

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE NUEVOS  
DOMINIOS DE DGK $\alpha$  IMPLICADOS EN SU  
ACTIVACIÓN POR EL RECEPTOR  
DE CÉLULAS T**

TESIS DOCTORAL  
ERNESTO MERINO PLAZA  
FEBRERO 2007, MADRID



El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC), bajo la dirección de la Dra. Isabel Mérida.



*A mis padres.  
A ellas, y sobre todo a ti.*

*Qué extraña escena describes y qué extraños prisioneros,  
son iguales que nosotros.*

*Platón; La República, Libro VII*



# Índice





**Introducción** **pag 25**

- Respuesta inmune de la célula T.....pag 25
- Tirosinas quinasas de la familia Src.....pag 27
  - Regulación de las tirosinas quinasas de la familia Src, Lck y Fyn.....pag 28
- PLC $\gamma$ .....pag 29
- PKCs.....pag 31
- RasGRP.....pag 32
- Familia de las DGKs.....pag 34
  - Evolución de las DGKs.....pag 34
  - Estructura de las DGKs.....pag 35
  - Clasificación de las DGKs.....pag 37
- Las DGKs y el sistema inmune.....pag 41
  - DGK $\alpha$ .....pag 42
  - DGK $\zeta$ .....pag 43
- La inducción de anergia como un mecanismo de tolerancia inmunológica de las células T periféricas.....pag 43

**Objetivos** **pag 47****Materiales y métodos** **pag 51****Resultados** **pag 65****1. Estudio de la función de la proteína DGK $\alpha$  en células T como regulador negativo de la activación desencadenada por el TCR.....pag 65**

- La expresión de DGK $\alpha$  durante la activación del TCR depende de la señal coestimuladora del receptor CD28 y de la proliferación desencadenada en las células T.....pag 65
- La actividad DGK $\alpha$  influye de manera negativa en la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 durante la activación de las células T.....pag 67
- La expresión de una forma de DGK $\alpha$  constitutivamente activa disminuye la expresión de los marcadores de superficie CD69 y CD25 desencadenada por el TCR.....pag 68
- La expresión de una forma de DGK $\alpha$  constitutivamente activa disminuye la muerte celular desencadenada por el TCR (AICD).....pag 70
- La expresión de la forma de DGK $\alpha$  constitutivamente activa disminuye la expresión de IL2 e INF $\gamma$ .....pag 71
- La actividad DGK $\alpha$  influye negativamente en el ritmo proliferativo desencadenado por el TCR.....pag 72

**2. Caracterización funcional de nuevos dominios de regulación de DGK $\alpha$  que determinan la localización de la proteína en la membrana plasmática.....pag 73**

- Búsqueda de nuevos dominios de regulación de las DGKs de tipo I.....pag 73
- El extremo carboxilo terminal de la DGK $\alpha$  es necesario para la localización de la

proteína en la membrana plasmática de las células.....	pag 74
• Papel de la actividad DGK $\alpha$ en la localización en la membrana plasmática del mutante de alta afinidad GFP-DGK $\alpha$ $\Delta$ (1-196).....	pag 76
• El mutante GFP-DGK $\alpha$ $\Delta$ (1-196) KD posee los dominios necesarios para la movilización de la DGK $\alpha$ desde el citosol a la membrana plasmática en respuesta a la estimulación del TCR.....	pag 78
<b>3. Determinación del mecanismo y de la función de las tirosinas quinasas de la familia Src en la movilización de la DGK<math>\alpha</math> desde el citosol a la membrana plasmática en respuesta al TCR .....</b>	<b>pag 79</b>
• La tirosina 335 de la DGK $\alpha$ es necesaria para la movilización del mutante GFP-DGK $\alpha$ $\Delta$ (1-196) KD en respuesta a la estimulación del TCR.....	pag 79
• La tirosina 335 no afecta a la localización en la membrana plasmática del mutante constitutivamente activo de la DGK $\alpha$ , GFP-DGK $\alpha$ $\Delta$ (1-196).....	pag 82
• La proteína DGK $\alpha$ se fosforila en tirosina tras la activación del TCR.....	pag 83
• La tirosina quinasa Lck fosforila a la DGK $\alpha$ en la tirosina 335 para estabilizarla en la membrana plasmática en respuesta al TCR.....	pag 85
• La tirosina 335 de la DGK $\alpha$ es importante para regular la actividad de DGK $\alpha$ por un mecanismo independiente de la actividad de la PI3K.....	pag 85
• La mimetización de la fosforilación de DGK $\alpha$ en la tirosina 335 da lugar al aumento de la actividad catalítica de la proteína.....	pag 88
• La tirosina 335 y el Ca <sup>2+</sup> actúan de manera coordinada en el aumento de la actividad DGK $\alpha$ .....	pag 88
• La DGK $\alpha$ atenúa la ruta DAG/Ras/ERK en células de la línea HEK293 por un mecanismo dependiente de la tirosina 335.....	pag 90
• Generación de un anticuerpo capaz de reconocer la fosforilación en la tirosina 335 de la DGK $\alpha$ .....	pag 90
• La proteína DGK $\alpha$ fosforilada en la tirosina 335 se localiza en la membrana plasmática de las células.....	pag 94
• La proteína DGK $\alpha$ se asocia a Lck tras la estimulación del TCR.....	pag 94
• La proteína DGK $\alpha$ se asocia directamente a la Lck en células de la línea HEK293.....	pag 95
• La proteína DGK $\alpha$ se fosforila en la tirosina 335 en respuesta a la estimulación del TCR.....	pag 96
• Las activaciones de la proteína PLC $\gamma$ y de DGK $\alpha$ está coordinadas tras la estimulación del TCR.....	pag 97
• DGK $\alpha$ se fosforila en la tirosina 335 en respuesta al TCR de manera independiente de la señal de coestimulación del receptor CD28, y su cinética de fosforilación depende de la actividad DGK $\alpha$ .....	pag 97
• La fosforilación de DGK $\alpha$ en la tirosina 335 requiere de la acción coordinada del Ca <sup>2+</sup> y de las tirosinas quinasas de la familia Src.....	pag 98

