pellet.

- Adicionar 20ul de PBS 1X
- Resuspender 20 veces con pipeta
- Mirar al microscopio, si se obtuvieron más del 80% de núcleos, si las células se lisaron bien.

- Proseguir con los siguientes pasos, si es que se observaron la mayoría de los núcleos

Tubo 2

- Colocar en hielo el pellet
- Hacer la “mezcla de reacción de Transposición” por muestra
 - 25ul de TD (2x reaction buffer from Nextera)
 - 2.5ul de TDEI (Nextera Tn5 transposase from Nextera kit)
 - 22.5ul H₂O nuclease-free

50ul por muestra

- Resuspender el pellet de núcleos en la “Mezcla de reacción de Transposición” 20 veces con pipeta
- Incubar la reacción de transposición a 37°C por 30min.
- Mezclar suavemente cada 5 min
- Inmediatamente purificar en columnas de DNA

NOTA: Eluir el DNA tratado con la transposasa en 11ul de Elution Buffer (Previamente calentado a 65°C)

Almacenar el DNA purificado a -20°C si se utilizara inmediatamente para secuenciación o -80°C si tardara para mandarse a secuenciar.

Anexo 3. Protocolo Extracción de RNA por TRIZOL y síntesis cDNA

NOTA: Antes de iniciar el protocolo asegurarse de partir de un número de células > o igual a 3×10^6 células, para obtener suficiente RNA.

- Recolectar células
- Centrifugar a 3500 rpm por 5 min, T.A.
- Descartar sobrenadante
- Resuspender en seco el pellet
- Adicionar 5µl de RNA-later, resuspender con pipeta
- Inmediatamente agregar 1 ml de TRIZOL ($5-10 \times 10^6$ células) o 0.5ml de TRIZOL ($<5 \times 10^6$ células)
- Dejar reposar 5 min
- Agitar en vortex de 1-5 min (velocidad moderada)

NOTA: Si la extracción de RNA no se realizara el mismo día, guardar muestra en -80°C para un periodo largo (si se va a transportar la muestra dejar lo más que se pueda en -80°C), sino en -20°C si se utilizará en los días siguientes.

EXTRACCIÓN DE RNA POR TRIZOL

NOTA: En hielo muestras y reactivos (a menos que se indique otra cosa). Si las muestras se encuentran congeladas, dejar que se descongelen lentamente sobre del hielo.

- Dejar reposar 5 min
- Agitar en vórtex 1-5min (Velocidad moderada)
- Agregar 200 µl de cloroformo
- Agitar tubito 1 min en vórtex (tapar bien)
- Centrifugar 12 000 Gs (11 500 rpm), 15 min, 4°C

- Tomar sobrenadante (supernadante) y pasar a un tubo nuevo de 1.5 ml, deben obtenerse aprox. 700 µl, No tomar capa blanca
- Agregar al tubo 500 µl de isopropanol
- Mezclar por inversión
- Dejar en reposo 10 min a T.A.
- Centrifugar 12 000 Gs, 10 min, 4°C

NOTA: Tener cuidado con el pellet al descartar el sobrenadante con la pipeta, no tocar el pellet y estar atento a no desechar el pellet.

- Descartar sobrenadante con pipeta
 - Dejar secar tubo sobre papel
 - Agregar 1 ml de Etanol 75% para RNA
 - Centrifugar 12 000 Gs, 10 min, 4°C
- } 2X (solo si mi pellet es muy blanco)

NOTA: Este paso de secado de Etanol es importante, ya que el Etanol interfiere en la lectura de la concentración de RNA.

- Descartar lentamente sobrenadante con pipeta
- Dejar secar tubo
- Agregar 25 µl de H₂O free-nucleases
- Medir en Qubit o Nanodrop concentración de RNA

NOTA: Siempre llevar las muestras en hielo.

Síntesis de cDNA por ReverTAID

- En un tubo de 600µl nuevo, adicionar 0.3ug - 1 ug de RNA total
- Adicionar los siguientes reactivos:
 - 1µl de Oligo DT
 - 4µl de Buffer 5X
 - 2µl de dNTPs 10mM
 - 1µl de RevertAID
- Mezclar suavemente y dar un spin down
- Incubar a 42°C durante 60min
- Al terminar la reacción calentar a 70°C por 10 min para inactivar enzima.
- Colocar en hielo durante 10 min
- Spin down
- Adicionar H₂O

Nota: la cantidad de microlitros de H₂O depende de cuantos microlitros faltan para completar 20µl de volumen total.

- Guardar en -20°C si se utilizara en los próximos días, sino en -80°C.

Anexo 4. Lista de Primers

Oligonucleotides used for qPCR Amplifications

LAG3	RNA	Forward	ACACCCCATCCCAGAGGAGTT	N/A
		Reverse	AAATCGTCTTGGTCGCCACTGT	N/A
IL12RB2	RNA	Forward	CCAGCCTCAGCTCTGTGAAAT	N/A
		Reverse	GCGTTGAGAAAATGCCACC	N/A
SOCS3	RNA	Forward	TTTCTGATCCGCGACAGCTC	N/A
		Reverse	CGGAGGAGGGTTCAGTAGGT	N/A
PIK3IP1	RNA	Forward	GCTACTCCTACAAGAGGGGGAA	N/A
		Reverse	CCTCCTGAGGGTCAACTGGA	N/A
BUB1	RNA	Forward	TCCTTCAGATGCTTGAAGCCCA	N/A
		Reverse	ACAGAGGGGATGACAGGGTTC	N/A
CDK1	RNA	Forward	TAAGCCGGGATCTACCATACCC	N/A
		Reverse	CCTGGAATCCTGCATAAGCACA	N/A

BIRC5	RNA	Forward	AGGACCACCGCATCTCTACA	N/A
		Reverse	TGTTCTCTATGGGGTCGTCA	N/A
B2M	RNA	Forward	AGCCCAAGATAGTTAAGTGGGATCG	N/A
		Reverse	TCCAATGCGGCATCTTCAAACC	N/A
ITGAL	RNA	Forward	CCTGTGTTACCTCTTCCGCC	N/A
		Reverse	GAACAGCAGCAAACCTGGTACG	N/A
GZMH	RNA	Forward	CAGGGAAGCTCCATAAATGTCACC	N/A
		Reverse	CAGTGTGGTTGCTAAAGTGCTC	N/A
CEBPE	RNA	Forward	CACATACCTTCGGCCCAGAC	N/A
		Reverse	AAAGGGGCCTTGAGAACGC	N/A
DEFA4	RNA	Forward	ACTGCCTCATTGGTGGTGTG	N/A
		Reverse	GGCGTTCCCAGCATGACATT	N/A
IFNG	RNA	Forward	TGAATGTCCAACGCAAAGCA	N/A
		Reverse	CTGTTTTAGCTGCTGGCGAC	N/A
CTSG	RNA	Forward	GATGTGGAGGGTTCCTGGTG	N/A
		Reverse	GTGTTGCTGGGTGTTTTCCC	N/A
GZMB	RNA	Forward	AGCCTGCACCAAAGTCTTCAA	N/A
		Reverse	TTTCATTACAGCGGGGGCTT	N/A
GZMH	MeDIP	Forward	ACATGGCTCTTGCCCTTGAA	From -317 to -430
		Reverse	GTCTCACACCAACAGGCAGA	From -317 to -430
ITGAL	MeDIP	Forward	GCAAGCAGGCACAGGAAATG	From -77 to +51
		Reverse	TTCTCACAGAGGCAACAGGC	From -77 to +51
CEBPE	MeDIP	Forward	GGAACAAGCTCTACACGCGA	From -35 to -182
		Reverse	TGGAGCCACCGGAGGATTAT	From -35 to -182
CTSG	MeDIP	Forward	ATGTTCCAGACGGCTCCTTG	From -2474 to -2604
		Reverse	CCCATTGTTGAGTATGCGGC	From -2474 to -2604
DEFA4	MeDIP	Forward	AAATGCCACCCACACACAGA	From -407 to -577
		Reverse	CAACCTGCCCTATCCAGCAA	From -407 to -577

Anexo 5. Extracción gDNA

- Recolectar las células
- Centrifugar a 3500 rpm, 5 min
- Retirar sobrenadante
- Resuspender pellet en solución de proteinasa k

Solución Proteínasa K

Tween 20 1:200

Proteinasa K 1 mg/ml

Llevar con H₂O estéril a volumen final

- Calentar durante 1 hora, 55°C
- Inactivar 10 minutos, 95°C
- Dar un pequeño vórtex
- Centrifugar 5 min, 14000 rpm, 4°C
- Tomar sobrenadante y colocar en un tubo nuevo
- Añadir 1/10 V de Acetato de Na 3M pH 5.2
- Añadir 1V de isopropanol
- Incubara -20 °C o -80°C O/N
- Centrifugar 10 min, 14000 rpm, 4°C
- Desechar sobrenadante, se queda con el pellet
- Lavar con 1 ml de Etanol 70%
- Centrifugar 15 min 14000rpm, 4°C
- Desechar sobrenadante
- Resuspender el pellet en 50 µl de Tris-HCl 10 mM pH 7.4

Anexo 6. Sonicación de DNA

Sonicar durante 8 minutos a una amplitud de 40%, con pulsos de 10 segundos.

Anexo 7. MeDIP

Nota: Utilizar 2 µg de gDNA sonificado para la IP y 1 µg de input

- Diluir 2 µg de DNA sonificado en 225 µl de Buffer TE
- Desnaturalizar por 10 min en agua hirviendo
- Adicionar 25 µl de Buffer IP 10X
- Adicionar 2 µg de anti- 5mC (anti-5 metilcitosina)

- Incubar O/N a 4°C en roscicero

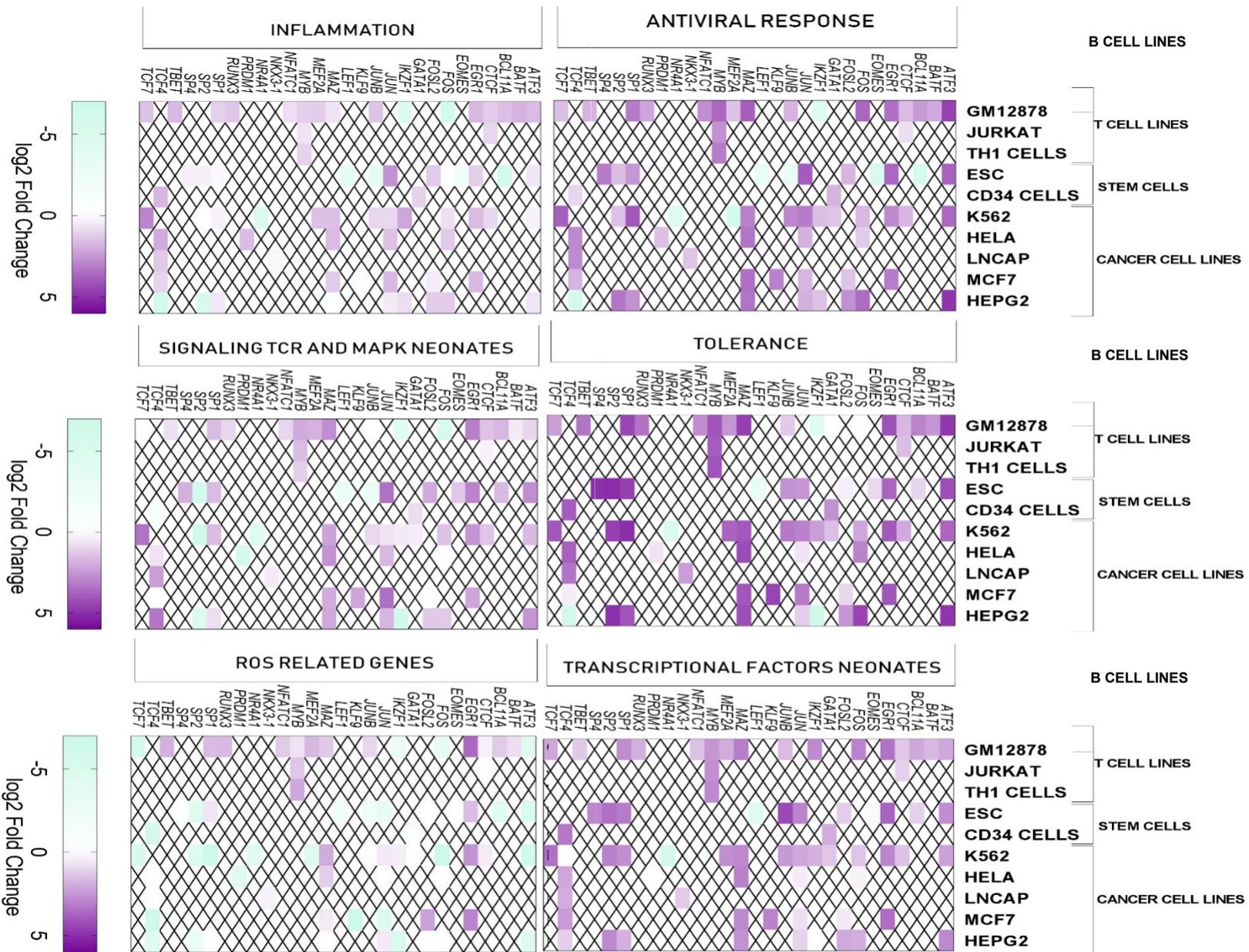
Perlas Magnéticas:

- o 20 µl de perlas magnéticas
 - o Lavar 2 veces con Buffer de entrecruzamiento (PBS, 2% de SFB) por 5 min
 - o Adicionar 10 µl de anticuerpo secundario (rabbit anti-mouse IgG (200ng/µl))
 - o Eluir en 20 µl de Buffer IP 1X
 - o Incubar O/N a 4°C en roscicero
 - o Unir a rack magnético
 - o Dar 2 lavados de 800µl de Buffer de entrecruzamiento por 5 min a T.A.
- Adicionar las muestras a las perlas e incubar por 3 o 4 horas a 4°C en roscicero
 - Colectar las perlas unidas al DNA metilado con un rack magnético
 - Lavar 3 veces con 700µl de Buffer IP 1X por 5 min (invirtiendo)
 - Las perlas unidas al DNA se resuspenden en 250 µl de Buffer de Digestion
 - Colocar 10 min en agua hirviendo
 - Adicionar 3.5µl de proteinasa K (20 mg/ml)
 - Incubar a 55°C por 2 horas
 - Adicionar 1 V de phenol/chloroform/isoamil
 - Centrifugar 13000 rpm, 5 min, 4°C
 - Adicionar 1 V de phenol/chloroform/isoamil
 - Centrifugar 13000 rpm, 5 min, 4°C
 - Purificación por columnas

Anexo 8. Sobrelape de FTs en regiones promotoras de clústeres

En la figura 42 podemos observar que el sobrelape del factor transcripcional TCF7 pertenecientes a las líneas celulares linfoblástica (GM12878) y de leucemia mielógena (K562) en todos los clústeres. Sin embargo, también observamos que el factor transcripcional LEF1 no se encontró sobrelapado en ninguna de las regiones promotoras de los genes.