• Estudio de la fosforilación de la tirosina 335 en la función de DGK $\alpha$ como atenuador de la ruta de activación de ERK.....	pag 100
• La fosforilación de la DGK $\alpha$ varía a lo largo de la activación/proliferación desencadenada a partir de la señal del TCR.....	pag 101
<b>4. Estudio de la función de la actividad DGK<math>\alpha</math> en la diferenciación celular de los linfomas anaplásicos de célula grande (ALCL) Karpas 299 y SU-DHL1.....</b>	<b>pag 102</b>
• La actividad tirosina quinasa de NPM-ALK provoca la fosforilación de la DGK $\alpha$ en la tirosina 335.....	pag 103
• La actividad quinasa de DGK $\alpha$ es importante para la proliferación celular de los linfomas ALCL.....	pag 105
• Estudio de la señalización celular regulada por la actividad DGK $\alpha$ y la actividad Src en la proliferación de los tumores que expresan la proteína NPM-ALK.....	pag 105
<b><i>Discusión</i></b> .....	<b><i>pag 111</i></b>
• Regulación de la expresión de DGK $\alpha$ durante la activación del TCR.....	pag 113
• Papel de los dominios de DGK $\alpha$ en su localización en la membrana plasmática..	pag 115
• Regulación de la DGK $\alpha$ por fosforilación en tirosina de la proteína .....	pag 117
• Papel de la DGK $\alpha$ en la proliferación celular.....	pag 121
• Papel de la DGK $\alpha$ en la regulación de la activación y proliferación linfocitaria...	pag 124
<b><i>Conclusiones</i></b> .....	<b><i>pag 129</i></b>
<b><i>Bibliografía</i></b> .....	<b><i>pag 133</i></b>
<b><i>Anexo</i></b> .....	<b><i>pag 151</i></b>



# Lista de abreviaturas



AICD: Muerte celular inducida por activación  
ALK: Quinasa de linfomas anaplásicos  
APC: Célula presentadora de antígeno  
BFA: Brefeldina A  
BSA: Albúmina de suero bovino  
CFSE: *Carboxyfluorescein-succinyl ester*  
ConA: Concanavalina A  
DAG: Diacilglicerol  
DAG-C8: 1,2-dioctanoil- sn-glicerol  
DGK: Diacilglicerol quinasa  
DMSO: Dimetil-sulfóxido  
Dominio C1: Dominio conservado 1  
EGF: Factor de crecimiento epitelial  
ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares  
FCS: Suero bovino fetal  
GAP: Proteína activadora de GTPasas  
GDI: Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina  
GDP: Guanina-difosfato  
GEF: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina  
GFP: Proteína verde fluorescente  
Grb2: Proteína de unión al receptor de factor de crecimiento-2  
GTP: Guanina trifosfato  
HA: Hemaglutinina  
HBSS: Solución salina balanceada de Hepes  
HEPES: Hidroxietil peperazina etanolsulfato  
HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos  
IgG: Inmunoglobulina G  
IL2: Interleuquina 2  
IL3: Interleuquina 3  
IP: Inositol-fosfato  
IP<sub>3</sub>: Inositol-trifosfato  
Jnk: Quinasa Janus  
kDa: KiloDalton  
KLH: *Keyhole Limpet Hemocyanin*  
KO: Ratón deficiente en...  
Lck: Quinasa específica de linfocitos  
LPA: Ácido lisofosfatídico  
LT: Lisado total  
MARCKS: Sustrato de quinasa C miristoilado y rico en alanina  
MEK: Quinasa de MAPK y ERK  
NES: Señal de exporte nuclear

NF $\kappa$ B: Factor nuclear  $\kappa$ B  
 NLS: Secuencia de localización nuclear  
 PA: Ácido fosfatídico  
 PBL: Linfocito de sangre periférica  
 PBS: Tampón salino fosfato  
 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
 PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
 PDK: Quinasa dependiente de fosfoinosítidos  
 PDZ: Dominio presente en PSD-95 Discs-large y Z0-1  
 PFA: Paraformaldehído  
 PH: Dominio de homología a pleckstrina  
 PHA: Fitohemaglutinina  
 PI: Fosfatidilinositol  
 PI(3,4)P<sub>2</sub>: Fosfatidilinositol-3,4-bifosfato  
 PI(3,4,5)P<sub>3</sub>: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato  
 PI(4,5)P<sub>2</sub>: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato  
 PI3K: Fosfatidilinositol-3-quinasa  
 PI4K: Fosfatidilinositol-4-quinasa  
 PI4P5K: Fosfatidilinositol-4-fosfato-5-quinasa  
 PKC: Proteína quinasa C  
 PKD: Proteína quinasa D  
 PLC: Fosfolipasa C  
 PLD: Fosfolipasa D  
 PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato  
 PMSF: *Phenylmethylsulfonyl fluoride*  
 R59022: 6-[2-[4-[(4-fluorophenyl)phenylmethylene]-1-piperidinyl]ethyl]-7-methyl-5H-thiazolo[3,2- $\alpha$ ]pyrimidin-5-one  
 R59949: 3-[2-[4-[bis(4-fluorophenyl)methylene]-1-piperidinyl]ethyl]-2,3-dihydro-2-thioxo-4(1H)-quinazolinone  
 RA: Dominio de asociación a Ras  
 RACK: Receptor para PKC activada  
 RasGRP: Proteína liberadora de nucleótidos de guanina de Ras  
 RE: Retículo endoplásmico  
 RVH: Dominio de homología a recoverina  
 SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS  
 SEE: Enterotoxina de *Staphylococcus*, E  
 SH2: Dominio de homología a Src, 2  
 SH3: Dominio de homología a Src, 3  
 STAT: Transductor de señal y activador de transcripción  
 TCR: Receptor de células T  
 TLC: Cromatografía en capa fina



VEGF: Factor de crecimiento de endotelio vascular  
WB: *Western blot*



# Summary



During T cell activation, hydrolysis of phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) by PLC $\gamma$ 1 induces elevated levels of diacylglycerol (DAG) and inositol 3-phosphate (IP3), two second messengers essential for the correct onset of the immune response. Diacylglycerol kinases (DGKs) phosphorylate DAG to generate phosphatidic acid (PA) and thus modulate the balance between these two second messengers. DGKs are a family of ten isoforms subdivided into five groups. DGK $\alpha$  belongs to the Type I group of DGKs characterized by containing two EF hands. In response to TCR cross-linking with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies, DGK $\alpha$  is recruited to the plasma membrane by a mechanism dependent on calcium influx and tyrosine kinase activation. Furthermore, DGK $\alpha$  is phosphorylated in tyrosine residues and associates to proteins recruited to TCR like Lck. Our results demonstrate that tyrosine 335, found at the hinge between the atypical C1 domains and the catalytic region, is important for enzyme activity and membrane localization. Moreover, we show that tyrosine 335 phosphorylation depends on Lck. All results allow us to postulate a mechanism by which the concerted action of tyrosine kinases and calcium elevation allows the transient, receptor dependent, DGK $\alpha$  translocation. At the plasma membrane, by catalyzing DAG phosphorylation to PA, DGK $\alpha$  acts as a negative modulator of DAG-regulated proteins such as RasGRP1. This ability could explain its relation with anergy process. Anergy constitutes one means of imposing peripheral tolerance in T cells. Anergic cells are unable to initiate a productive response. DGK $\alpha$  had been described as an anergy-associated gene up-regulated in tolerant T cells. Although the role of DGK in anergy induction or maintenance is not clear, our studies show that DGK $\alpha$  over-expression down-modulates T cell activation markers such as CD69, an early marker of activation, and IL2. Moreover, DGK $\alpha$  over-expression diminishes proliferation in response to TCR activation. All data suggest DGK $\alpha$  potential role during anergy.



# Introducción



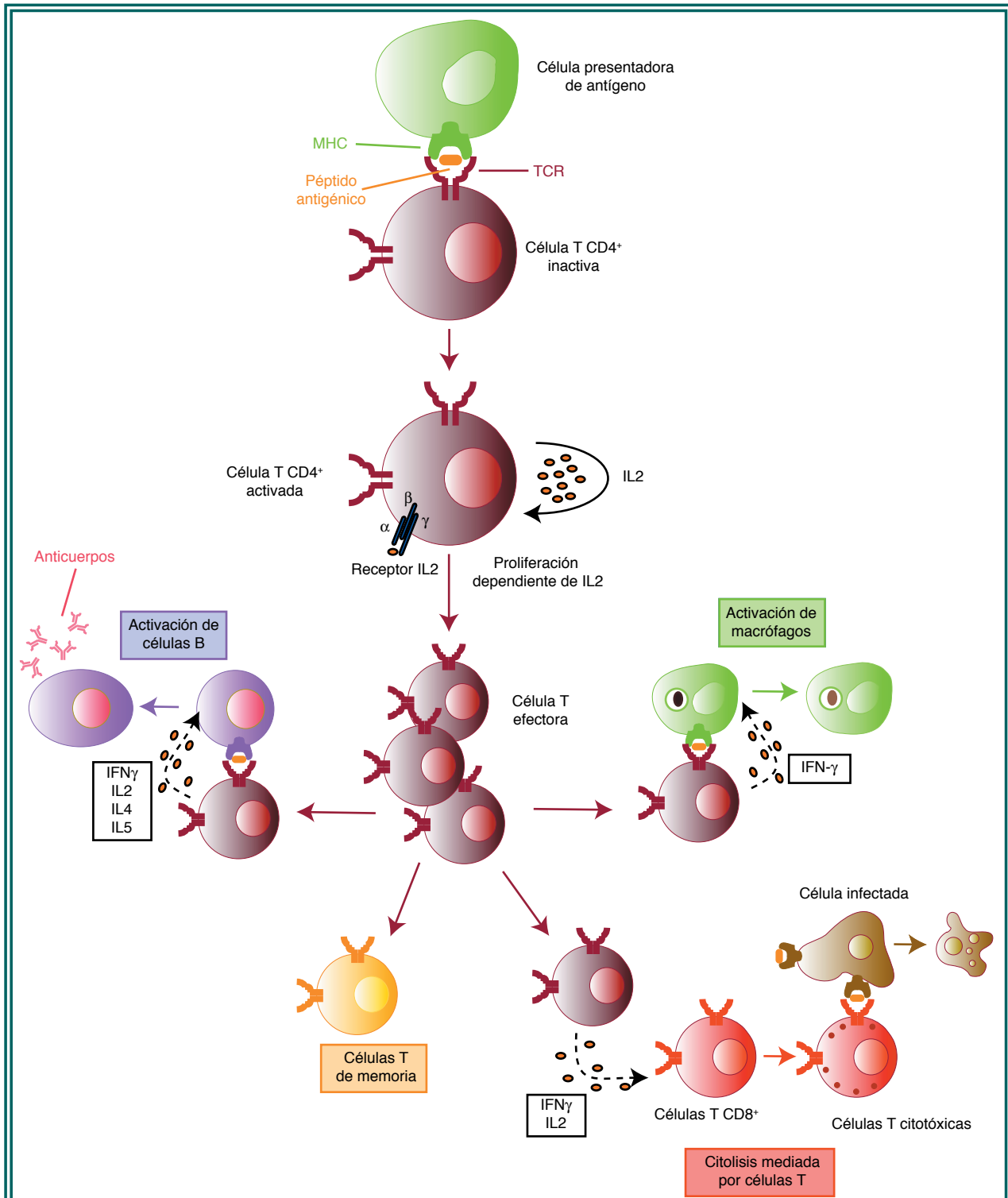


## **RESPUESTA INMUNE DE LA CÉLULA T**

El sistema inmune proporciona al organismo la protección necesaria frente a patógenos infecciosos. La acción colectiva y ordenada de los elementos de este sistema es lo que se denomina respuesta inmune. La defensa que el sistema inmune desarrolla frente a un microbio es iniciada por la respuesta inmune innata y posteriormente continuada por la respuesta inmune adaptativa. Esta última se puede dividir en respuesta humoral y respuesta celular. La respuesta humoral se inicia frente a los microbios extracelulares y sus toxinas. Las células B son las encargadas de este tipo de respuesta mediante la producción de anticuerpos que inducen la fagocitosis de los microbios extracelulares. La respuesta celular la ejecutan las células T frente a microbios intracelulares que por su naturaleza, como en el caso de algunas bacterias y virus, son inaccesibles a los anticuerpos secretados por las células B. Las células T se dividen, según su función, en células T colaboradoras ( $T_h$ ) y en células T citotóxicas ( $T_c$ ). Las células  $T_h$  se encargan de la producción de citoquinas que van a estimular, diferenciar e inducir la proliferación de las propias células T, de las células B y de los macrófagos. La función de las células  $T_c$  es eliminar a las células infectadas por los virus o por los microbios foráneos (Abbas 2000; Abbas and Janeway 2000).