A)



B

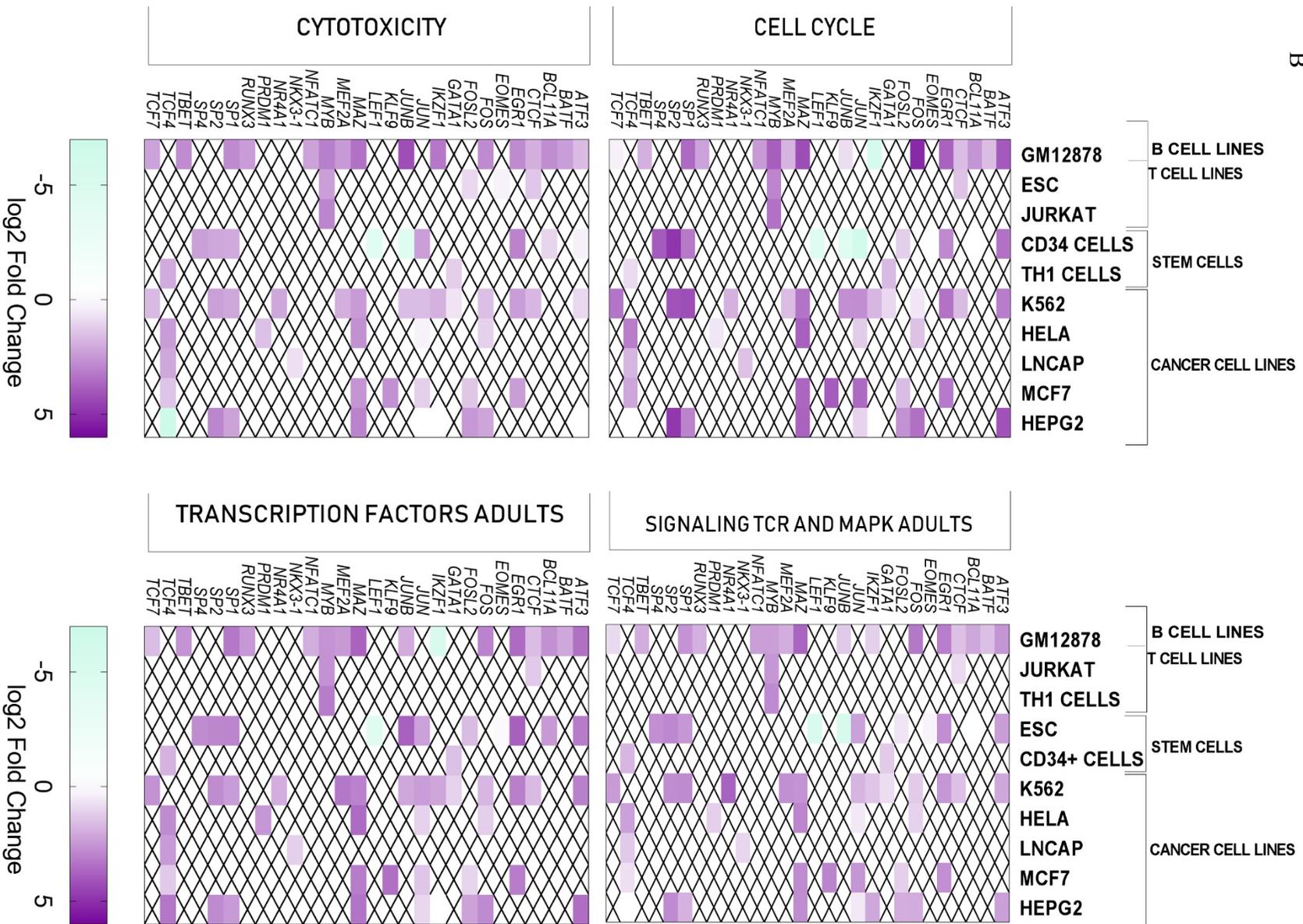


Figura 42. Sobrelape de los ChIP-seq de los Factores Transcripcionales de diferentes líneas celulares en las regiones promotoras de genes de los diferentes clústeres. A) Sobrelape de los ChIP-

seq de los FTs en las regiones promotoras de genes sobreexpresados en linfocitos T CD8⁺ de neonatos que se clasificaron en seis diferentes clústeres. B) Sobrelape de los ChIP-seq de los FTs en las regiones promotoras de genes sobreexpresados en linfocitos T CD8⁺ de adulto que se clasificaron en cuatro diferentes clústeres.

Los factores que se encontraron en cada uno de los clústeres, aunque con un menor o mayor sobrelape dependiendo el clúster, fueron los factores de NFATC1, EGR1, TBET y RUNX3 (Figura 42). Estos factores son relevantes en la activación y diferenciación de las células T.

Uno de los factores que se reportó como sobreexpresado en linfocitos T CD8⁺ de neonato es BCL11A (Galindo-Albarrán, 2013), este factor transcripcional se encontró sobrelapado en todos los clústeres en la línea celular GM12878. Sin embargo, en células madre no se encontró sobrelape de este factor en los clústeres de respuesta antiviral, ciclo celular, señalización del TCR y MAPK en linfocitos T CD8⁺ de adultos, inflamación y genes relacionados a ROS (Figura 42).

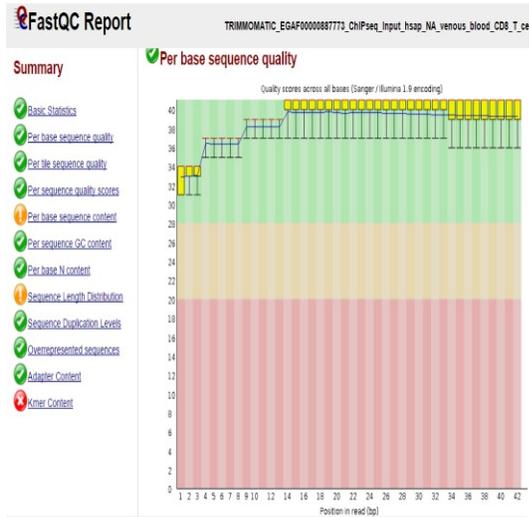
Pudimos observar que por lo menos en una línea celular o más se encontró sobrelape de los diferentes factores transcripcionales con las regiones promotoras de los clústeres (Figura 42).

Anexo 9. Procesamiento de datos de ChIP-seq

Para evaluar las calidades de los datos masivos que obtuvimos del consorcio Blueprint, iniciamos con el programa FastQC (*Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*, 2018), para observar la calidad en que estaban los datos de ChIP-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos. Se observó que la calidad de

todos los datos era buena (Figura 43), sin embargo, en algunos datos había que remover la poca mala calidad y si todavía es que tenían adaptadores. Para eliminar los extremos y secuencias de mala calidad, que comúnmente aparecen en los datos masivos, se utilizó el programa Trimmomatic (Bolger et al., 2014), que nos permite remover las lecturas de mala calidad y adaptadores de los archivos fastq. Después de remover la mala calidad nuevamente, se observó una buena calidad de los datos fastq, que puede apreciarse mejor en el resumen del lado izquierdo de la figura (Figura 43), por lo que se decidió proseguir con el análisis. Los datos fastq se alinearon con respecto al genoma humano versión hg38 con el programa Bowtie2 (Langmead and Steven L Salzberg, 2013). Al ser obtenidos los datos binarios del alineamiento (“bam”), se analizó la calidad del alineamiento con el programa construido por la Dra. Alejandra Medina, que considera los parámetros de calidad de ENCODE. Así obtuvimos el porcentaje de las *reads* alineadas, el coeficiente normalizado de correlación cruzada de la cadena (normalized strand coefficient, NSC)(Landt et al., 2012), que es la relación normalizada entre la correlación de la longitud del fragmento del pico. También la posición y correlación del phantom peak (Figura 44), que corresponde a la longitud de la read, y otros parámetros de calidad (Tabla 6 y 7). Finalmente, se midió la correlación cruzada relativa de la cadena (relative strand correlation, RSC) (Figura 44), que es la relación entre la longitud del fragmento y la longitud del pico de la read (Landt et al., 2012).

Antes



Después

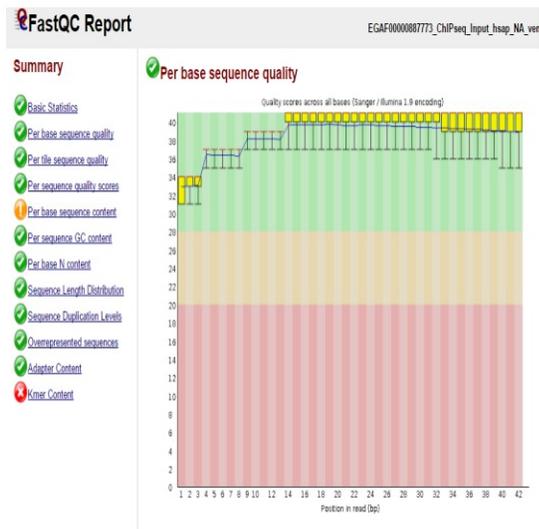


Figura 43. Calidad de FASTQC de los archivos fastq de ChIP-seq de las diferentes modificaciones de histonas en linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos. Ejemplos representativos de la medición de la calidad por pares de bases en las lecturas de los datos de ChIP-seq (Antes) Medición de la calidad de las lecturas antes de procesarlas con Trimmomatic, (Después) Medición de la calidad de las lecturas después de remover la mala calidad con el programa Trimmomatic.

Se observó un mayor tamaño del phantom peak en algunos experimentos de ChIP-seq de las marcas de histonas de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos en comparación con el pico del promedio de la longitud del fragmento de la librería (Figura 44, rojo) (Tabla 6A, B). Esto nos habla que estas muestras tuvieron menor calidad. Sin embargo, la mayoría de los datos se observaron con una buena calidad, ya que el tamaño del phantom peak fue menor al del promedio de la longitud del fragmento de la librería (Figura 44, verde) (Tabla 6A, B).

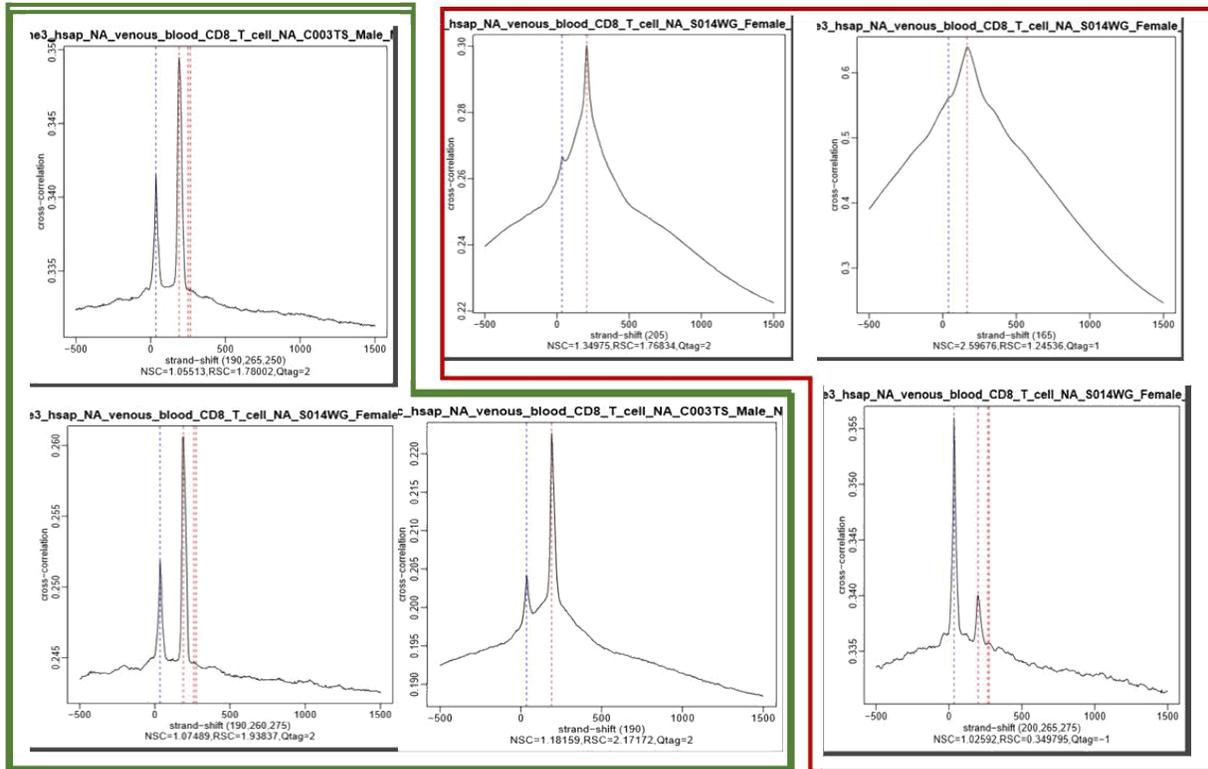


Figura 44. Phantom peak de ChIP-seq de modificaciones de histonas de linfocitos $T CD8^+$ de adultos y neonatos. En cada grafica existen dos picos de la correlación cruzada que se observan usualmente en los experimentos de ChIP, uno corresponde a la longitud de la read (“phantom peak”, azul) y en el otro el promedio de la longitud del fragmento de la librería (rojo). Se muestran 3 ejemplos representativos del phantom peak de datos de ChIP-seq de las diferentes marcas de histonas con (verde) buena calidad y (rojo) 3 con mala calidad.

Otro parámetro que se considero fue el porcentaje de las reads mapeadas en los datos alineados, en el cual ENCODE establece que arriba del 80% del total de las reads deben encontrarse mapeadas para considerar que el alineamiento tiene una buena calidad. Podemos observar que la mayoría de las muestras se encuentran arriba del umbral (Figura 45A).

alineamiento (Figura 45B), sin embargo, esto no quiere decir que los datos restantes se encuentren con una mala calidad, en efecto la mayoría de estos datos se encontró con un NSC > 1.05 que es considerado con buena calidad en el alineamiento (Figura 45B), a excepción de 3 datos que se encontraron al límite del NSC=1.05, pero estos mismos tres datos son los que se encontraron con una menor calidad desde el phantom peak (Figura 45,rojo).

RSC es la relación que existe entre la longitud del pico de la read y la longitud del fragmento. Este parámetro de calidad es importante también, ya que nos ayuda a establecer si nuestro alineamiento tuvo o no buena calidad. Los rangos establecidos por ENCODE son que debe tener un RSC>1, el umbral establecido para poder calcular el RSC es dado por el quality tag (Qtag) que se describirá más adelante. Podemos observar (Figura 45C) que solo 7 datos tienen un RSC menor a 1 y la mayoría de nuestros datos se encuentra con una buena calidad.

Otros parámetros que se midieron para observar la calidad del alineamiento fueron: el número de reads únicas alineadas, que nos ayuda a establecer el porcentaje de alineamiento de las reads, la localización del phantom peak y la correlación del phantom peak, el cambio de la correlación cruzada, el valor mínimo de la correlación cruzada y el Quality tag (Qtag) que es el umbral para calcular el RSC, el cual debe estar en 2 para muy alta calidad, en 1 para alta calidad, en 0 para media calidad, en -2 y -1 para una calidad pobre (Tabla 6 A,B). Todos estos parámetros nos ayudaron a establecer los límites para poder calcular el NSC y RSC y saber cómo se encontraba la calidad de nuestros datos en ambos tipos de células.

Una vez que se observaron los resultados de cada uno de estos parámetros de calidad por separado, se realizó primero el llamado de picos con el programa MACS2. Con este programa obtuvimos los picos con q-value < 0.05 (datos no mostrados) y los picos amplios (broad) con un q-value < 0.05 (Figura 46) para cada replica biológica de cada marca de histona. Se eligieron las

2 mejores réplicas de cada una de las 6 marcas de histonas de los ChIP-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonato y de adulto.

ENCODE establece que la cantidad mínima en número de picos es de 20000 en el ChIP-seq, y podemos observar que la mayoría de los datos se obtuvo un rango mayor de número de picos (Figura 46). Sin embargo, solamente 5 muestras estuvieron entre los 20000 y los 5000 picos, por lo que consideramos que esas muestras se podían utilizar. Solo 5 muestras más se encontraron debajo de los 2000 picos (Figura 46), por lo cual no se podía continuar trabajando con dichas muestras.

	MAPPED					CORRELATION VALUES			LOCATION	CORRELATION	CORRELATION	CORRELATION	
ADULTO 1 (C005DFH1)													
EGAF00000178965_ChIPseq_Input	44009067	45199545	185	240	260	0.3441	0.33389	0.3339	35	0.3442807	1500	0.331824	0
EGAF00000178966_ChIPseq_H3K4me3	43095423	44502127	190	320	340	0.2985	0.28041	0.2801	35	0.289948	1500	0.2737464	2
EGAF00000284310_ChIPseq_H3K36me3	42212040	51627343	175			0.2436			35	0.1975533	1500	0.1895657	2
EGAF00000284311_ChIPseq_H3K4me1	41215610	49076446	205	265	275	0.3036	0.28624	0.2862	35	0.2935241	1500	0.2795155	2
EGAF00000284325_ChIPseq_H3K9me3	38060663	40509069	205			0.242			35	0.2218727	1500	0.1995338	2
ADULTO 2 (S0014WG)													
EGAF00000887773_ChIPseq_Input	54636255	55144428	170	260	340	0.4047	0.40089	0.4009	35	0.4091871	1500	0.3992366	0
EGAF00000887700_ChIPseq_H3K27ac	27031564	34094697	205			0.3003			35	0.2665297	1500	0.2225191	2
EGAF00000887699_ChIPseq_H3K4me3	31395719	35352668	165			0.6394			40	0.5619622	1500	0.2462408	1
EGAF00000887731_ChIPseq_H3K27me3	31055221	44764966	190	260	275	0.2607	0.24475	0.2446	35	0.2518596	1500	0.2424905	2
EGAF00000887836_ChIPseq_H3K36me3	44139677	46412920	210	270	320	0.3831	0.37841	0.3776	35	0.3845696	1500	0.3729705	0
EGAF00000887675_ChIPseq_H3K4me1	43464047	44401719	200	330	350	0.3896	0.3734	0.3732	35	0.3809585	1500	0.3470225	1
EGAF00000887704_ChIPseq_H3K9me3	41229171	45972438	200	275	265	0.34	0.33573	0.3357	35	0.3560078	1500	0.3314493	-1
ADULTO 3 (C003TS)													
EGAF00001063105_ChIPseq_Input	27116600	28344470	190	260	275	0.2659	0.26505	0.265	35	0.2755835	1500	0.2625522	-1
EGAF00000887733_ChIPseq_H3K27ac	25699169	27759659	190			0.2227			35	0.2042346	1500	0.1884754	2
EGAF00000887678_ChIPseq_H3K27me3	50803242	51986883	190	265	250	0.3495	0.33383	0.3337	35	0.3414987	1500	0.3312391	2

Tabla 6A. Métricas de Calidad de ENCODE de los datos de ChIP-seq de linfocitos T CD8⁺ de adultos. (Blanco) Input de cada muestra de ChIP-seq de linfocitos T CD8⁺ de adultos, (verde fuerte) son los datos que se encuentran con un NSC > 1.1 y un RSC > 1, (verde claro) datos que se encuentran con un NSC > 1.05 y RSC > 1 y (naranja) datos con una calidad pobre.