Las proteínas antigénicas, una vez entran en contacto con el organismo, se transportan desde los portales de entrada hasta los órganos linfoides secundarios que son el bazo y los nódulos linfáticos. Las proteínas antigénicas, bien en los portales de entrada, o bien en los órganos linfoides secundarios, son procesadas y presentadas por las células presentadoras de antígeno (APCs) a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Posteriormente, las células T migran desde el timo, órgano linfóide primario encargado de la maduración de la célula T inmadura (timocito) a célula T madura (linfocito T), hasta los órganos linfoides secundarios donde reconocen los antígenos procesados. Aquí se produce la primera estimulación antigénica de la célula T, que provoca la proliferación celular de los clones de células T específicos para el antígeno presentado. Esta proliferación va acompañada de una diferenciación hacia célula T efectora y célula T memoria. Las células T efectoras migran a los tejidos periféricos donde otra estimulación antigénica genera una respuesta inmune localizada que desencadena la eliminación de la fuente de antígeno (Figura 1).

La tolerancia inmunológica de las células T del organismo se mantiene a dos niveles: en el timo, los timocitos capaces de reconocer antígenos propios o autoantígenos mueren por apoptosis, proceso denominado selección negativa. Sin embargo, los timocitos que reconocen antígenos foráneos o inmunoatígenos se diferencian hacia célula T, lo que se denomina selección positiva. Aún así, algunos timocitos autoreactivos son capaces de escapar a la selección negativa y diferenciarse a células T; en un segundo nivel estas células T autoreactivas, en periferia, son anuladas mediante la inducción del estado de anergia de las mismas, siendo así incapaces de responder a ningún estímulo antigénico (Abbas 2000; Abbas and Janeway 2000).



**FIGURA 1. FASES DE ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS T**

La célula T CD4<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>) se activa tras el reconocimiento del péptido antigénico presentado por el MHC, a través del TCR. Como consecuencia de esta activación, se produce la expresión de IL2 y de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL2, que junto con las cadenas  $\beta$  y  $\gamma$  de dicho receptor da lugar al receptor de alta afinidad por IL2. La unión de IL2 a su receptor desencadena la proliferación de la célula T. Una vez que la célula T CD4<sup>+</sup> se diferencia a célula T efectora e induce la activación de macrófagos, de células B, lo que provoca la producción de anticuerpos, y de células T CD8<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>) que dan lugar a la citolisis de las células infectadas. Todos estos procesos se regulan por la expresión de diferentes citoquinas como INF $\gamma$ , IL2, IL4 e IL5, entre otras. Al final de la respuesta se genera una población de células T memoria que, ante una segunda infección por el mismo patógeno genera una respuesta inmune más eficiente.

La respuesta de las células T está controlada por su receptor (TCR) que, a través de su activación, desencadena procesos de proliferación y diferenciación celular, citotoxicidad e inducción de muerte celular programada. (Berridge 1997; Nel 2002; Nel and Slaughter 2002). El TCR está compuesto por las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , que reconocen específicamente el péptido antigénico, y por las cadenas  $CD3\epsilon, \gamma$  y  $\delta$  que junto con las cadenas  $\zeta$  son las encargadas de reclutar las proteínas que desencadenan la respuesta de la célula T. Si bien el TCR aporta especificidad a la respuesta de la célula T, otros receptores como CD2, CD28, CD4 y CD8 son importantes para la transducción de señales y la modulación del umbral de activación, colaborando con ello en la activación de la célula T.

### **TIROSINAS QUINASAS DE LA FAMILIA SRC**

Las proteínas Lck y Fyn son dos tirosinas quinasas miembros de la familia Src, reclutadas al TCR en respuesta a la estimulación de este receptor. Ambas quinasas son esenciales para la correcta activación de la célula T. La proteína Lck es responsable de la respuesta celular necesaria para la diferenciación y la proliferación de las células T en respuesta a antígeno, mientras que la proteína Fyn está implicada en la reorientación del centro organizador de microtúbulos (MTOC) durante la presentación antigénica de dichas células (Martin-Cofreces, Sancho et al. 2006). Si bien se puede señalar cierta especificidad funcional, ambas proteínas actúan de manera conjunta en el desarrollo de la respuesta inmune, pudiendo cada una de ellas compensar, en parte, la ausencia de la otra (Trobridge, Forbush et al. 2001).

Tras la estimulación del TCR, en respuesta a la presentación antigénica, la proteína Lck se recluta al TCR (Straus and Weiss 1992). En este complejo, Lck fosforila los motivos ITAM del complejo CD3, permitiendo el reclutamiento y la activación de ZAP70, una tirosina quinasa de la familia Syk que, mediante la fosforilación de la molécula adaptadora LAT, proporciona sitios de anclaje para otras proteínas como la proteína adaptadora SLP76 y la fosfolipasa C gamma ( $PLC\gamma$ ) (Sekiya, Poulin et al. 2004). Para una completa activación de  $PLC\gamma$  es necesario, no sólo ser reclutada a la membrana donde la proteína ejerce su función sino además la fosforilación de la proteína en el residuo de tirosina 783 por parte de ITK, una tirosina quinasa de la familia Tec (Liu, Bunnell et al. 1998; Wilcox and Berg 2003).

Lck no sólo regula las señales de activación a través del TCR, sino que contribuye también al apagado de las mismas a través de la regulación de diferentes efectores como son las proteínas SHIP y SHP-1 (Lamkin, Walk et al. 1997; Stefanova, Hemmer et al. 2003). La proteína SHIP es una fosfatasa que defosforila la posición 5 del anillo de inositol del fosfatidilinositol trifosfato ( $PI-3,4,5-P_3$ ), que modula la activación de la ruta de AKT en respuesta al TCR (Dong, Corre et al. 2006). La proteína SHP-1 es una tirosina fosfatasa que tiene como sustratos, entre otros, a ZAP70 y a la propia Lck (Plas, Johnson et al. 1996; Chiang and Sefton 2001), lo que da lugar a un mecanismo de retroalimentación negativo que modula la señal derivada del TCR. El equilibrio entre las señales positivas y negativas generadas a partir de la

activación del TCR determinará el desencadenamiento de una adecuada respuesta inmune. La proteína Lck, como regulador de estas señales juega un importante papel en la activación de la célula T.

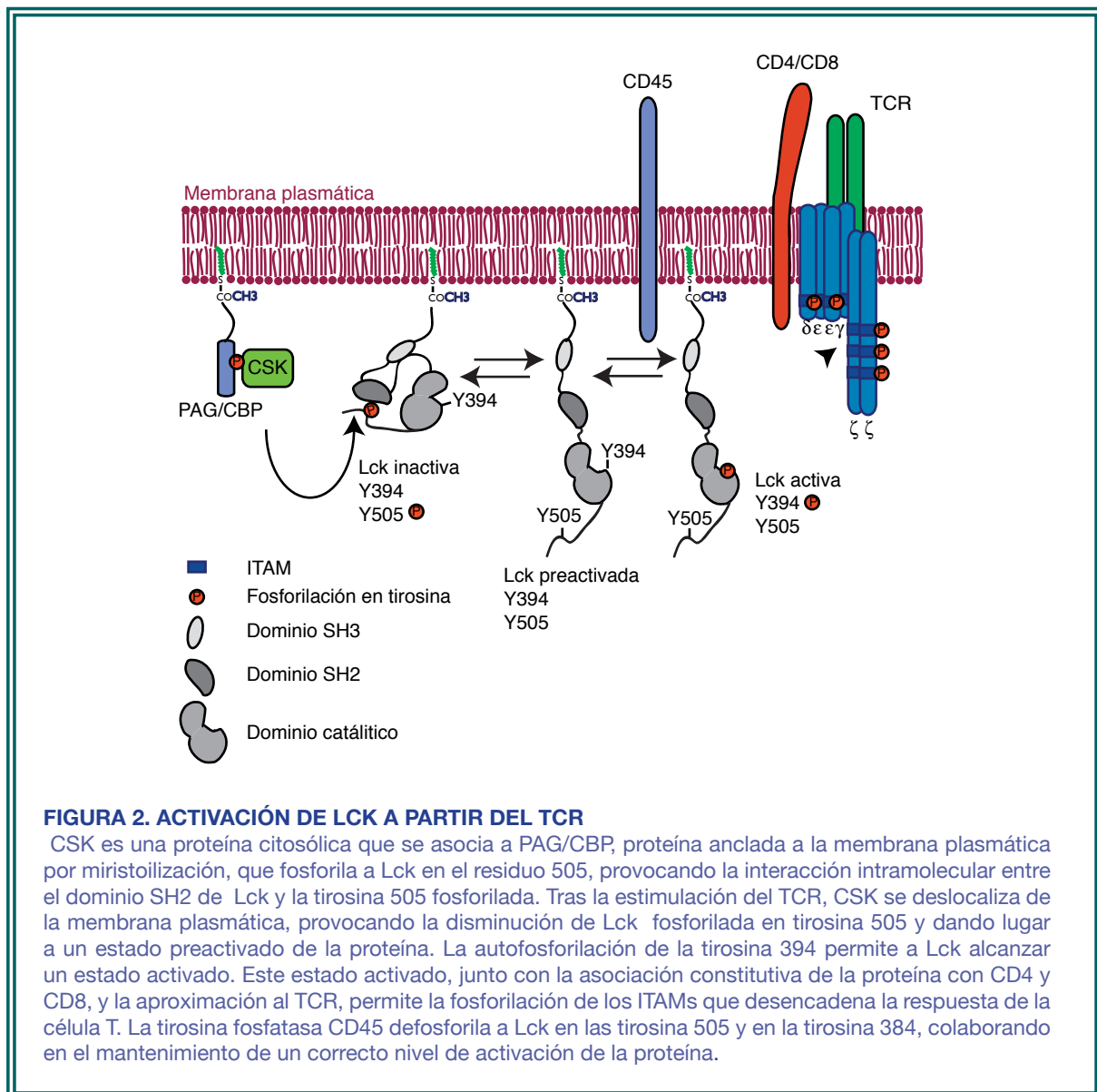
### Regulación de las tirosinas quinasas de la familia Src: Lck y Fyn

La estructura secundaria de Fyn y de Lck es común a la de todos los miembros de la familia Src. Ambas poseen un dominio denominado único que sufre una serie de modificaciones post-traduccionales, como la palmitoilación, la miristoilación y la acetilación en residuos de cisteína, que permiten el anclaje de la proteína a la cara interna de la membrana plasmática (Shenoy-Scaria, Gauen et al. 1993; Koegl, Zlatkine et al. 1994; Timson Gauen, Linder et al. 1996; Kabouridis, Magee et al. 1997; Wolven, Okamura et al. 1997). A continuación, poseen un dominio SH3 de unión a regiones ricas en prolina, y un dominio SH2 de unión a proteínas fosforiladas en tirosina, seguido del dominio catalítico. El dominio único de Lck posee dos cisteínas que le permiten interactuar con CD4 y con CD8, moléculas coreceptoras que forman parte del complejo TCR. Esta interacción es importante para algunas, pero no para todas, las funciones de Lck (Shaw, Chalupny et al. 1990; Turner, Brodsky et al. 1990; Glaichenhaus, Shastri et al. 1991; Chan, Limmer et al. 1993; Hoeveler and Malissen 1993; Killeen and Littman 1993).

La actividad quinasa de Lck se regula por el estado fosforilado de la tirosina 505 que se localiza en el extremo carboxilo de la proteína, y que permite la interacción de este residuo con el dominio SH2 de la misma proteína, impidiendo la accesibilidad del dominio catalítico a su sustrato. La fosforilación de dicho residuo está controlada por Csk, una tirosina quinasa citosólica, y por CD45, una proteína transmembrana con función fosfatasa (Figura 2). La defosforilación del residuo 505 de Lck provoca la apertura de la proteína y permite la interacción de los dominios SH2 y SH3 con otras proteínas, lo que favorece la accesibilidad del centro catalítico de Lck a sus sustratos, provocando la autofosforilación del residuo tirosina 394, que da lugar a la máxima activación de la proteína (Abraham and Veillette 1990; Yamaguchi and Hendrickson 1996). El estado fosforilado del residuo 394 está regulado a su vez por la acción de las proteínas fosfatasas CD45 y SHP-1 (Thomas 1995; Chiang and Sefton 2001). Tras la estimulación del TCR, Lck fosforila a SHP-1 en los residuos tirosina 536 y 566, lo que media la defosforilación, no sólo de Lck, sino además de otras proteínas involucradas en la señalización a través del TCR como ZAP70 (Plas, Johnson et al. 1996; Brockdorff, Williams et al. 1999). Esta regulación negativa modula a otras proteínas responsables de la señalización del TCR como son Vav, Grb2 y SLP-76 (Kon-Kozlowski, Pani et al. 1996; Clements, Yang et al. 1998; Brockdorff, Williams et al. 1999).