	MAPPED	READS	ESTIMATES						LOCATION	CORRELATION	CORRELATION	CORRELATION	
			FRAGMENT										
NEONATO 1(C002YMH1)													
EGAF00000161842_ChIPseq_Input	48319344	49313530	190	260	275	0.3202	0.30384	0.3038	35	0.3138042	1500	0.3018219	2
EGAF00000161843_ChIPseq_H3K27ac	44031228	45186061	185	270	290	0.2819	0.25757	0.2574	35	0.2656966	1500	0.2532359	2
EGAF00000161867_ChIPseq_H3K4me3	41363859	42483856	205			0.3218			35	0.2935506	1500	0.2453175	2
EGAF00000169156_ChIPseq_H3K27me3	59487383	60748379	195	245	260	0.3747	0.35311	0.3529	35	0.3602687	1500	0.350742	2
EGAF00000169160_ChIPseq_H3K36me3	44599974	46354412	180	235	320	0.2417	0.2243	0.2228	35	0.2286265	1500	0.2182016	2
EGAF00000169161_ChIPseq_H3K4me1	55579872	57972102	190			0.3431			35	0.3157528	1500	0.2814069	2
EGAF00000169170_ChIPseq_H3K9me3	57089387	59315625	195	245	270	0.3755	0.35609	0.356	35	0.3749568	1500	0.3518818	1
NEONATO 2(C00360H1)													
EGAF00000161856_ChIPseq_Input	33728523	34432794	200	270	260	0.2347	0.21743	0.2174	35	0.2294867	1500	0.2152495	1
EGAF00000161855_ChIPseq_H3K27ac	32577496	34278237	210	250	260	0.2348	0.21312	0.213	35	0.2220223	1500	0.2077493	2
NEONATO 3(C0066PH1)													
EGAF00000178962_ChIPseq_Input	28170478	28905606	195	280	300	0.2561	0.24759	0.2475	35	0.2582523	1500	0.2454486	0
EGAF00000604579_ChIPseq_H3K27ac	37676130	38686090	185	240	270	0.2907	0.27182	0.2718	35	0.2803824	1500	0.2691111	2
EGAF00000178969_ChIPseq_H3K4me3	51558876	53517968	185			0.4077			35	0.386774	1500	0.3411058	1
EGAF00000178958_ChIPseq_H3K27me3	49123290	57632839	190	260	270	0.3378	0.3192	0.319	35	0.3261347	1500	0.3162371	2
EGAF00000239329_ChIPseq_H3K9me3	46133082	51898689	180	225	270	0.3283	0.30511	0.3047	35	0.3295529	1500	0.2995297	0
NEONATO 4(S00C2FH1)													
EGAF00000507616_ChIPseq_Input	49477049	50575170	180	240	230	0.3767	0.37098	0.3709	35	0.3801786	1500	0.3691746	0
EGAF00000604578_ChIPseq_H3K27ac	38224906	39178517	195	245	260	0.315	0.3047	0.3046	35	0.3131769	1500	0.3016792	1
EGAF00000507568_ChIPseq_H3K4me3	38397074	39492397	160	310	325	0.3207	0.31379	0.3136	35	0.3221737	1500	0.2996515	0
EGAF00000507565_ChIPseq_H3K27me3	49793970	52055120	180	230	245	0.3158	0.29216	0.2921	35	0.3010125	1500	0.28954	2
EGAF00000507553_ChIPseq_H3K36me3	50886154	53604331	180	245	295	0.3365	0.31061	0.3101	35	0.3171337	1500	0.306887	2
EGAF00000507554_ChIPseq_H3K9me3	44604734	47077056	175	270	260	0.3441	0.32856	0.3286	35	0.3588537	1500	0.3229449	0
EGAF00000507564_ChIPseq_H3K4me1	48120438	51212505	180	225	275	0.3525	0.33288	0.3318	35	0.3382572	1500	0.3200402	2

Tabla 6B. Métricas de Calidad de ENCODE de los datos de ChIP-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos.

(Blanco) Input de cada muestra de ChIP-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos, (verde fuerte) son los datos que se encuentran con un NSC > 1.1 y un RSC > 1, (verde claro) datos que se encuentran con un NSC > 1.05 y RSC > 1 y (naranja) datos con una calidad pobre.

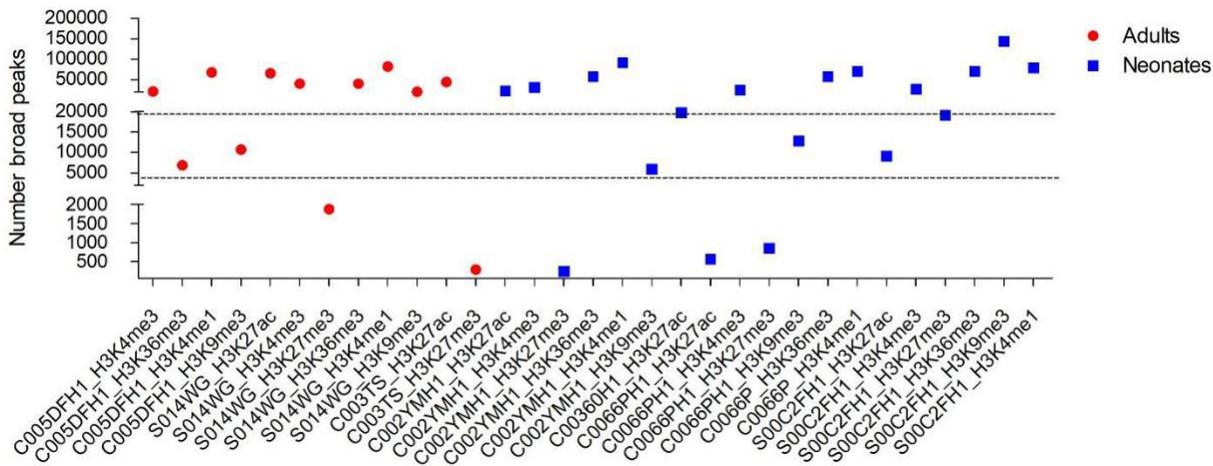


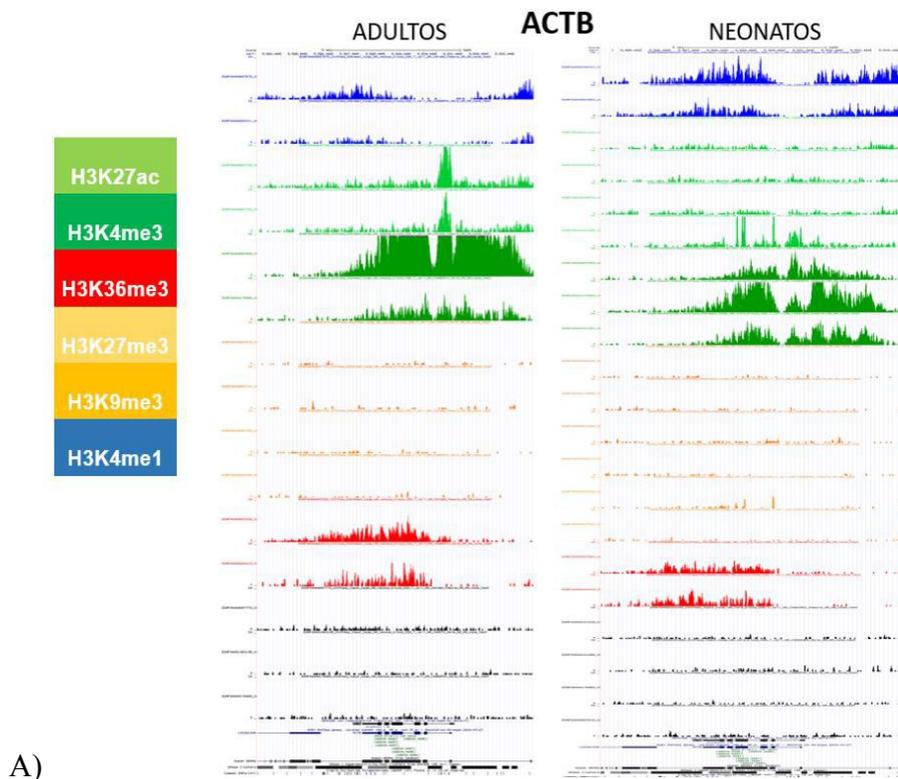
Figura 46. Número de picos broad en los datos de ChIP-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos

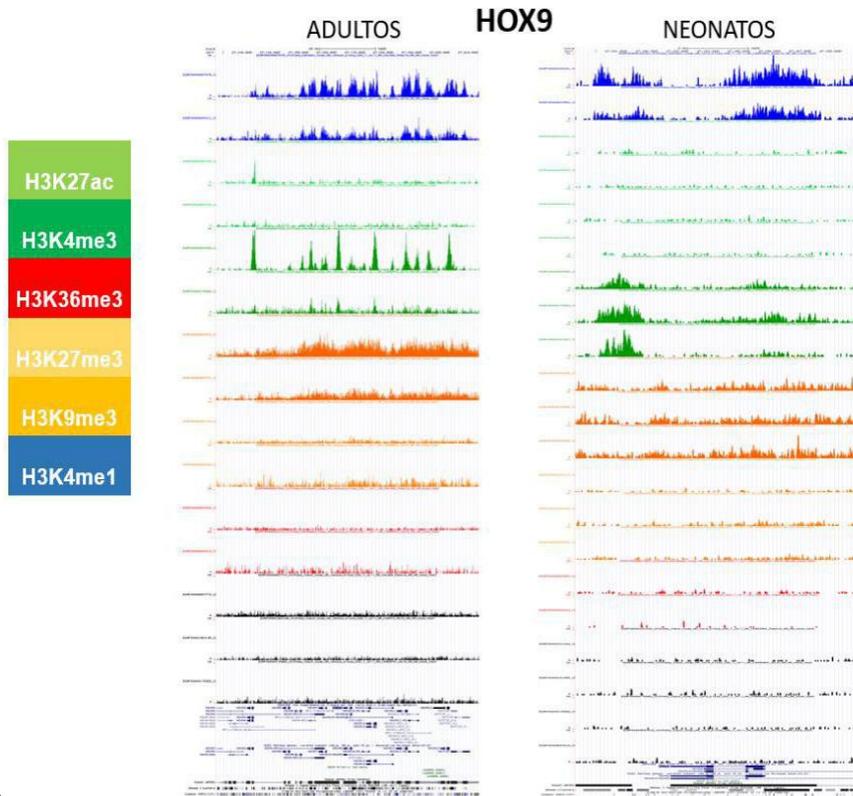
humanos. Número de picos broad obtenidos del programa MACS2 que tuvieron un q value < 0.05 en cada una de

las seis marcas de histonas diferentes en linfocitos T CD8⁺ de neonatos (azul) y adultos (rojo). Cada marca de histona tiene diferente número de replicas biológicas, se observa el código de la muestra y la marca de histona en el eje x.

Visualizamos dos genes control, *ACTB* y *HOX9*, en el Genome Browser, para valorar cómo se encontraban los picos de las señales de las seis distintas marcas de histonas de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos (Figura 47). Pudimos observar la presencia de los picos señales de las marcas de histona asociado apertura de la cromatina en el gen de actina B (*ACTB*), ya que este gen se

encuentra constitutivamente activo en linfocitos T CD8⁺ (Figura 47A). Por otra parte, el gen del factor transcripcional que contiene un dominio homeobox *HOXA9*, lo encontramos con picos de marcas de cierre y apertura pero con señales más débiles (Figura 47B). Esta visualización, nos ayudó a corroborar que nuestros datos tuvieron un buen procesamiento y ver que datos podemos utilizar para el siguiente análisis.





B)

Figura 47. Visualización de picos de las seis distintas marcas de linfocitos $T CD8^+$ de neonatos y adultos humanos en Genome Browser en genes control. Visualización de las 6 diferentes marcas de histonas (H3K4me1(azul), H3K4me3 (verde oscuro), H3K27ac (verde claro), H3K36me3 (rojo), H3K27me3 (naranja claro), H3K9me3 (naranja fuerte) y el input (negro)) A) del gen de ACTB y B) del gen HOX9 (derecha) en 2 muestras de cada uno de linfocitos T $CD8^+$ vírgenes de adultos y (izquierda) en los linfocitos T $CD8^+$ neonatales.

Una vez que obtuvimos todos los parámetros de calidad del alineamiento y pudimos visualizar los picos de cada una de las marcas de la cromatina en los genes control, decidimos seleccionar las dos mejores replicas biológicas de cada marca de histona y analizar la relación de irreproducibilidad descubierta (Irreproducible Discovery rate, IDR), esta es otra medida de calidad que nos da la ventaja de tener información de la reproducibilidad entre los duplicados.

Este análisis de IDR crea dos pseudoréplicas generadas agrupando todos los picos consistentes entre ambas replicas biológicas (NumPeaks_pooled). Luego particiona al azar estos picos en cada una de las pseudoreplicas, y las compara entre sí para obtener el número de picos consistentes de cada replica (numPeaks_Rep1 o 2). Esto permite obtener el número verdadero de picos consistentes de ambas muestras biológicas (numPeaks_bio). Esto nos ayuda a calcular la relación entre NumPeaks_pooled/numPeaks_bio el cual ENCODE establece que debe ser menor a 2 (Landt et al., 2012).

Código de muestras comparadas		Marca de Histona			
ADULTO S0014WG_VS_ADULTO C003TS		H3K27AC			
numPeaks_bio:	21889	numPeaks_pooled:	20902	ratio:	1.04722
numPeaks_Rep1:	27667	numPeaks_Rep2:	26777	ratio:	1.033237
result:	PASSED				
ADULTO S0014WG_VS_ADULTO C003TS		H3K27me3			
numPeaks_bio:	8998	numPeaks_pooled:	11532	ratio:	0.780264
numPeaks_Rep1:	9123	numPeaks_Rep2:	5125	ratio:	1.780098
result:	PASSED				
ADULTO C005DFH1_VS_ADULTO S0014WG		H3K4me3			
numPeaks_bio:	18049	numPeaks_pooled:	27095	ratio:	0.666138
numPeaks_Rep1:	24434	numPeaks_Rep2:	38781	ratio:	0.630051
result:	PASSED				
ADULTO C005DFH1_VS_ADULTO S0014WG		H3K4me1			
numPeaks_bio:	37600	numPeaks_pooled:	42467	ratio:	0.885393
numPeaks_Rep1:	31036	numPeaks_Rep2:	55471	ratio:	0.5595
result:	PASSED				
ADULTO C005DFH1_VS_ADULTO S0014WG		H3K9me3			
numPeaks_bio:	5045	numPeaks_pooled:	4624	ratio:	1.091047
numPeaks_Rep1:	8424	numPeaks_Rep2:	6461	ratio:	1.303823
result:	PASSED				
ADULTO C005DFH1_VS_ADULTO S0014WG		H3K36me3			
numPeaks_bio:	18625	numPeaks_pooled:	22416	ratio:	0.88477
numPeaks_Rep1:	8314	numPeaks_Rep2:	33527	ratio:	1.546246

result:	PASSED				
---------	--------	--	--	--	--

Tabla 7A. Resultados IDR de ChIP-seq de linfocitos T CD8⁺ de adultos. Número de picos consistentes entre ambas pseudoreplicas (numPeaks_pooled), número verdadero de picos consistentes de ambas muestras biológicas (numPeaks_bio), número consistente de picos en la réplica 1 (numPeaks_Rep1) y en la réplica 2 (numPeaks_Rep2).

Podemos observar que para las dos replicas biológicas seleccionadas de cada marca de histona, la relación es menor a 2, tanto en linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos (Tabla 7A, B). Esto nos habla que esas replicas biológicas podemos utilizarlas ya que sus picos son consistentes entre ambas muestras.

Sin embargo, a pesar de haber seleccionado dos mejores réplicas biológicas para cada marca, observamos que en el caso de los adultos, en las marcas de H3K27ac, H3K36me3 y H3K27me3 se seleccionó una sola muestra, ya que la segunda replica contenía menos de 6000 picos.