Adicionalmente a estas formas de regulación de Lck, se han descrito otras formas que van desde la ubiquitinación y posterior degradación de la proteína (Giannini and Bijlmakers 2004), hasta la fosforilación de la proteína en serina (Schroder, Quehl et al. 2000).

La fosforilación en el residuo serina 59, que afecta a la interacción del dominio SH2 de Lck con otras proteínas (Joung, Kim et al. 1995; Stefanova, Hemmer et al. 2003), depende del diacilglicerol (DAG), de las proteínas quinasas C (PKCs) y de la proteína ERK (Schroder, Quehl et al. 2000).



### PLC $\gamma$

Durante la activación de los linfocitos T tras la estimulación del TCR, la proteína PLC $\gamma$  hidroliza el fosfatidil inositol (4,5) bi-fosfato (PI(4,5)P $_2$ ) en dos importantes mensajeros: diacilglicerol (DAG) e inositol tri-fosfato (IP $_3$ ). IP $_3$  provoca la salida de Ca $^{2+}$  desde el retículo endoplásmico (Berridge, Lipp et al. 2000) al citoplasma, donde induce la apertura de los canales dependientes de Ca $^{2+}$  de la membrana plasmática permitiendo la entrada de Ca $^{2+}$  extracelular (Putney 1997; Berridge, Lipp et al. 2000). El flujo de Ca $^{2+}$  activa la calcineurina,



El resultado final de la activación de PLC $\gamma$  es el desencadenamiento de diferentes rutas de señalización que controlan, a su vez, diferentes factores de transcripción como son NF $\kappa$ B, NFAT y AP-1, este último, dímero formado por la unión de las proteínas c-jun y c-fos (Nel 2002). La unión de estos factores de transcripción a sus promotores permite la expresión de proteínas que regulan diferentes funciones en la respuesta inmune mediada por el TCR, como son la cadena alfa del receptor de la interleuquina 2 (IL2), CD25, y la propia IL2 que regulan la proliferación celular (Rao, Luo et al. 1997; Teague, Hildeman et al. 1999; Feske, Giltzane et al. 2001; Macian, Garcia-Cozar et al. 2002).

Durante la activación de las células T es importante regular el balance entre las rutas desencadenadas por el DAG y el Ca<sup>2+</sup>, puesto que la activación de NFAT en ausencia de activación de AP-1, factor de transcripción cuya activación depende de DAG, da lugar a la regulación diferencial de una serie de genes que provocan en las células un estado de no respuesta llamado anergia (Macian, Garcia-Cozar et al. 2002), y el incorrecto metabolismo del DAG puede dar lugar a fenómenos de hiperproliferación celular e incluso de transformación celular (Preiss, Loomis et al. 1986; Kato, Kawai et al. 1987; Wolfman, Wingrove et al. 1987; Housey, Johnson et al. 1988; Kato, Kawai et al. 1988; Chang, Noh et al. 1997).

### PKCs

---

Las PKCs se encuentran dentro del grupo de las proteínas activadas en respuesta a la estimulación del TCR. Estas proteínas forman una familia de serina/treonina quinasas cuya actividad enzimática regula un gran número de funciones biológicas como son la proliferación, la transcripción y la respuesta inmune (Newton 1995; Kazanietz 2000; Spitaler and Cantrell 2004). Atendiendo a su regulación funcional se pueden clasificar en diferentes grupos: PKCs clásicas ( $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\gamma$ ) que se regulan por DAG, Ca<sup>2+</sup> y por fosfolípidos; PKCs nuevas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\theta$ ) que se regulan por DAG y por fosfolípidos, y PKCs atípicas ( $\zeta$  y  $\iota$ ) que se regulan, principalmente, por señales que inducen la exposición de secuencias de localización nuclear y secuencias de exportación nuclear que se encuentran localizadas en su dominio de regulación (Spitaler and Cantrell 2004). Entre todas las PKCs, la proteína PKC $\theta$  es el único miembro de la familia reclutado a la sinapsis inmunológica por un mecanismo que depende de los niveles de DAG, de la fosforilación en tirosina de la proteína y de la proteína adaptadora CARMA 1 (Monks, Kupfer et al. 1997; Diaz-Flores, Siliceo et al. 2003; Wang, Matsumoto et al. 2004). Una vez reclutada a la sinapsis inmunológica, PKC $\theta$  activa a la quinasa JNK e inicia la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , y como consecuencia se activa el factor de transcripción NF $\kappa$ B (Isakov and Altman 2002). A su vez, la quinasa JNK fosforila a la proteína c-jun que junto con c-fos forman el factor de transcripción AP-1. La PKC $\theta$ , mediante la activación tanto de AP-1 como de NF $\kappa$ B, contribuye a la expresión, entre otros, del gen de la IL2.

El papel de PKC $\theta$  es esencial para la activación de las células T (Monks, Kupfer et al. 1997; Bi, Tanaka et al. 2001; Villalba, Bi et al. 2002). Es interesante destacar que tanto para la

activación de JNK como para la activación de NF $\kappa$ B es indispensable la señal de coestimulación procedente del CD28 (Coudronniere, Villalba et al. 2000). El modelo de ratón KO para PKC $\theta$  muestra que esta proteína es esencial para la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B en la célula T madura, pero no en el timocito (Sun, Arendt et al. 2000). Además, las células T de estos ratones PKC $\theta$  (-/-) presentan defectos en la activación del factor de transcripción AP-1 que no dependen de la activación de ERK, p38 o JNK lo que sugiere que PKC $\theta$  regula la activación de AP-1 independientemente de la activación de MAPK quinasas.

Otro efector del DAG relacionado con las PKCs es la familia de las PKDs (PKC $\eta$ ). Las PKDs son una familia de serina/treonina quinasas que posee una gran variedad de funciones biológicas que van desde la regulación del aparato de Golgi hasta la activación de NF $\kappa$ B (Matthews and Cantrell 2006). Concretamente, la PKD-1 es capaz de movilizarse en respuesta a la presentación antigénica de las células T desde el citosol a la sinapsis inmunológica por un mecanismo que depende de la producción de DAG (Spitaler, Emslie et al. 2006). La localización subcelular de PKD-1 es importante dado que desarrolla diferentes funciones dependiendo de si se encuentra en el citosol o en la membrana plasmática. En la membrana, PKD-1 aumenta la actividad y la localización de Rap1 (Medeiros, Dickey et al. 2005) que, a su vez, regula la actividad de integrinas fundamental para formar un complejo estable entre la célula T y la célula presentadora de antígeno. En el citosol, PKD-1 es capaz de fosforilar e inhibir a la actividad represora de la histona deacetilasa 7 (HDAC7) sobre el factor de transcripción MEF2 (Dequiedt, Van Lint et al. 2005). De esta forma, la localización de la PKD por el DAG puede determinar la función de la proteína.

### RasGRP

Las proteínas de la familia Ras participan en procesos de diferenciación y proliferación de las células T (Ehrhardt, Ehrhardt et al. 2002). Se calcula que entre el 40% y el 50% de la proteína Ras se activa durante la respuesta celular desencadenada por el TCR (Genot and Cantrell 2000). Las proteínas de esta familia se caracterizan por poseer actividad fosfatasa sobre nucleótidos de guanosina con los que se asocian. El estado de activación de Ras viene determinado por su unión a GDP (forma inactiva) o a GTP (forma activa); el rápido intercambio entre ambos nucleótidos está regulado por la acción de proteínas intercambiadoras de nucleótidos (GEFs) y por proteínas activadoras de la actividad fosfatasa de nucleótidos de guanosina (GAP), las cuales provocan el paso de la forma activa a la forma inactiva de Ras (Genot and Cantrell 2000; Ehrhardt, Ehrhardt et al. 2002). La unión a GTP o a GDP regula la interacción de los miembros de la familia Ras con otras proteínas y con ello, la activación de rutas como la vía Raf1/ERK1-2 (Dower, Stang et al. 2000) y la vía JNK/c-jun (Nimnual, Yatsula et al. 1998). La presencia de Ras en diferentes membranas y compartimentos subcelulares está determinada por modificaciones postraduccionales como son la farnesilación y la palmitilación de la proteína (Hancock 2003).



En linfocitos T, existen dos rutas de activación de Ras. Por un lado, Ras puede ser activado por Sos (Bowtell, Fu et al. 1992; Buday, Egan et al. 1994), una proteína GEF para Ras que se recluta al TCR en respuesta a la estimulación del mismo por su interacción con Grb2, una proteína adaptadora que se asocia con tirosinas fosforiladas en la proteína LAT (Buday, Egan et al. 1994; Sieh, Batzer et al. 1994). Por otro lado, el DAG generado por PLC $\gamma$  en respuesta al TCR activa a la proteína Ras tras reclutar la proteína RasGRP1 que es otra proteína GEF para Ras que posee un dominio C1 en su estructura (Dower, Stang et al. 2000; Ebinu, Stang et al. 2000; Carrasco and Merida 2004).

La activación diferencial de Ras por las rutas Grb2/Sos o RasGRP1 tiene importancia a nivel de la selección clonal de los timocitos. La activación de Ras a través de Grb2/Sos conduce a la activación de la vía JNK y p38 (Gong, Cheng et al. 2001), señales importantes ambas en la selección negativa de los timocitos cuya disfunción da lugar a procesos autoinmunes (Dong, Yang et al. 1998; Rincon, Whitmarsh et al. 1998; Sugawara, Moriguchi et al. 1998). Por el contrario la activación de Ras a través de RasGRP1 está relacionada con la activación de ERK que conduce a la selección positiva de timocitos (Dower, Stang et al. 2000; Priatel, Teh et al. 2002).

La familia de proteínas RasGRP está formada por cuatro miembros, RasGRP1 (Ca/DAG-GEFII) (Ebinu, Bottorff et al. 1998; Kawasaki, Springett et al. 1998), RasGRP2 (Ca/DAG-GEFI) (Kawasaki, Springett et al. 1998), RasGRP3 (Ca/DAG-GEFIII) (Yamashita, Mochizuki et al. 2000) y RasGRP4 (Li, Yang et al. 2002). Todos se caracterizan por poseer actividad GEF para la proteína Ras y un dominio C1 que les permite unirse al DAG generado. Tienen un patrón de expresión restringido a células del sistema inmune y neuronas a excepción de RasGRP3 (Rebhun, Castro et al. 2000) cuya expresión es más ubicua. Dentro del sistema inmune, RasGRP1 es muy abundante en timocitos y células T (Ebinu, Stang et al. 2000), RasGRP2 en plaquetas (Crittenden, Bergmeier et al. 2004) y RasGRP4 en mastocitos (Li, Yang et al. 2002). Cada uno de los miembros de la familia de RasGRP actúa a su vez sobre diferentes miembros de Ras. Los efectores descritos hasta ahora son para RasGRP1: H-Ras, K-Ras, N-Ras, M-Ras, R-Ras y TC21; para RasGRP2: Rap1, R-Ras, N-Ras y TC21; para RasGRP3: H-Ras, Rap-1, M-Ras, R-Ras y TC21; y para RasGRP4: H-ras (Kawasaki, Springett et al. 1998; Tognon, Kirk et al. 1998; Clyde-Smith, Silins et al. 2000; Ohba, Mochizuki et al. 2000; Rebhun, Castro et al. 2000; Li, Yang et al. 2002).

Los estudios llevados a cabo en ratones KO para RasGRP1 muestran que, aunque su timo tiene un número normal de timocitos inmaduros, estos poseen una marcada deficiencia en células simples positivas. En estos ratones, la ausencia de RasGRP1 provoca la carencia de respuesta a análogos de DAG o a la activación del TCR, lo que demuestra que la activación de ERK en timocitos depende en gran medida de la señal de RasGRP1 (Dower, Stang et al. 2000). También está descrito que defectos en la traducción de RasGRP1 pueden generar procesos autoinmunes (Layer, Lin et al. 2003). En estos ratones, la ausencia de la proteína

coincide con la acumulación de células T CD4<sup>+</sup> autoreactivas capaces de activar las células B causantes de la autoinmunidad (Layer, Lin et al. 2003). Además presentan un defecto en la degranulación de sus mastocitos a través de la activación del receptor FcεRI, debido a una menor activación de la ruta PI3K a partir de este receptor (Liu, Zhu et al. 2006).