Código de muestras comparadas			Marca de Histona			
NEONATO C0066PH1_VS_NEONATO S00C2FH1			H3K27AC			
numPeaks_bio:	7708		numPeaks_pooled:	8267	ratio:	0.932382
numPeaks_Rep1:	5955		numPeaks_Rep2:	7325	ratio:	0.812969
result:	PASSED					
NEONATO C002YMH1_VS_NEONATO C0066PH1			H3K27me3			
numPeaks_bio:	6651		numPeaks_pooled:	7320	ratio:	0.908607
numPeaks_Rep1:	4353		numPeaks_Rep2:	3899	ratio:	1.11644
result:	PASSED					
NEONATO C0066PH1_VS_NEONATO S00C2FH1			H3K4me3			

numPeaks_bio:	22708		numPeaks_pooled:	24049	ratio:	0.944239
numPeaks_Rep1:	30717		numPeaks_Rep2:	23532	ratio:	1.305329
result:	PASSED					
NEONATO C002YMH1_VS_NEONATO S00C2FH1			H3K4me1			
numPeaks_bio:	50293		numPeaks_pooled:	53852	ratio:	0.933911
numPeaks_Rep1:	62031		numPeaks_Rep2:	46933	ratio:	1.321693
result:	PASSED					
NEONATO C002YMH1_VS_NEONATO C0066PH1			H3K9me3			
numPeaks_bio:	5403		numPeaks_pooled:	5483	ratio:	0.985409
numPeaks_Rep1:	7904		numPeaks_Rep2:	8690	ratio:	0.909551
result:	PASSED					
NEONATO C002YMH1_VS_NEONATO S00C2FH1			H3K36me3			
numPeaks_bio:	31750		numPeaks_pooled:	25637	ratio:	1.238444
numPeaks_Rep1:	45211		numPeaks_Rep2:	36991	ratio:	1.222216
result:	PASSED					

Tabla 7B. Resultados IDR de ChIP-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos. Número de picos consistentes entre ambas pseudoreplicas (numPeaks_pooled), número verdadero de picos consistentes de ambas muestras biológicas (numPeaks_bio), número consistente de picos en la réplica 1 (numPeaks_Rep1) y en la réplica 2 (numPeaks_Rep2).

Anexo 10. Análisis del ATAC-seq

Para comenzar el análisis de los datos fastq del ATAC-seq, primero se tuvo que analizar la calidad de los archivos fastq de la primer y segunda lectura o “read”. Estos cuentan con dos lecturas porque se hicieron en librerías de tipo “Pair-end”. Para este análisis utilizamos el programa FASTQC (*Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*, 2018) para saber cómo estaba la calidad de los archivos antes de procesarlos. Observamos que la segunda lectura de todos los datos tenía regiones con mala calidad

(Figura 48). Para eliminar la mala calidad utilizamos el programa Trimmomatic (Bolger et al., 2014), que nos permitió remover las lecturas de mala calidad de los archivos fastq. Después de remover la mala calidad nuevamente, observamos como quedo la calidad de nuestros datos fastq, (Figura 48) en donde observamos una buena calidad. Por lo que se decidió proseguir con el análisis.

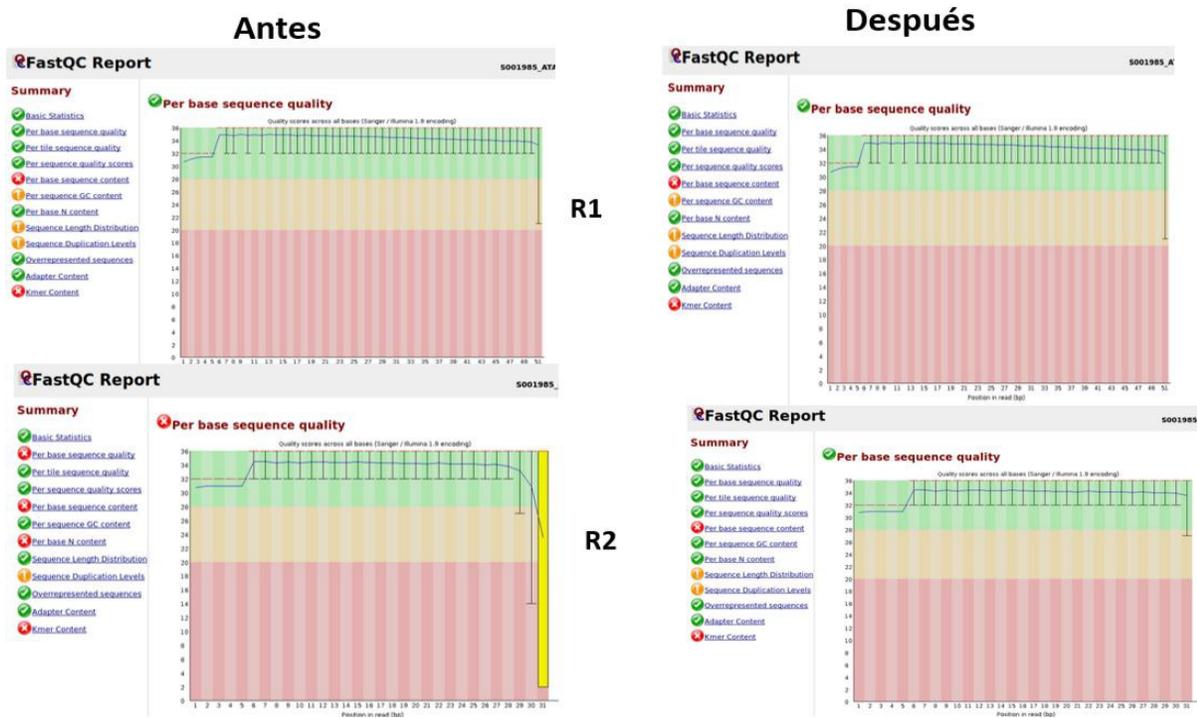


Figura 48. Calidad de FASTQC de los archivos fastq en las read 1 y 2. Ejemplos representativos de la medición de la calidad por pares de bases en la lectura 1 (R1) y en la lectura 2 (R2). (Antes) Medición de la calidad de las reads 1 y 2 antes de procesarlas con Trimmomatic, (Después) Medición de la calidad de las read 1 y 2 después de remover la mala calidad con el programa Trimmomatic.

Una vez que obtuvimos los datos fastq con una buena calidad, realizamos el alineamiento de las reads con respecto al genoma del humano hg38 con el programa Bowtie2 (Langmead and Steven L Salzberg, 2013). Se realizo el análisis de la calidad del alineamiento, se observaron los datos bam generados por Bowtie2 con un buen alineamiento (Figura 49 y Tabla 8). Para saber que era un buen alineamiento, de midieron diferentes parámetros de calidad con la

paquetería de bioconductor ATACseqQC (Ou et al., 2018), el cual nos genera como resultado el porcentaje de mapeo de las reads, relación de DNA mitocondrial, fracción no redundante (siglas en inglés ,NRF), el coeficiente de bottleneck de PCR 1 (siglas en inglés, PBC1) y el coeficiente de bottleneck de PCR 2 (siglas en inglés,PBC2) . Para estos parámetros consideramos como límites los establecidos por ENCODE (Landt et al., 2012), para considerar un buen alineamiento. En la tabla 6 se muestran los rangos que establece ENCODE para el NFR, PBC1 y PBC2.

PBC1	PBC2	Bottlenecking level	NRF	Complexity	Flag Colors
<0.7	<1	Severe	<0.7	Concerning	Orange
0.7<= PBC1<=0.9	1<=PBC2<=3	Moderate	0.7<=NRF<=0.9	Acceptable	Yellow
>0.9	>3	None	>0.9	Ideal	None

Tabla 8. Rangos de calidades de ENCODE para datos de ATAC-seq. NRF=Non-Redundant Fraction, PBC1=PCR bottleneck Coefficient 1, PBC2=PCR bottleneck Coefficient 2.

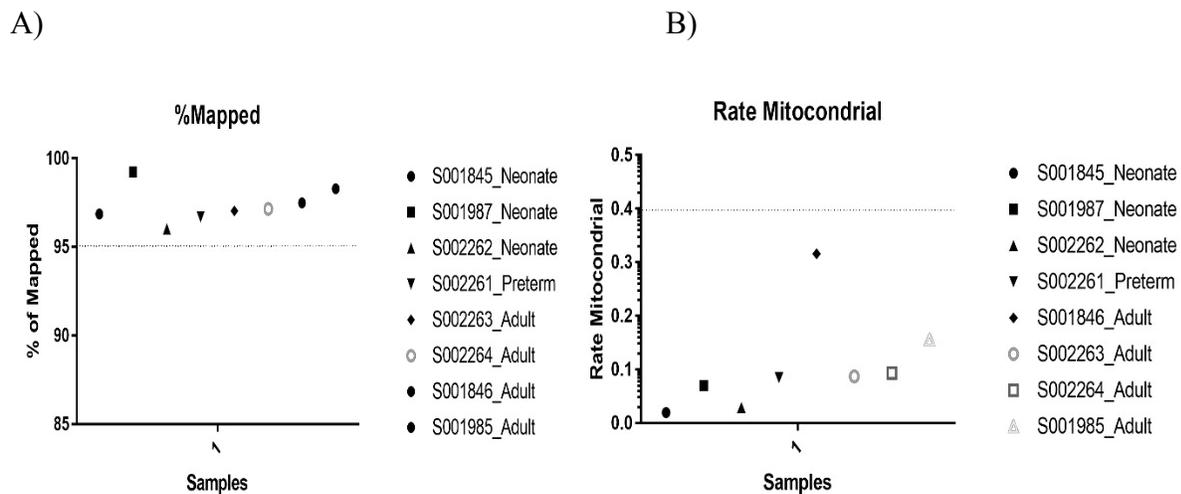


Figura 49. Medidas de Calidad de Alineamiento (Porcentaje de alineamiento y Relación

mitocondrial). A) Porcentaje de alineamiento de las lecturas del ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺

pertenecientes a 3 muestras de neonatos de termino, un neonato de pretérmino y 4 adultos,

en el 95%. B) Relación mitocondrial en los datos de alineamiento del ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

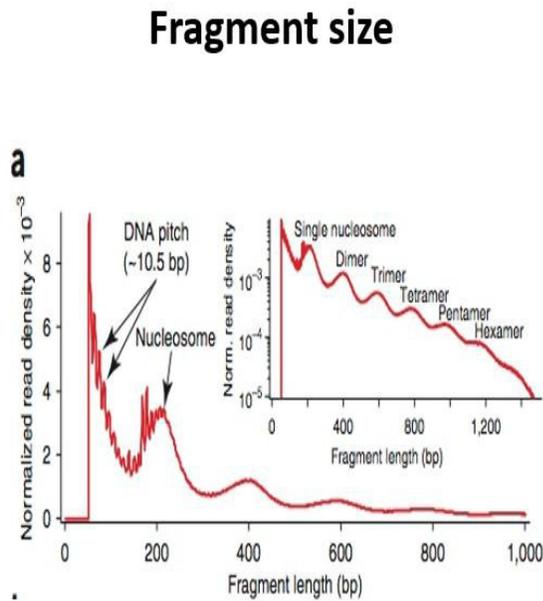
Observamos que los archivos tienen un porcentaje >95% de alineamiento en todos nuestros archivos (Figura 49). También pudimos observar que la contaminación de DNA mitocondrial es de menos de 0.4, el cual fue removido ya que interfiere a la hora de establecer las regiones libres de nucleosomas. También pudimos visualizar, los rangos considerados por ENCODE de los parámetros PBC1, PBC2 y NFR, en la tabla 9. Los datos en Amarillo y en Blanco son parámetros que consideramos ideales para seleccionar datos con un buen alineamiento.

Name Files	Sample	NFR	PBC1	PBC2
S001845_ATACseq_ATACseq_hsap_cord_blood_CD8_T_cell	Neonate	0.7276863	0.8548507	6.909462
S001846_ATACseq_ATACseq_hsap_venous_blood_CD8_T_cell	Adult	0.4192793	0.7076517	3.764452
S001985_ATACseq_ATACseq_hsap_venous_blood_CD8_T_cell	Adult	0.480612	0.7210128	3.640943
S001987_ATACseq_ATACseq_hsap_coord_blood_CD8_T_cell	Neonate	0.6597953	0.8169633	5.538502
S002261_ATACseq_ATACseq_hsap_coord_blood_preterm_CD8_T_cell	Neonate Preterm	0.371023	0.6081386	2.629778
S002262_ATACseq_ATACseq_hsap_coord_blood_CD8_T_cell	Neonate	0.2922253	0.5404921	2.448084
S002263_ATACseq_ATACseq_hsap_venous_blood_CD8_T_cell	Adult	0.5852096	0.7682658	4.382012
S002264_ATACseq_ATACseq_hsap_venous_blood_CD8_T_cell	Adult	0.6716435	0.8289893	6.061221

Tabla 9. Medidas de calidad del alineamiento del ATAC-seq obtenidas del programa ATACseqQC. Medidas de las calidades de NRF, PBC1 y PBC2 en 4 muestras de ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ neonatales. NRF=Non-Redundant Fraction, PBC1=PCR bottleneck Coefficient 1, PBC2=PCR bottleneck Coefficient 2.

Otra medida de calidad fueron los tamaños del fragmento que forman la read 1 y read 2, obtenidos del programa FragSizeDist de la paquetería ATACseqQC de Bioconductor (Ou et al., 2018). Estos tamaños nos dan información acerca de el corte de la transposasa en el DNA, si tenemos mononucleosomas, dinucleosomas, etc. (Figura 50A).

A)



B)

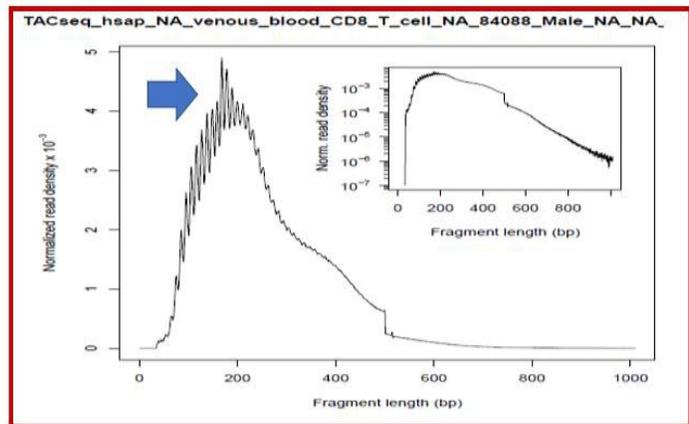
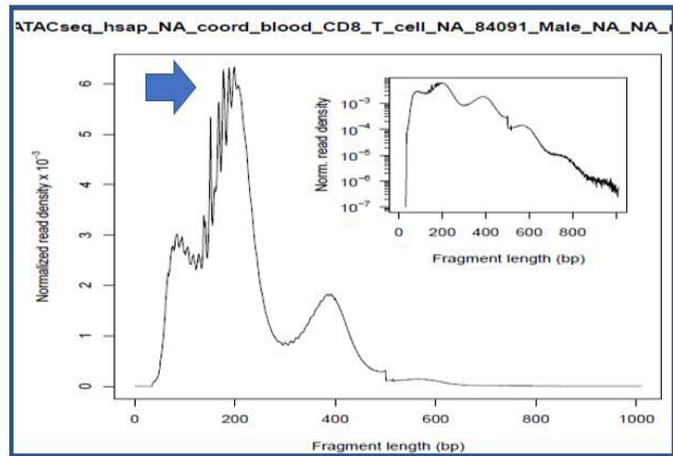


Figura 50. Tamaño del fragmento obtenidos del ATAC-seq. A) Ejemplo de la distribución del tamaño de los fragmentos del ATAC-seq de los núcleos de una línea celular GM12878 (rojo) indica la periodicidad dependiente de la cromatina con una frecuencia espacial consistente con nucleosomas (recuadro). Observamos un histograma en una transformación logarítmica, donde muestra la periodicidad persistente hasta llegar a seis nucleosomas (Buenrostro et al., 2013). B) (azul) Muestra de ATAC-seq de

linfocito T CD8⁺ de neonato que presenta una buena distribución de los fragmentos, (rojo) muestra de ATAC-seq de linfocito T CD8⁺ de adulto con una distribución de fragmentos regular.

Se analizó la distribución de los tamaños de los fragmentos de las muestras de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos, se observó que algunos de nuestros archivos alineados contienen tamaños de fragmentos arriba de los 400 pb (Figura 51), por lo que en esos tamaños de los fragmentos podemos tener hasta hexonucleosomas. Esto se consideró al hacer el llamado de picos con MACS2, ya que debemos considerar que el tamaño del fragmento para hacer la selección de picos tenga una longitud de 200pb, que es el tamaño del fragmento asociado a los mono nucleosomas.

A)

B)

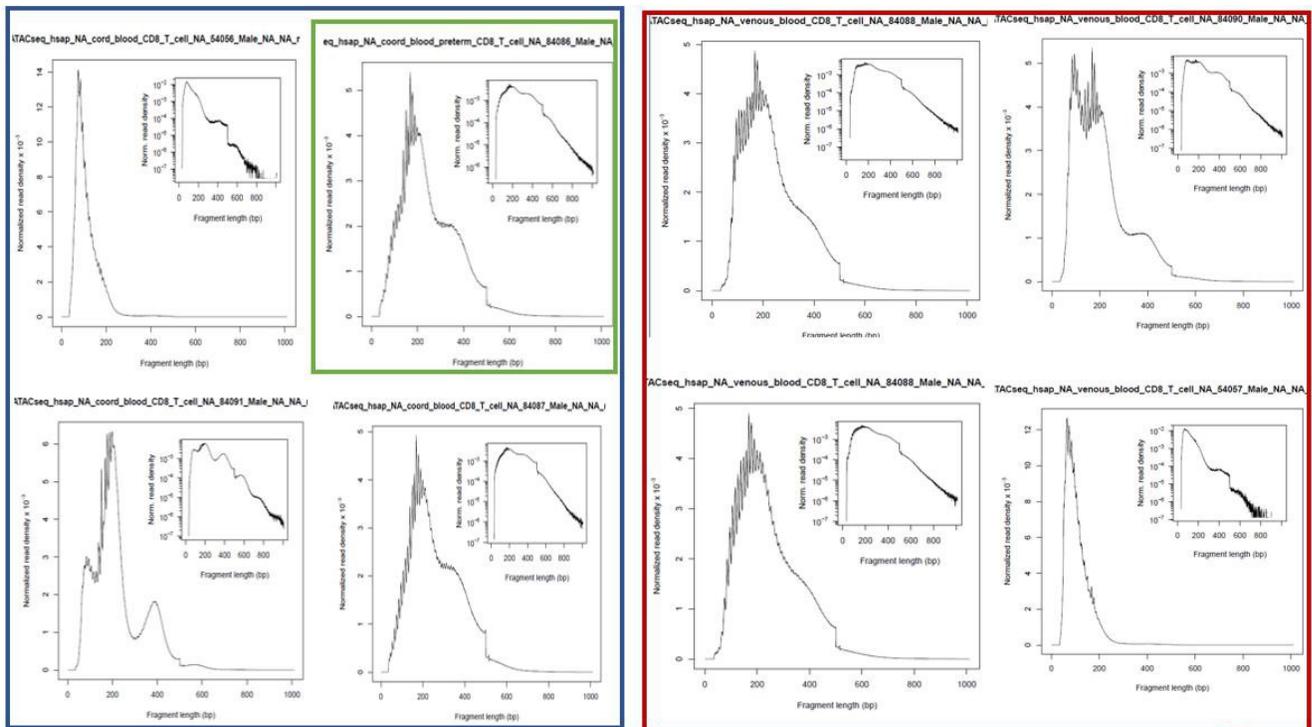


Figura 51. Distribución de tamaños de los fragmentos en las muestras de ATAC-seq de

linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos. A) (Azul) Distribución de tamaños de los fragmentos de los ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ neonatales de término, (verde) distribución de tamaños de los fragmentos del ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ neonatales de prematuro. B) (rojo) Distribución de tamaños de los fragmentos de 4 muestras de linfocitos T CD8⁺ de adultos.

Una vez seleccionados los archivos con una buena calidad de alineamiento a partir de todos los parámetros establecidos por ENCODE, utilizamos 3 parámetros más para seleccionar los mejores datos, los parámetros adicionales fueron: la visualización de genes control, el número de picos y el análisis de principales componentes.

En la visualización de genes control en los archivos alineados, que se realizó con el programa Genome Browser de UCSC (Kent et al., 2002), seleccionamos dos genes control actina B (*ACTB*) y el gen de clúster de diferenciación 19 (*CD19*) (Figura 52), siendo el primero un control positivo para las células ya que se encuentra constitutivamente activa su transcripción y el segundo fue el control negativo, ya que este gen solo se expresa en células B.

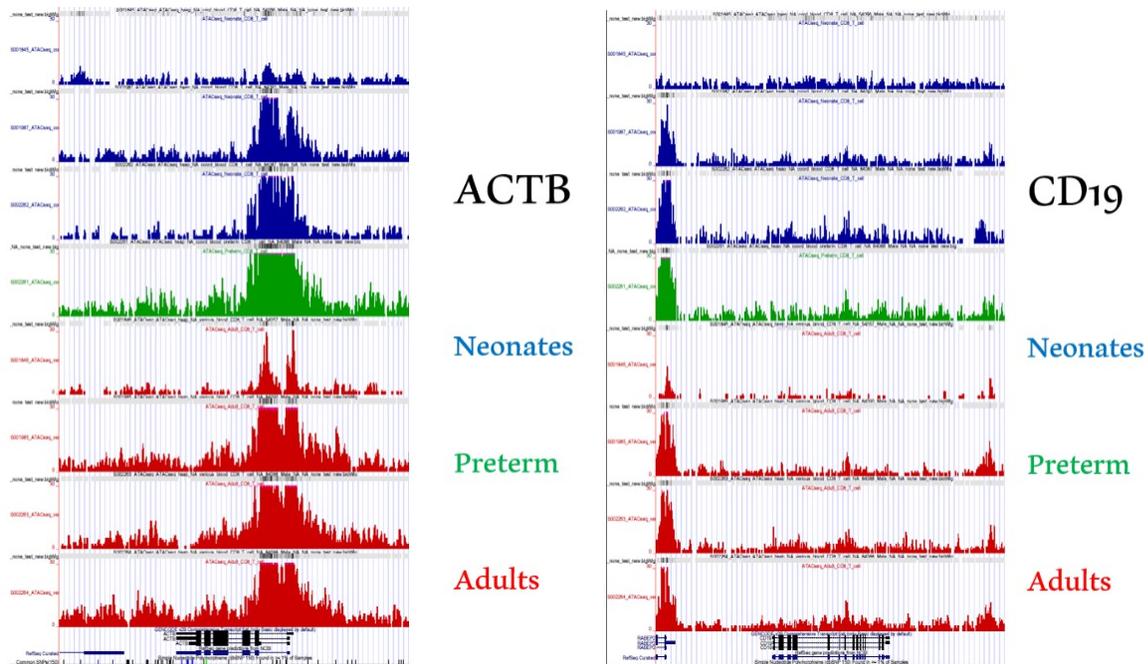


Figura 52. Visualización en Genome Browser de genes control. (Izquierda) Visualización del gen *ACTB* de los datos de ATAC-seq de (azul)linfocitos T CD8⁺ de neonatos de término, (verde) linfocitos T CD8⁺ de neonatos de pretérmino y (rojo) linfocitos T CD8⁺ de adulto. (Derecha) Visualización del gen *CD19* de los datos de ATAC-seq de (azul)linfocitos T CD8⁺ de neonatos de término, (verde) linfocitos T CD8⁺ de neonatos de pretérmino y (rojo) linfocitos T CD8⁺ de adulto.

Observamos a *ACTB* como control positivo del ATAC-seq, este gen presentaba la expresión de diferentes picos en las regiones libres de nucleosomas (Figura 52, izquierda). Sin embargo, en una muestra del ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ neonatales no observamos presencia de picos en el gen de *ACTB* (Figura 52). En el caso del control negativo que fue *CD19*, este gen no se expresa en células T y observamos que no tienen la presencia de señales de picos de regiones libres de nucleosomas, solo observamos background (Figura 52, derecha).

Después de visualizar los genes control, se realizó el llamado de picos para cada archivo de alineamiento con MACS2 (Y. Zhang et al., 2008). El número mínimo de picos a considerar en ATAC-seq es ≥ 17000 . Se observó que la mayoría de nuestros datos cumplen con ese rango de número de picos llamados por el programa MACS2, a excepción de una muestra de neonato que nos salen 5926 picos llamados (Figura 53), la cual desde la visualización no mostraba presencia de picos, por lo que se descartó esta muestra.

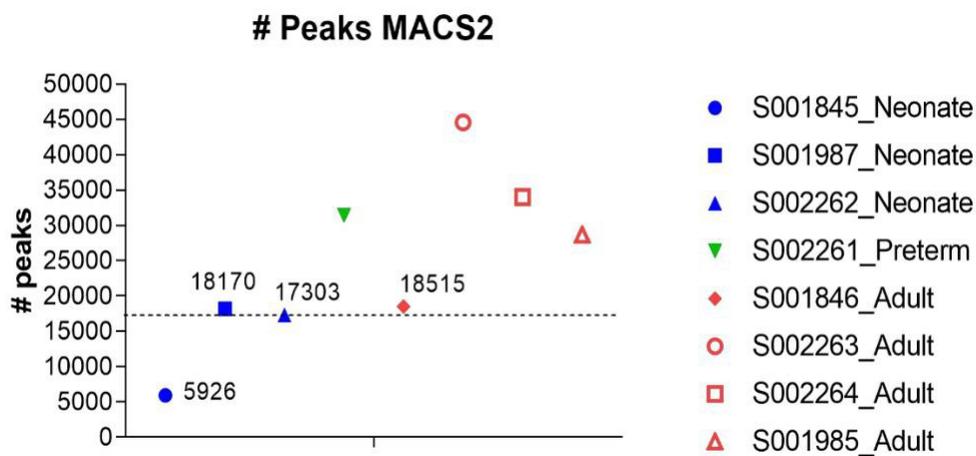


Figura 53. Número de picos llamados con MACS2 en ATAC-seq de células T CD8⁺ neonatales y de adultos. (Azul) Número de picos llamado con el programa MACS2 del ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos de término y (verde) prematuro, (rojo) número de picos llamado con MACS2 del ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ de adulto.

Finalmente, para terminar nuestro análisis de calidad de los datos y seleccionar las mejores muestras de ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos. Realizamos el análisis del principal componente (PCA) de los datos de ATAC-seq. En el que se observó que los ATAC-seq de las células neonatales se agrupan con las células neonatales, sin embargo, dos datos de

linfocitos T CD8⁺ de adulto se agrupan atípicamente y tuvieron menos picos, lo que puede significar que los datos no funcionaron bien (Figura 54A). Por lo tanto se descartaron esos dos datos del ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ de adultos.

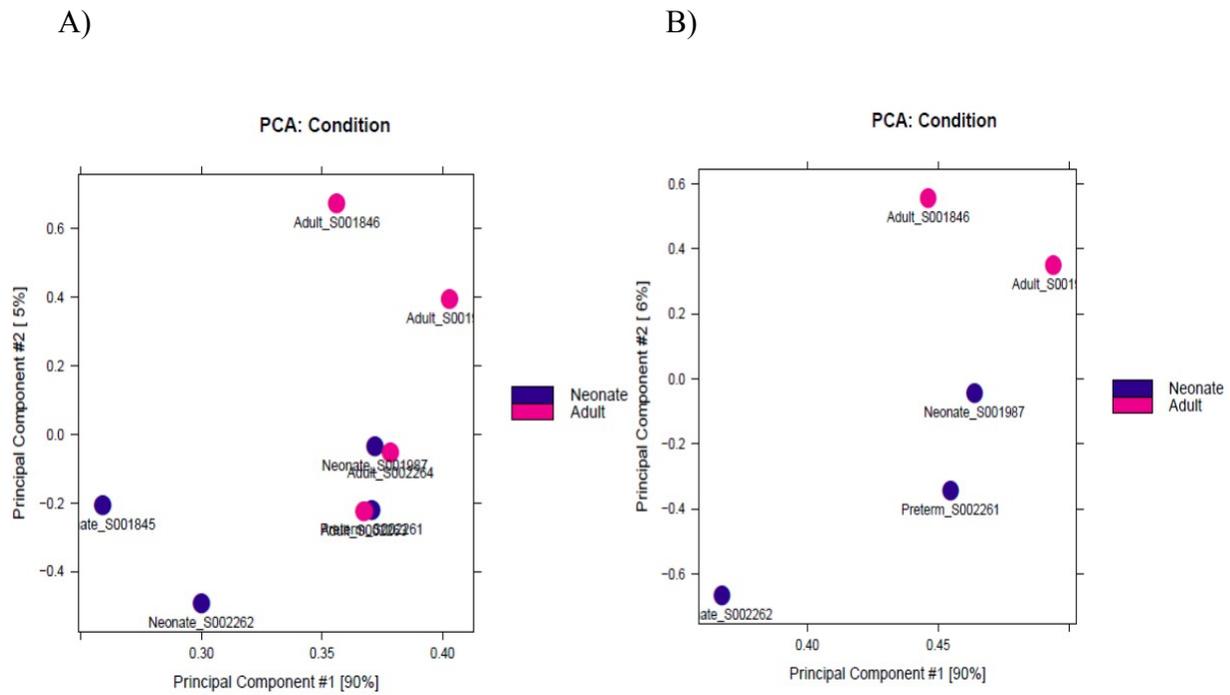


Figura 54. Análisis de Principal Componente (PCA) del ATAC-seq de células T CD8⁺ de neonatos y adultos. A) Análisis del principal componente de todas las muestras de ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos. B) Análisis del principal componente de las muestras seleccionadas del ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

Con todos los datos obtenidos en el análisis de calidad de los datos de ATAC-se, se seleccionaron 3 muestras de linfocitos T CD8⁺ neonatales y 2 muestras de linfocitos T CD8⁺ de adulto, que tenían los mejores parámetros de calidad. Los datos seleccionados fueron el ATAC-

seq de los linfocitos T CD8⁺ del adulto marcado con el código “S001985” y el adulto “S001846” y los datos de ATAC-seq en las células neonatales fueron el neonato de termino marcado con el código “S002262”, el otro neonato de termino seleccionado tenía el código “S001987” y por último tenemos a un neonato de pretérmino con el código “S002261”. Estos datos se utilizaron para combinarlos con los estados de la cromatina y tener un análisis más fino de las regiones regulatorias a definir.

Se realizó el análisis de PCA para los datos seleccionados del ATAC-seq (Figura 54B), donde observamos que los datos de las células neonatales se agrupan con las células neonatales y las células de adultos con las células de adulto.

Una vez seleccionado los datos de ATAC-seq con los que se trabajarían, realizamos un primer análisis de correlación entre los picos diferenciales del ATAC-seq entre las muestras de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos con las paqueterías de Bioconductor: R Diffbind y DES-seq, esto se realizó para saber cómo se agrupaban los datos de picos diferenciales.

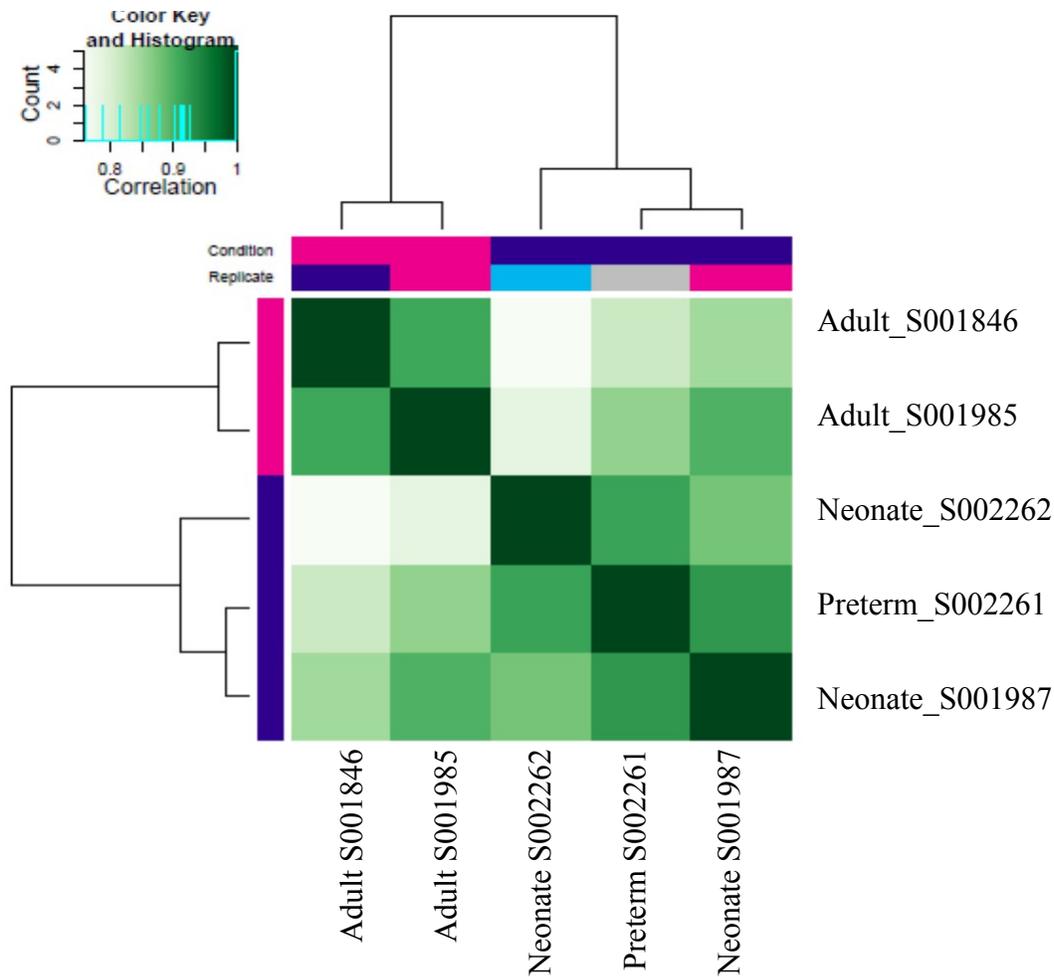


Figura 55. Heatmap de correlaciones de los picos diferenciales de ATAC-seq de células T $CD8^+$ de neonatos y adultos humanos.

Se observó que los picos diferenciales de neonatos tienen una mayor correlación (Figura 55) entre ellos en comparación con los datos de los linfocitos T $CD8^+$ de adulto y los picos diferenciales de adultos igual tienen una correlación entre ambas muestras de adulto. Por lo que esto nos indica que podíamos utilizar esas muestras por su buena calidad.

Anexo 11. Tablas

Tabla 1. LncRNAs y funciones potenciales.

Tabla 2. Factores Transcripcionales relacionados con los motivos nuevos encontrados en las regiones promotoras de los diez clústeres de genes diferencialmente expresados en linfocitos T CD8⁺ de neonato y adulto.

Tabla 3. Datos seleccionados del ChIP-seq de las seis diferentes marcas de histonas en linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos para hacer el ChromHMM.

Tabla 4A. Análisis de motivos de Factores transcripcionales en regiones regulatorias de linfocitos T CD8⁺ de neonatos humanos.

Tabla 4B. Análisis de motivos de Factores transcripcionales en regiones regulatorias de linfocitos T CD8⁺ de adultos humanos.

Tabla 5. Análisis de motivos de Factores transcripcionales en regiones regulatorias filtradas con el ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos.

Tabla 6A. Métricas de Calidad de ENCODE de los datos de ChIP-seq de linfocitos T CD8⁺ de adultos.

Tabla 6B. Métricas de Calidad de ENCODE de los datos de ChIP-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos.

Tabla 7A. Resultados IDR de ChIP-seq de linfocitos T CD8⁺ de adultos.

Tabla 7B. Resultados IDR de ChIP-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos.

Tabla 8. Rangos de calidades de ENCODE para datos de ATAC-seq.

Tabla 9. Medidas de calidad del alineamiento del ATAC-seq obtenidas del programa ATACseqQC.

Anexo 12. Figuras

Figura 1. Señalización TCR.

Figura 2. Señalización IL-12.

Figura 3. Representación simplificada de las vías metabólicas activadas durante la señalización del TCR.

Figura 4. Vías de metilación del DNA

Figura 5. Distribución genómica de CGIs.

Figura 6. Metilación de citosina.

Figura 7. El estado de la cromatina en CGIs.

Figura 8. Mapa de calor de genes asociados a citotoxicidad de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos.

Figura 9. Mapa de calor de genes asociados a actividad antimicrobiana en linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos.

Figura 10. Pureza de Linfocitos T CD8⁺ vírgenes de adultos y neonatos utilizados en el RNA-seq y MeDIP-qPCR.

Figura 11. TCR o TCR/IL-12 induce la respuesta en células T CD8⁺ neonatales y de adulto.

Figura 12. Vías enriquecidas en células T CD8⁺ neonatales sin estimulación.

Figura 13. Niveles basales y patrones de respuesta de los genes diferencialmente expresados entre células T CD8⁺ neonatales y de adulto.

Figura 14. Comparación entre los genes en respuesta al TCR y TCR/IL-12 de las células T CD8⁺ neonatales.

Figura 15. Expresión de NeST (IFNG-AS1) e IFN γ durante la estimulación de células T CD8⁺ de adultos y neonatos.

Figura 16. Genes inducidos por las señales del TCR en células T CD8⁺ de adulto, que fueron solamente inducidos por TCR/IL-12 en las células neonatales.

Figura 17. Genes neonatales que responden exacerbadamente al TCR en células T CD8⁺ neonatales.

Figura 18. Genes significativamente con baja expresión por las señales del TCR/IL-12 en células T CD8⁺ neonatales.

Figura 19. Genes neonatales sobreexpresados que no cambian por la estimulación.

Figura 20. Genes neonatales sobreexpresados, con una respuesta exacerbada a las señales TCR/IL-12.

Figura 21. Cambios en la metilación de los promotores inducidos por las señales del TCR o TCR/IL-12.

Figura 22. Mecanismos involucrados en la regulación epigenética.

Figura 23. Estados de la cromatina son definidos por diferentes modificaciones de histonas, FTs y la unión de RNA Pol II.

Figura 24. Distribución de las modificaciones de histonas.

Figura 25. La adopción de los estados de la cromatina para descifrar la interacción entre las marcas epigenéticas en múltiples condiciones biológicas.

Figura 26. Organización del genoma en eucariontes de ordenes altos a ordenes primarios.

Figura 27. Mecanismo de identificación de accesibilidad de la cromatina usando la transposasa Tn5.

Figura 28. Los principales pasos del procedimiento del ATAC-seq.

Figura 29. Pureza de Linfocitos T CD8⁺ vírgenes de adultos y neonatos utilizados en el ATAC-seq.

Figura 30. Los 9 clústeres de genes diferencialmente expresado en linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

Figura 31. Clúster de genes diferenciales asociados a tolerancia.

Figura 32. Análisis de motivos de factores transcripcionales con intermedio enriquecimiento en los clústeres de genes diferenciales de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

Figura 33. Expresión de los genes de los factores transcripcionales TCF1 y LEF1 en linfocitos T CD8⁺ neonatales y de adulto.

Figura 34. Enriquecimiento de motivos de factores transcripcionales involucrados en la activación de los linfocitos T en los promotores de genes de los diferentes clústeres.

Figura 35. Sobrelape del ChIP-seq de los Factores Transcripcionales involucrados en la activación de los linfocitos T de diferentes líneas celulares en las regiones promotoras de genes de los diferentes clústeres.

Figura 36. Estados de la cromatina de linfocitos T CD8⁺ vírgenes de neonatos y adultos humanos.

Figura 37. Visualización en el Genome Browser de los Estados de la cromatina en genes control.

Figura 38. Sobrelape de los ChIP-seq de Factores Transcripcionales de líneas celulares con las regiones regulatorias de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos.

Figura 39. Análisis de vías de señalización en regiones transcripcionalmente activas de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos.

Figura 40. Análisis de vías de señalización en regiones de enhancers altamente activos de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos.

Figura 41. Análisis de vías de señalización en regiones de enhancers baja actividad de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos.

Figura 42. Sobrelape de los ChIP-seq de los Factores Transcripcionales de diferentes líneas celulares en las regiones promotoras de genes de los diferentes clústeres

Figura 43. Calidad de FASTQC de los archivos fastq de ChIP-seq de las diferentes modificaciones de histonas en linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

Figura 44. Phantom peak de ChIP-seq de modificaciones de histonas de linfocitos T CD8⁺ de adultos y neonatos.

Figura 45. Métricas de Calidad de los ChIP-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

Figura 46. Número de picos broad en los datos de ChIP-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos.

Figura 47. Visualización de picos de las seis distintas marcas de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos en Genome Browser en genes control.

Figura 48. Calidad de FASTQC de los archivos fastq en las read 1 y 2.

Figura 49. Medidas de Calidad de Alineamiento (Porcentaje de alineamiento y Relación mitocondrial).

Figura 50. Tamaño del fragmento obtenidos del ATAC-seq.

Figura 51. Distribución de tamaños de los fragmentos en las muestras de ATAC-seq de linfocitos T CD8⁺ de neonatos y adultos.

Figura 52. Visualización en Genome Browser de genes control.

Figura 53. Numero de picos llamados con MACS2 en ATAC-seq de células T CD8⁺ neonatales y de adultos.

Figura 54. Análisis de Principal Componente (PCA) del ATAC-seq de células T CD8⁺ de neonatos y adultos.

Figura 55. Heatmap de correlaciones de los picos diferenciales de ATAC-seq de células T CD8⁺ de neonatos y adultos humanos.

Bibliografía

- Abbas, A. K. (2012). *INMUNOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR (SEPTIMA)*.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *INMUNOLOGÍA celular y molecular (Octava)*.
- Adatara, P., Afaya, A., Salia, S. M., Afaya, R. A., Konlan, K. D., Agyabeng-Fandoh, E., Agbinku, E., Ayandayo, E. A., & Boahene, I. G. (2019). Risk Factors Associated with Neonatal Sepsis: A Case Study at a Specialist Hospital in Ghana. *Scientific World Journal, 2019*, 0–2.
<https://doi.org/10.1155/2019/9369051>
- Almeida, L., Lochner, M., Berod, L., & Sparwasser, T. (2016). Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Seminars in Immunology, 28*(5), 514–524.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.10.009>
- Ansel, K. M., Lee, D. U., & Rao, A. (2003). An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nature Immunology, 4*(7), 616–623. <https://doi.org/10.1038/ni0703-616>
- Aramburu, J., & López-Rodríguez, C. (2019). Regulation of inflammatory functions of macrophages and T lymphocytes by NFAT5. *Frontiers in Immunology, 10*(MAR).
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00535>
- Audia, J. E., & Campbell, R. M. (2016a). Histone modifications and cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 8*(4), 1–32.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019521>
- Audia, J. E., & Campbell, R. M. (2016b). Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data.* (2018).
<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Barlic, J., McDermott, D. H., Merrell, M. N., Gonzales, J., Via, L. E., & Murphy, P. M. (2004). Interleukin

- (IL)-15 and IL-2 reciprocally regulate expression of the chemokine receptor CX3CR1 through selective NFAT1- and NFAT2-dependent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 48520–48534. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406978200>
- Bartke, T., Vermeulen, M., Xhemalce, B., Robson, S. C., Mann, M., & Kouzarides, T. (2010). Nucleosome-Interacting Proteins Regulated by DNA and Histone Methylation. *Cell*, 143(3), 470–484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.012>
- Basha, S., Surendran, N., & Pichichero, M. (2014). Immune responses in neonates. *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(9), 1171–1184. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.942288>
- Bell, C. G., Lowe, R., Adams, P. D., Baccarelli, A. A., Beck, S., & Bell, J. T. (2019). *DNA methylation aging clocks : challenges and recommendations*. 1–24.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Branch, S., & Biology, M. (2016). *IL-12 FAMILY CYTOKINES : GENERAL CHARACTERISTICS , PATHOGENIC MICROORGANISMS , RECEPTORS , AND SIGNALLING PATHWAYS*. 63(1), 1–25. <https://doi.org/10.1556/030.63.2016.1.1>
- Brettingham-Moore, K. H., Taberlay, P. C., & Holloway, A. F. (2015). Interplay between transcription factors and the epigenome: Insight from the role of RUNX1 in leukemia. *Frontiers in Immunology*, 6(SEP), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00499>
- Buenrostro, J. D., Giresi, P. G., Zaba, L. C., Chang, H. Y., & Greenleaf, W. J. (2013). Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nature Methods*, 10(12), 1213–1218. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2688>
- Caramori, G., Lim, S., Ito, K., Tomita, K., Oates, T., Jazrawi, E., Chung, K. F., Barnes, P. J., & Adcock, I. M.

- (2001). Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies. *European Respiratory Journal*, *18*(3), 466–473.
<https://doi.org/10.1183/09031936.01.00040701>
- Castillo, A. (2016). *Efecto de la transfección de siRNAs contra TCF y Lef en linfocitos T de neonatos y adultos humanos*.
- Cavalli, G. (2007). Chromosome kissing. *Current Opinion in Genetics and Development*, *17*(5), 443–450.
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.08.013>
- Chang, P., Gohain, M., Yen, M. R., & Chen, P. Y. (2018). Computational Methods for Assessing Chromatin Hierarchy. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *16*, 43–53.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.02.003>
- Chen, C.-J., Hou, J.-W., & Chiang, B.-L. (2014). The difference in immune response and IL-12p35 methylation between newborns and adults. *Journal of Biomedical Science*, *21*(1), 76.
<https://doi.org/10.1186/s12929-014-0076-0>
- Chen, L., & Flies, D. B. (2013). *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition*. *13*(April), 227–242. <https://doi.org/10.1038/nri3405>
- Chèneby, J., Ménétrier, Z., Mestdagh, M., Rosnet, T., Douida, A., Rhalloussi, W., Bergon, A., Lopez, F., & Ballester, B. (2020). ReMap 2020: a database of regulatory regions from an integrative analysis of Human and Arabidopsis DNA-binding sequencing experiments. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D180–D188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz945>
- Chisolm, D. A., & Weinmann, A. S. (2015). TCR-signaling events in cellular metabolism and specialization. *Frontiers in Immunology*, *6*(JUN), 10–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00292>
- Chougnat, C. (2018). Human Fetal immune cells fight back. *Sci Transl Med*, *10*(438), 139–148.

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

Concetta G.A. Marfella¹ and Anthony N. Imbalzano. (2007). The Chd Family of Chromatin Remodelers

Concetta. *The Chd Family of Chromatin Remodelers*, 605(1), 105–112.

<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.017>.Two-stage

Crist, S. A., Elzey, B. D., Ahmann, M. T., & Ratliff, T. L. (2013). Early growth response-1 (EGR-1) and

nuclear factor of activated T cells (NFAT) cooperate to mediate CD40L expression In

megakaryocytes and platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 288(47), 33985–33996.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.511881>

Curtsinger, J. M., & Mescher, M. F. (2011). Inflammatory Cytokines as a Third Signal for T Cell Activation.

Curr Opin Immunol, 22(3), 333–340. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.013>.Inflammatory

Daniel Harris, BA, Lynn McNicoll, MD, Gary Epstein-Lubow, MD, and Kali S. Thomas, P. (2017).

Significant role for IRF3 in both T cell and APC effector functions during T cell responses. *Cell*

Immunol, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

Das C, Lucia MS, H. K. and T. J. (2017). ETV6 in Hematopoiesis and Leukemia Predisposition

Hanno. *Semin Hematol*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

de Pretis, S., & Pelizzola, M. (2014). Computational and experimental methods to decipher the

epigenetic code. *Frontiers in Genetics*, 5(SEP), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00335>

Deaton, M., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. 1010–

1022. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511.1010>

Debock, I., & Flamand, V. (2014). Unbalanced neonatal CD4⁺ T-cell immunity. *Frontiers in Immunology*,

5(AUG), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00393>

- Decker, E. L., Nehmann, N., Kampen, E., Eibel, H., Zipfel, P. F., & Skerka, C. (2003). Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression. *Nucleic Acids Research*, *31*(3), 911–921.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkg186>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, *29*(1), 15–21.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Ernst, J., & Kellis, M. (2012). ChromHMM: automating chromatin-state discovery and characterization. *Nat Methods.*, *9*(3), 215–216. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1906>
- Farber, D., Naomi A., Y., & Nicholas P., R. (2014). Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis Donna. *Nat Rev Immunol*, *14*(1), 24–35.
<https://doi.org/10.1038/nri3567.Human>
- Fessele, K. L., & Wright, F. (2018). Primer in Genetics and Genomics, Article 6: Basics of Epigenetic Control. *Biological Research for Nursing*, *20*(1), 103–110.
<https://doi.org/10.1177/1099800417742967>
- Fike, A. J., Kumova, O. K., & Carey, A. J. (2019). Dissecting the defects in the neonatal CD8+ T-cell response. *Journal of Leukocyte Biology*, *106*(5), 1051–1061. <https://doi.org/10.1002/JLB.5RU0319-105R>
- Fliegert, R., Heeren, J., Koch-Nolte, F., Nikolaev, V. O., Lohr, C., Meier, C., & Guse, A. H. (2019). Adenine nucleotides as paracrine mediators and intracellular second messengers in immunity and inflammation. *Biochemical Society Transactions*, *47*(1), 329–337.
<https://doi.org/10.1042/BST20180419>

- Franchina, D. G., Dostert, C., & Brenner, D. (2018). Reactive Oxygen Species: Involvement in T Cell Signaling and Metabolism. *Trends in Immunology*, *39*(6), 489–502.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2018.01.005>
- Gal-Oz, S. T., Maier, B., Yoshida, H., Seddu, K., Elbaz, N., Czysz, C., Zuk, O., Stranger, B. E., Ner-Gaon, H., & Shay, T. (2019). ImmGen report: sexual dimorphism in the immune system transcriptome. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12348-6>
- Galindo-albarr, A. O., Imbert, J., Oscar, H., Hern, A., Ferrier, P., Spicuglia, S., & Ang, M. (2015). *Human Neonate CD8 T cells are biased towards innate immunity defense mechanisms. I*(1).
- Galindo-Albarrán, A. O. (2013). *Regulación epigenética durante la activación de linfocitos T CD8 + de neonatos humanos.*
- Galindo-Albarrán, A. O., López-Portales, O. H., Gutiérrez-Reyna, D. Y., Rodríguez-Jorge, O., Sánchez-Villanueva, J. A., Ramírez-Pliego, O., Bergon, A., Lloriod, B., Holota, H., Imbert, J., Hernández-Mendoza, A., Ferrier, P., Carrillo-de Santa Pau, E., Valencia, A., Spicuglia, S., & Santana, M. A. (2016). CD8+ T Cells from Human Neonates Are Biased toward an Innate Immune Response. *Cell Reports*, *17*(8), 2151–2160. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.056>
- Gao, J. L., Wynn, T. A., Chang, Y., Lee, E. J., Broxmeyer, H. E., Cooper, S., Tiffany, H. L., Westphal, H., Kwon-Chung, J., & Murphy, P. M. (1997). Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *Journal of Experimental Medicine*, *185*(11), 1959–1968. <https://doi.org/10.1084/jem.185.11.1959>
- Geng, J., Yu, S., Zhao, H., Sun, X., Li, X., Wang, P., Xiong, X., Hong, L., Xie, C., Gao, J., Shi, Y., Peng, J., Johnson, R. L., Xiao, N., Lu, L., Han, J., Zhou, D., & Chen, L. (2017). The transcriptional coactivator TAZ regulates reciprocal differentiation of T H 17 cells and T reg cells. *Nature Immunology*, *18*(7),

800–812. <https://doi.org/10.1038/ni.3748>

- Goedhart, M., Gessel, S., van der Voort, R., Slot, E., Lucas, B., Gielen, E., Hoogenboezem, M., Rademakers, T., Geerman, S., van Buul, J. D., Huveneers, S., Dolstra, H., Anderson, G., Voermans, C., & Nolte, M. A. (2019). CXCR4, but not CXCR3, drives CD8 + T-cell entry into and migration through the murine bone marrow. *European Journal of Immunology*, *49*(4), 576–589. <https://doi.org/10.1002/eji.201747438>
- Gomez, J. A., Wapinski, O. L., Yang, Y. W., Bureau, J., Monack, D. M., Chang, H. Y., Brahic, M., & Kirkegaard, K. (2013). NeST, a long noncoding RNA, controls microbial susceptibility and epigenetic activation of the *Ifng* locus. *Cell*, *152*(4), 743–754. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.015>.NeST
- Gordy, C., & He, Y. W. (2012). Endocytosis by target cells: An essential means for perforin-and granzyme-mediated killing. *Cellular and Molecular Immunology*, *9*(1), 5–6. <https://doi.org/10.1038/cmi.2011.45>
- Greenberg, M. V. C., & Bourc, D. (2019). The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nature Reviews*. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0159-6>
- Halle, S., Halle, O., & Förster, R. (2017). Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends in Immunology*, *xx*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.04.002>
- Henning, A., Roychoudhuri, R., & Restifo, N. (2018). Epigenetic control of CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, *18*(5), 340–356. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Hermann-Kleiter, N., & Baier, G. (2010). NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions. *Blood*, *115*(15), 2989–2997. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-233585>
- Hernández-Acevedo, G. N., López-Portales, O. H., Gutiérrez-Reyna, D. Y., Cuevas-Fernández, E., Kempis-Calanis, L. A., Labastida-Conde, R. G., Aguilar-Luviano, O. B., Ramírez-Pliego, O., Spicuglia, S., Lino-

- Alfaro, B., Chagolla-López, A., González-de la Vara, L. E., & Santana, M. A. (2019). Protein complexes associated with β -catenin differentially influence the differentiation profile of neonatal and adult CD8⁺ T cells. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(10), 18639–18652. <https://doi.org/10.1002/jcp.28502>
- Hida, S., Tadachi, M., Saito, T., & Taki, S. (2005). Negative control of basophil expansion by IRF-2 critical for the regulation of Th1/Th2 balance. *Blood*, *106*(6), 2011–2017. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1344>
- Holtzman, L., & Gersbach, C. A. (2018). Editing the Epigenome: Reshaping the Genomic Landscape. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *19*(1), 43–71. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083117-021632>
- Hu, Z., Zou, Q., & Su, B. (2018). Regulation of T cell immunity by cellular metabolism. *Frontiers of Medicine*, *12*(4), 463–472. <https://doi.org/10.1007/s11684-018-0668-2>
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, *4*(1), 44–57. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
- Huse, M. (2009). The T-cell-receptor signalling network. *Journal of Cell Science*, *122*(9), 1269–1273. <https://doi.org/10.1242/jcs.042762>
- Imanishi, T., & Saito, T. (2020). T Cell Co-stimulation and Functional Modulation by Innate Signals. *Trends in Immunology*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.01.003>
- Inbar-Feigenberg, M., Choufani, S., Butcher, D. T., Roifman, M., & Weksberg, R. (2013). Basic concepts of epigenetics. *Fertility and Sterility*, *99*(3), 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.117>
- Jiang, S., & Mortazavi, A. (2018). Integrating ChIP-seq with other functional genomics data. *Briefings in*

Functional Genomics, 17(2), 104–115. <https://doi.org/10.1093/bfgp/ely002>

Joy, K., Mon, Y., Goldsmith, E., Watson, N. B., Wang, J., Norah, L., Rudd, B. D., Sciences, B., & Collins, F. (2019). Differential Sensitivity to IL-12 Drives Sex-Specific Differences in the CD8+ T Cell Response to Infection. *Immunohorizons*, 3(4), 121–132. <https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1800066>.Differential

Kadonaga, J. T. (1998). Eukaryotic transcription: An interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell*, 92(3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80924-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80924-1)

Kaminuma, O., Kitamura, F., Kitamura, N., Hiroi, T., Miyoshi, H., Miyawaki, A., & Miyatake, S. (2008). Differential Contribution of NFATc2 and NFATc1 to TNF- α Gene Expression in T Cells. *The Journal of Immunology*, 180(1), 319–326. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.319>

Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., & Haussler, a. D. (2002). The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Research*, 12(6), 996–1006. <https://doi.org/10.1101/gr.229102>

Kevin Range, and D. M. Y. A. M. (2012). STAT4 and T-bet are required for the plasticity of IFN- γ expression across Th2 ontogeny and influence changes in Ifng promoter DNA methylation. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Kimura, H. (2013). Histone modifications for human epigenome analysis. *Journal of Human Genetics*, 58(7), 439–445. <https://doi.org/10.1038/jhg.2013.66>

Kindt, T. J., Goldsby, R., & Osborne, B. (2007). *INMUNOLOGÍA de Kuby* (Sexta).

Klein-Hessling, S., Muhammad, K., Klein, M., Pusch, T., Rudolf, R., Flöter, J., Qureischi, M., Beilhack, A., Vaeth, M., Kummerow, C., Backes, C., Schoppmeyer, R., Hahn, U., Hoth, M., Bopp, T., Berberich-

- Siebelt, F., Patra, A., Avots, A., Müller, N., ... Serfling, E. (2017). NFATc1 controls the cytotoxicity of CD8+ T cells. *Nature Communications*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00612-6>
- Kulis, M., & Esteller, M. (n.d.). *DNA Methylation and Cancer*. 70(10). [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(10\)70002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(10)70002-X)
- Labastida-Conde, R. G., Ramírez-Pliego, O., Peleteiro-Olmedo, M., Lopez-Guerrero, D. V., Badillo-Godinez, O. D., Gutiérrez-Xicoténcatl, M. de L., Rosas-Salgado, G., González-Fernández, Á., Esquivel-Guadarrama, F. R., & Santana, M. A. (2018). Flagellin is a Th1 polarizing factor for human CD4+ T cells and induces protection in a murine neonatal vaccination model of rotavirus infection. *Vaccine*, 36(29), 4188–4197. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.06.005>
- Landin-Malt, A., Benhaddou, A., Zider, A., & Flagiello, D. (2016). An evolutionary, structural and functional overview of the mammalian TEAD1 and TEAD2 transcription factors. *Gene*, 592(1), 292–303. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.07.028>
- Landt, S. G., Marinov, G. K., Kundaje, A., Kheradpour, P., Pauli, F., Batzoglou, S., Bernstein, B. E., Bickel, P., Brown, J. B., Cayting, P., Chen, Y., Desalvo, G., Epstein, C., Fisher-aylor, K. I., Euskirchen, G., Gerstein, M., Gertz, J., Hartemink, A. J., Hoffman, M. M., ... Snyder, M. (2012). *ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia*. *PLoS Biol*, 10(12), 1813–1831. <https://doi.org/10.1101/gr.136184.111>.
- Langmead and Steven L Salzberg. (2013). Bowtie2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lawrence, H. J., Sauvageau, G., Humphries, R. K., & Largman, C. (1996). The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem Cells*, 14(3), 281–291. <https://doi.org/10.1002/stem.140281>

- Lawrence, M., Daujat, S., & Schneider, R. (2016). Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends in Genetics*, 32(1), 42–56.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.007>
- Lee, H. H., Hoeman, C. M., Hardaway, J. C., Guloglu, F. B., Ellis, J. S., Jain, R., Divekar, R., Tartar, D. M., Haymaker, C. L., & Zaghouani, H. (2008). Delayed maturation of an IL-12-producing dendritic cell subset explains the early Th2 bias in neonatal immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 205(10), 2269–2280. <https://doi.org/10.1084/jem.20071371>
- Li, L., Jay, S. M., Wang, Y., Wu, S., & Xiao, Z. (2017). IL-12 stimulates CTLs to secrete exosomes capable of activating bystander CD8 + T cells. *Scientific Reports*, July, 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-14000-z>
- Liang, B., Yang, P., Riley, J. L., Carroll, R. G., June, C. H., Hoxie, J., Patterson, B. K., Ohshima, Y., Hodes, R. J., & Delespesse, G. (1998). Productive Infection of Neonatal CD8 + T Lymphocytes by HIV-1. *Journal of Experimental Medicine*, 187(7).
- Lim, P. S., Li, J., Holloway, A. F., & Rao, S. (2013). Epigenetic regulation of inducible gene expression in the immune system. *Immunology*, 139(3), 285–293. <https://doi.org/10.1111/imm.12100>
- Lindsey E. Padgett, & Tse, H. M. (2017). NADPH Oxidase-Derived Superoxide Provides a Third Signal for CD4 T cell Effector Responses. *J Immunol.*, 176(5), 139–148.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Lines, J. L., Hoskins, S., Hollifield, M., Cauley, L. S., & Garvy, B. A. (2010). The Migration of T cells in Response to Influenza Virus is Altered in Neonatal Mice. *J Immunol*, 23(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Liu, C. (2020). Chromatin domains in space and their functional implications. *Current Opinion in Plant Biology*, 54, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2019.11.005>

- Lochner, M., Berod, L., & Sparwasser, T. (2015). Fatty acid metabolism in the regulation of T cell function. *Trends in Immunology*, *36*(2), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.12.005>
- Loison, L. (2019). Canalization and genetic assimilation: Reassessing the radicality of the Waddingtonian concept of inheritance of acquired characters. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *88*, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.05.009>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Maass, P. G., Barutcu, A. R., & Rinn, J. L. (2019). Interchromosomal interactions: A genomic love story of kissing chromosomes. *Journal of Cell Biology*, *218*(1), 27–38. <https://doi.org/10.1083/jcb.201806052>
- Magli, M. C., Largman, C., & Lawrence, H. J. (1997). Effects of HOX homeobox genes in blood cell differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, *173*(2), 168–177. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199711\)173:2<168::AID-JCP16>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199711)173:2<168::AID-JCP16>3.0.CO;2-C)
- Martinez, G. J., Pereira, R. M., Äijö, T., Kim, E. Y., Marangoni, F., Pipkin, M. E., Togher, S., Heissmeyer, V., Zhang, Y. C., Crotty, S., Lamperti, E. D., Ansel, K. M., Mempel, T. R., Lähdesmäki, H., Hogan, P. G., & Rao, A. (2017). The transcription factor NFAT promotes exhaustion of activated CD8+T cells. *Physiology & Behavior*, *176*(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Maxson & Mitchell. (2016). Targeting T cell metabolism to regulate T cell activation, differentiation and function in disease. *Physiology & Behavior*, *176*(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Mc, A. A., Zenteno, E., Chávez, R., & Lascurain, R. (2009). *Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic*

Lymphocytes. 12(February).

McCarron, M. J., & Reen, D. J. (2010). Neonatal CD8+ T-cell differentiation is dependent on interleukin-12. *Human Immunology*, 71(12), 1172–1179. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.09.004>

Mekhail, K., & Moazed, D. (2010). The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(5), 317–328. <https://doi.org/10.1038/nrm2894>.The

Melvin, A. J., McGurn, M. E., Bort, S. J., Gibson, C., & Lewis, D. B. (1995). Hypomethylation of the interferon- γ gene correlates with its expression by primary T-lineage cells. *European Journal of Immunology*, 25(2), 426–430. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250218>

Meng, H., Cao, Y., Qin, J., Song, X., Zhang, Q., Shi, Y., & Cao, L. (2015). DNA Methylation , Its Mediators and Genome Integrity. *International Journal of Biological Sciences*, 11. <https://doi.org/10.7150/ijbs.11218>

Menk, A. V., Scharping, N. E., Moreci, R. S., Zeng, X., Guy, C., Salvatore, S., Bae, H., Xie, J., Young, H. A., Wendell, S. G., & Delgoffe, G. M. (2017). Early TCR Signaling Induces Rapid Aerobic Glycolysis Enabling Distinct Acute T Cell Effector Functions. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

Mescher, M. F., Agarwal, P., Casey, K. A., Hammerbeck, C. D., Xiao, Z., & Curtsinger, J. M. (2007). *Tolerance versus Activation*. 19(3), 153–161.

Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2012). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>

Morales-nebreda, L., Mclafferty, F. S., & Singer, B. D. (2018). DNA methylation as a transcriptional regulator of the immune system. *Translational Research*. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.08.001>

- Musialik, E., Bujko, M., Kober, P., Grygorowicz, M. A., Libura, M., Przestrzelska, M., Juszczyński, P., Borg, K., Florek, I., Jakóbczyk, M., Baranowska, A., & Siedlecki, J. A. (2014). Comparison of promoter DNA methylation and expression levels of genes encoding CCAAT/enhancer binding proteins in AML patients. *Leukemia Research*, *38*(7), 850–856. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.04.013>
- Navarro, M. N., & Cantrell, D. A. (2019). Europe PMC Funders Group Serine-threonine kinases in TCR signaling. *Nat Immunol*, *15*(9), 808–814. <https://doi.org/10.1038/ni.2941>. Serine-threonine
- Neonatal mortality - UNICEF DATA*. (2018). <https://data.unicef.org/topic/child-survival/neonatal-mortality/>
- Nguyen, T. G., Ward, C. M., & Morris, J. M. (2013). To B or not to B cells-mediate a healthy start to life. *Clinical and Experimental Immunology*, *171*(2), 124–134. <https://doi.org/10.1111/cei.12001>
- O’Sullivan, A., Chang, H. C., Yu, Q., & Kaplan, M. H. (2004). STAT4 Is Required for Interleukin-12-induced Chromatin Remodeling of the CD25 Locus. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(8), 7339–7345. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309979200>
- Ou, J., Liu, H., Yu, J., Kelliher, M. A., Castilla, L. H., Lawson, N. D., & Zhu, L. J. (2018). ATACseqQC: A Bioconductor package for post-alignment quality assessment of ATAC-seq data. *BMC Genomics*, *19*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4559-3>
- Oykhman, P., & Mody, C. H. (2010). *Direct Microbicidal Activity of Cytotoxic T-Lymphocytes*. 2010(C). <https://doi.org/10.1155/2010/249482>
- Pälmke, N., Santacruz, D., & Walter, J. (2011). Comprehensive analysis of DNA-methylation in mammalian tissues using MeDIP-chip. *Methods*, *53*(2), 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.07.006>
- Pedroza-Ocampo, N. (2014). *IDENTIFICACIÓN DE GENES POTENCIALMENTE REGULADOS POR TCF1/LEF1*

EN LINFOCITOS TCD8 NEONATALES.

- Pettmann, J., Santos, A. M., Dushek, O., & Davis, S. J. (2018). Membrane ultrastructure and T cell activation. *Frontiers in Immunology*, 9(SEP), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02152>
- Pfelfer, G. P. (2011). *Identification of driver and passenger DNA methylation in cancer by epigenomic analysis*. 1–27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380866-0.60010-1>. Identification
- Pham, D., Yu, Q., Walline, C. C., Muthukrishnan, R., Janice, S., & Kaplan, M. H. (2014). *Opposing roles of STAT4 and Dnmt3a in Th1 gene regulation*. 191(2), 902–911. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203229>. Opposing
- Pope, S. D., & Medzhitov, R. (2018). Emerging Principles of Gene Expression Programs and Their Regulation. *Molecular Cell*, 71(3), 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.017>
- Prabhudas, M., Adkins, B., Gans, H., King, C., Levy, O., Ramilo, O., & Siegrist, C. (2011). *Challenges in infant immunity: implications for responses to infection and vaccines*. 12(3).
- Previte, D. M., O’connor, E. C., Novak, E. A., Martins, C. P., Mollen, K. P., & Piganelli, J. D. (2017). Reactive oxygen species are required for driving efficient and sustained aerobic glycolysis during CD4+ T cell activation. *PLoS ONE*, 12(4), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175549>
- Priyadharshini, B., Greiner, D. L., & Brehm, M. A. (2012). T-cell activation and transplantation tolerance ☆. *Transplantation Reviews*, 26(3), 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2011.09.002>
- Qiu, H., Wang, F., Liu, C., Xu, X., & Liu, B. (2011). TEAD1-dependent expression of the FoxO3a gene in mouse skeletal muscle. *BMC Molecular Biology*, 12(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-12-1>
- Rainsford, E., & Reen, D. J. (2002). Interleukin 10, produced in abundance by human newborn T cells, may be the regulator of increased tolerance associated with cord blood stem cell transplantation.

British Journal of Haematology, 116(3), 702–709.

<https://doi.org/10.1046/j.0007-1048.2001.03321.x>

Razin, a, & Cedar, H. (1991). DNA methylation and gene expression. *Microbiological Reviews*, 55(3), 451–458.

Ren, G., Cui, K., Zhang, Z., & Zhao, K. (2015). Division of labor between IRF1 and IRF2 in regulating different stages of transcriptional activation in cellular antiviral activities. *Cell and Bioscience*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0007-0>

Rudd, B. D. (2020). *Neonatal T Cells: A Reinterpretation*. 229–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-091319>

Saadi, W., Kermezli, Y., Dao, L. T. M., Mathieu, E., Santiago-Algarra, D., Manosalva, I., Torres, M., Belhocine, M., Pradel, L., Loriod, B., Aribi, M., Puthier, D., & Spicuglia, S. (2019). A critical regulator of Bcl2 revealed by systematic transcript discovery of lncRNAs associated with T-cell differentiation. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41247-5>

Sánchez Villanueva, J. A., Rodríguez Jorge, O., Ramírez Pliego, O., Rosas Salgado, G., Wassim, A.-J., Hernandez, C., Naldi, A., Thieffry, D., & Santana, M. A. (2019). Contribution of ROS and metabolic status to neonatal and adult CD8 + T cell activation. *PloS One*, 1–12.

Sanjeevkumar, P., Samina, B., Raghavendra, P., & Gregory, D. (2013). *Epigenetic Mechanisms of Groucho/Grg/TLE Mediated Transcriptional Repression*. 45(2), 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.007>.Epigenetic

Santana, M. A., Galindo-Albarran, A. O., Hernández-Mendoza, A., & Spicuglia, S. (2014). Human Neonatal CD8 TCells are Upregulated in Tolerance-Associated Genes. *Journal of Clinical Immunology*, 34(S2), 139–515. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0101-9>

Sawan, C., & Herceg, Z. (2010). Histone modifications and cancer. *Advances in Genetics*, 70(10), 57–85.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(10\)70003-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(10)70003-1)

Scharer, C. D., Barwick, B. G., Youngblood, B. A., Ahmed, R., & Boss, J. M. (2013). Global DNA Methylation Remodeling Accompanies CD8 T Cell Effector Function. *The Journal of Immunology*, 191(6), 3419–3429. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301395>

Schietinger, A., & Greenberg, P. D. (2014). Tolerance and Exhaustion: Defining Mechanisms of T cell Dysfunction. *Trends Immunol*, 35(2), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.10.001>. Tolerance

Schmidl, C., Delacher, M., Huehn, J., & Feuerer, M. (2018). Mechanisms of allergic diseases Epigenetic mechanisms regulating T-cell responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 142(3), 728–743. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.07.014>

Serfling, E., Klein-Hessling, S., Palmethofer, A., Bopp, T., Stassen, M., & Schmitt, E. (2006). NFAT transcription factors in control of peripheral T cell tolerance. *European Journal of Immunology*, 36(11), 2837–2843. <https://doi.org/10.1002/eji.200536618>

Shin, H. J., Lee, J. B., Park, S. H., Chang, J., & Lee, C. W. (2009). T-bet expression is regulated by EGR1-mediated signaling in activated T cells. *Clinical Immunology*, 131(3), 385–394.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2009.02.009>

Simon, A. K., Hollander, G. A., McMichael, A., & McMichael, A. (2015). Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc. Biol. Sci.*, 282(1821), 1–12.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2014.3085>

Skvortsova, K., Iovino, N., & Bogdanovi, O. (2018). Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nature Reviews*.

Spaapen, F., van den Akker, G. G. H., Caron, M. M. J., Prickaerts, P., Rofel, C., Dahlmans, V. E. H., Surtel,

- D. A. M., Paulis, Y., Schweizer, F., Welting, T. J. M., Eijssen, L. M., & Voncken, J. W. (2013). The Immediate Early Gene Product EGR1 and Polycomb Group Proteins Interact in Epigenetic Programming during Chondrogenesis. *PLoS ONE*, *8*(3).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058083>
- Spilianakis, C. G., Lalioti, M. D., Town, T., Lee, G. R., & Flavell, R. A. (2005). Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature*, *435*(7042), 637–645.
<https://doi.org/10.1038/nature03574>
- Srinivasan, M., & Frauwirth, K. A. (2007). Reciprocal NFAT1 and NFAT2 Nuclear Localization in CD8 + Anergic T Cells Is Regulated by Suboptimal Calcium Signaling . *The Journal of Immunology*, *179*(6), 3734–3741. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3734>
- Starbeck-miller, G. R., & Harty, J. T. (2015). The Role of Il-12 and Type I Interferon in Governing the Magnitude of CD8 T Cell Responses. *Crossroads Between Innate and Adaptive Immunity V*, 31–41.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-15774-0>
- Starbeck-Miller, G. R., Xue, H.-H., & Harty, J. T. (2014). IL-12 and type I interferon prolong the division of activated CD8 T cells by maintaining high-affinity IL-2 signaling in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, *211*(1), 105–120. <https://doi.org/10.1084/jem.20130901>
- Stein, C., Bardet, A. F., Roma, G., Bergling, S., Clay, I., Ruchti, A., Agarinis, C., Schmelzle, T., Bouwmeester, T., Schübeler, D., & Bauer, A. (2015). YAP1 Exerts Its Transcriptional Control via TEAD-Mediated Activation of Enhancers. *PLoS Genetics*, *11*(8), 1–28.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005465>
- Stunnenberg, H. G., Abrignani, S., Adams, D., de Almeida, M., Altucci, L., Amin, V., Amit, I., Antonarakis, S. E., Aparicio, S., Arima, T., Arrighoni, L., Arts, R., Asnafi, V., Badosa, M. E., Bae, J. B., Bassler, K.,

- Beck, S., Berkman, B., Bernstein, B. E., ... Hirst, M. (2016). The International Human Epigenome Consortium: A Blueprint for Scientific Collaboration and Discovery. *Cell*, *167*(5), 1145–1149.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.007>
- Sun, Y., Miao, N., & Sun, T. (2019). Detect accessible chromatin using ATAC-sequencing, from principle to applications. *Hereditas*, *156*, 29. <https://doi.org/10.1186/s41065-019-0105-9>
- Taghon, T., Thys, K., De Smedt, M., Weerkamp, F., Staals, F. J. T., Plum, J., & Leclercq, G. (2003). Homeobox gene expression profile in human hematopoietic multipotent stem cells and T-cell progenitors: Implications for human T-cell development. *Leukemia*, *17*(6), 1157–1163.
<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402947>
- Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A., & Tanaka, N. (2001). IRF Family of Transcription Factors as regulators of Host Defense. *Annu. Rev. Immunol.*
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.623>
- Thomas-Chollier, M., Herrmann, C., Defrance, M., Sand, O., Thieffry, D., & Van Helden, J. (2012). RSAT peak-motifs: Motif analysis in full-size ChIP-seq datasets. *Nucleic Acids Research*, *40*(4).
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr1104>
- Thygesen, S. J., & Stacey, K. J. (2019). IRF 1 and IRF 2 regulate the non-canonical inflammasome . *EMBO Reports*, *20*(9), 2–4. <https://doi.org/10.15252/embr.201948891>
- To, T. K., Saze, H., & Kakutani, T. (2015). Update on DNA Methylation DNA Methylation within Transcribed Regions. *Plant Physiology*, *168*(August), 1219–1225.
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00543>
- Touil, T., Denise, F., Zhang, G.-X., Rostami, A. M., & Gran, B. (2006). Pathophysiology of Interleukin-23 in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Drug News Perspect*, *19*(2), 77–83.

- Upham, J. W., Lee, P. T., Holt, B. J., Heaton, T., Prescott, S. L., Sharp, M. J., Sly, P. D., & Holt, P. G. (2002). Development of interleukin-12-producing capacity throughout childhood. *Infection and Immunity*, 70(12), 6583–6588. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6583-6588.2002>
- Urso, K., Alfranca, A., Martínez-Martínez, S., Escolano, A., Ortega, I., Rodríguez, A., & Redondo, J. M. (2011). NFATc3 regulates the transcription of genes involved in T-cell activation and angiogenesis. *Blood*, 118(3), 795–803. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-322701>
- Uzhachenko, R., Shanker, A., & Dupont, G. (2016). Computational properties of mitochondria in T cell activation and fate. *Open Biology*, 6(11). <https://doi.org/10.1098/rsob.160192>
- Vacaflorosa, A., Freedmana, S., Chapmana, N., & Houtman, J. (2017). Pretreatment of activated human CD8 T cells with IL-12 leads to enhanced TCR-induced signaling and cytokine production Aldo. *Mol Immunol*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Vanden Eijnden, S., Goriely, S., De Wit, D., Goldman, M., & Willems, F. (2006). Preferential production of the IL-12(p40)/IL-23(p19) heterodimer by dendritic cells from human newborns. *European Journal of Immunology*, 36(1), 21–26. <https://doi.org/10.1002/eji.200535467>
- Visekruna, A., & Huber, M. (2014). Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8 + T Cells. *Immunology Therapies Exp.*, 62, 449–458. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y>
- Wang, A., Zhu, F., Liang, R., Li, D., & Li, B. (2019). Regulation of T cell differentiation and function by ubiquitin-specific proteases. *Cellular Immunology*, 340. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.103922>
- Wang, Jianhao, Gao, S., Peng, X., & Wu, K. (2019). Roles of the INO80 and SWR1 Chromatin Remodeling Complexes in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2, 1–17.
- Wang, Jing, Vasaikar, S., Shi, Z., Greer, M., & Zhang, B. (2017). WebGestalt 2017: A more comprehensive,

- powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W130–W137. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx356>
- Wray. (2017). Calcium–NFAT transcriptional signalling in T cell activation and T cell exhaustion. *Cell Calcium*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Xing, S., Li, F., Zeng, Z., Zhao, Y., Yu, S., Zhu, J., Pope, R. M., Musselman, C. A., Zeng, C., & Peng, W. (2016). Tcf1 and Lef1 transcription factors establish CD8+ T cell identity through intrinsic HDAC activity. *Nat Immunol*, 17(6), 695–703. <https://doi.org/10.1038/ni.3456>.Tcf1
- Xu, T., Keller, A., & Martinez, G. J. (2019). NFAT1 and NFAT2 differentially regulate CTL differentiation upon acute viral infection. *Frontiers in Immunology*, 10(FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00184>
- Yanai, H., Chiba, S., Hangai, S., Kometani, K., Inoue, A., Kimura, Y., Abe, T., Kiyonari, H., Nishio, J., Taguchi-Atarashi, N., Mizushima, Y., Negishi, H., Grosschedl, R., & Taniguchi, T. (2018). Revisiting the role of IRF3 in inflammation and immunity by conditional and specifically targeted gene ablation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(20), 5253–5258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803936115>
- Yarde, Danielle, Lorenzo-Arteaga, Kristina, Corley, K. (2014). CD28– CD8+ T cells are significantly reduced and correlate with disease duration in juveniles with type 1 diabetes. *Hum Immunol*, 75(10), 1069–1074. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Yu, D.-H., Ware, C., Waterland, R. a, Zhang, J., Chen, M.-H., Gadkari, M., Kunde-Ramamoorthy, G., Nosavanh, L. M., & Shen, L. (2013). Developmentally programmed 3' CpG island methylation confers tissue- and cell-type-specific transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology*, 33(9), 1845–1858. <https://doi.org/10.1128/MCB.01124-12>

- Zhang, K., Tang, H., Huang, L., Blankenship, J. W., Jones, P. R., Xiang, F., Yau, P. M., & Burlingame, A. L. (2002). Identification of acetylation and methylation sites of histone H3 from chicken erythrocytes by high-accuracy matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight, matrix-assisted laser desorption ionization-postsource decay, and nanoelectrospray ion. *Analytical Biochemistry*, *306*(2), 259–269. <https://doi.org/10.1006/abio.2002.5719>
- Zhang, T., Cooper, S., & Brockdorff, N. (2015). The interplay of histone modifications – writers that read. *EMBO Reports*, *16*(11), 1467–1481. <https://doi.org/10.15252/embr.201540945>
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C. A., Eeckhoute, J., Johnson, D. S., Bernstein, B. E., Nussbaum, C., Myers, R. M., Brown, M., Li, W., & Shirley, X. S. (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biology*, *9*(9). <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada *“Análisis transcriptómico y epigenético de Linfocitos T CD8+ de neonatos y adultos humanos en estado basal y durante la activación”*, que presenta la alumna **Darely Yarazeth Gutiérrez Reyna (5620140701)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Vicente Madrid Marina INSP	Aprobado	
Dra. Sonia Dávila Ramos CIDC-UAEM		
Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva IBT-UNAM	Aprobado	
Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama FM-UAEM		
Dr. Armando Hernández Mendoza CIDC-UAEM		
Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz FM-UAEM		
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC-UAEM		



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2020-06-07 13:54:15 | Firmante

Y5KCIOgnkD7V25Ms63sTKsnG1L/wYbhf8EcpvsgSmlp6UQLd5/7tZjHaNjrvnpvQ1eAwRzJiJ7wA7Vwlefa1XWlzG+7KUyY+q6+j8+iAsn1W/4rrOH+3dr8V5PL0O2CQq8GAhgzwjtj30PXOXoa0LFsxkm0M+8j297YmC6xTaOCi1eiXza4nvl3f9AMmAuBfq4Jb4Sig7RoiSr50UyEs+ODBHValVWLY17JDS4Q4x4Olzfr8FF2GAAGPAqs+MNqjA9PjM0DyxlzsmhS6OI7OjXfQSaGb/tb0vSbVnCb5eLImayZbmb1bFDpjGyhyBN2QmGA+DhvNiwTbnsJfCdQ==

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2020-06-07 13:57:43 | Firmante

bHXPM9rivXi4BBZssPszYGAUrn7EolyfVWEnM4IRszkijAufcLeoJpxj7sWLK0Fbl1+ruxCXmxP/nB9S/MGAZVfCEDayWOegUFTG+sJwLJ26kSR69zrhSziL5fsR3IBQr4c6WypURKRW4b7So1Zt5JfgerRGwK7ASbhXjQpbuwhgHhPcb8B/Lel1CPgzs6bKl1gU9TUArNHFOIThcE5WPBwktjBlb5fqD7GYyR1RMuQ9y8NjT65AJF/fJi9qpl+Xe4DCdE4bLwGF4jo3cs0BrdGjh7vA6eC1sc8ti8LWD2aksmAkYchNM6R1Lk+qRp/NfmT+13uDgxTTYzOLXxQ==

ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA | Fecha:2020-06-07 14:41:39 | Firmante

JnetUICKHWoYKiOuwBV0XkPun3P6cYzm2Kq/kgYIF0gKIO8tFkRES61+z8OCjwTSxFV9MsYdE4LhupBwKhLFpSD5UWxXUfNycWceiFyCGYHxeVC05QPq0mEET8Apovd0yzHWR9xHioYxuc/Wstqlprlw0iv+8rSkbTWD9+qf2iabGuHL4C8i7i/EEx6p0t4Jma1aS4GJV1oB1oXs94N/+uvrCLWUD+rG3XCWzHZBWKNVn29IFDxGrYHqsCV2N3TloeUT/Gt4i2qq/YdYS7JsBHqTuzekOTQZq+9BLvOqEkpkq2bMkVI+jxmJ7Vntz8+2eLY6TeDDG/Fv/4WVpdwA==

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2020-06-07 21:43:57 | Firmante myt21jLeippZZHEll/Mxpd2WUqcRkXOzTFWsyRGmRIPYwG+

+xk5WnX8BbCYsY80dZKA46B5rr/KgCGY0/p1yfY+e1GOJ5YT/vDTn7hiSrOOYAa6cOOE0h/o4fQUnt1reCCutLmswLsodAIUGD5vVcQ+R3Nkbtj+E1YP4ULsrD5CvhHWP2pmUN5mb90sBKUilVaGRTB6DqUd1TLwL614IYUe4qd+cQEP2y3OluV26cCou+57hX7CQRKvzRxxKmngCoWukLpjrbcia4JZCLKrk4tsr6OGPzsekmpJ2d9AIW/wl/tia2thdaj0gpnxireQ95hobZNAyZfllrs4o3Glw==

SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2020-06-08 12:34:01 | Firmante

ZxmLA5leo2qL0PxoJArWAV/TFOddiyQrg1kiZSdj0tT50cgSlltOtCIYrwZm3g1wJz5MiZlt5z1GFaTeJZ32HowTyJ8TFR25mz6E72FB0z+QGEbjuDSZ0Pzd7BdrFV0IY4RRPp0Gnvs1HwvMLu+FUZepaTT5IGXpnGHPsXdqjtt1/MsQf/sd5nnhLyd8oXHKYztCkjhjoMP9UMdfYgorYxeK37UJ2tgM0kqKwUXmtJmlp109tacGRM79CO+I5uTm6e67xhHOMfnHFK+r6oyQrLhSICeteCHhdgFPpR3ZKt9fZC9E/ddzD9oH28mnRcOxssmbvLg9oAzmwall3og==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



VTS1Dp

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/6ilWTdn2kbimwyqvzfrRzimH2eXMyIV9>