La proteína RasGRP2 es esencial para la adhesión de plaquetas (Crittenden, Bergmeier et al. 2004). La deficiencia de la proteína en un modelo KO para la misma presenta problemas de coagulación, dada la baja agregación de las plaquetas (Crittenden, Bergmeier et al. 2004).

El estudio de ratones KO para RasGRP3 revela una deficiencia en la activación de las células B a través de su receptor (BCR) (Coughlin, Stang et al. 2005). Además, los ratones doble KO para RasGRP1/3 pierden el fenotipo de autoinmunidad propio de los ratones KO para RasGRP1 dado que las células B autoreactivas no se activan en el doble KO (Coughlin, Stang et al. 2005).

### **FAMILIA DE LAS DGKs**

---

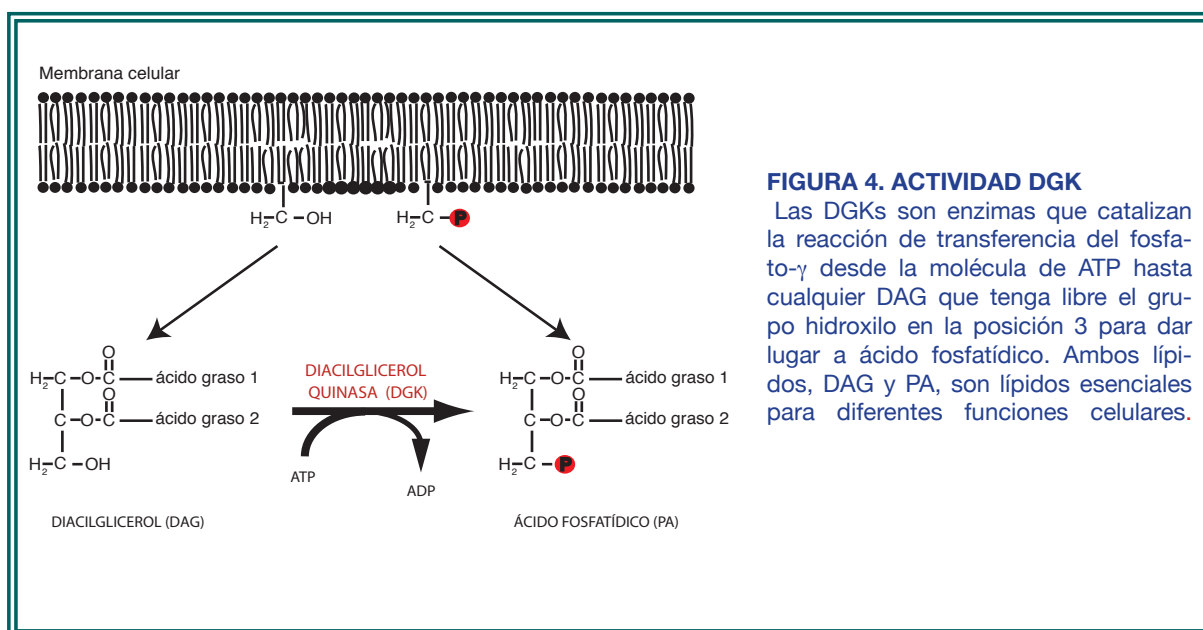
Las DGKs constituyen una familia de enzimas que llevan a cabo la reacción de transferencia de un grupo fosfato desde la molécula de ATP hasta la molécula de diacilglicerol (DAG) para dar lugar a ácido fosfatídico (PA) (Kano, Yamada et al. 1990) (Figura 4). El DAG es un segundo mensajero lipídico cuya importancia ha sido descrita en procesos de proliferación y diferenciación celular a través de la activación de PKCs (Asaoka, Nakamura et al. 1992; Ron and Kazanietz 1999), en la activación de  $\alpha$  y  $\beta$  quimerinas (Ron and Kazanietz 1999; Siliceo, Garcia-Bernal et al. 2006), en la activación de RasGRP (Ebinu, Bottorff et al. 1998; Kawasaki, Springett et al. 1998; Tognon, Kirk et al. 1998) y en la regulación de los canales catiónicos TRPC-6 y TRPC-3 (Hofmann, Obukhov et al. 1999). Por otro lado, el PA es también un importante mensajero lipídico descrito como regulador de la quinasa Raf1 (Ghosh, Strum et al. 1996; Ghosh, Moore et al. 2003), de PKC  $\zeta$  (Limatola, Schaap et al. 1994), de la quinasa en la posición 5 del fosfatidilinositol 4 fosfato (PI4P5K) (Moritz, De Graan et al. 1992; Honda, Nogami et al. 1999) y de proteínas tirosina fosfatasas (Zhao, Shen et al. 1993; Frank, Keilhack et al. 1999). Las DGKs, por tanto, además de contribuir al ciclo de los fosfoinosítidos regenerando intermediarios del mismo, tienen un papel modulador, regulando el balance entre el DAG y el PA.

### **Evolución de las DGKs**

---

Las DGKs constituyen una familia de proteínas muy conservada a lo largo de la evolución. Están presentes en organismos pluricelulares que incluyen *Drosophila melanogaster* (Masai, Hosoya et al. 1992; Harden, Yap et al. 1993; Masai, Okazaki et al. 1993), *C. elegans*, plantas y mamíferos (Katagiri, Mizoguchi et al. 1996). En bacterias también se ha descrito la actividad DGK (Lightner, Bell et al. 1983), aunque la proteína transmembrana que lleva a

cabo esta función no guarda homología con las anteriores y, además de DAG, es capaz de fosforilar a otros lípidos neutros como las ceramidas (Preiss, Loomis et al. 1986). En levaduras, sin embargo, no se ha detectado actividad DGK ni se ha encontrado expresión de ninguna DGK, poniendo de manifiesto que las funciones que llevan a cabo estas proteínas están relacionadas con organismos eucariotas superiores (Jiang, Sakane et al. 2000; Abe, Lu et al. 2003).

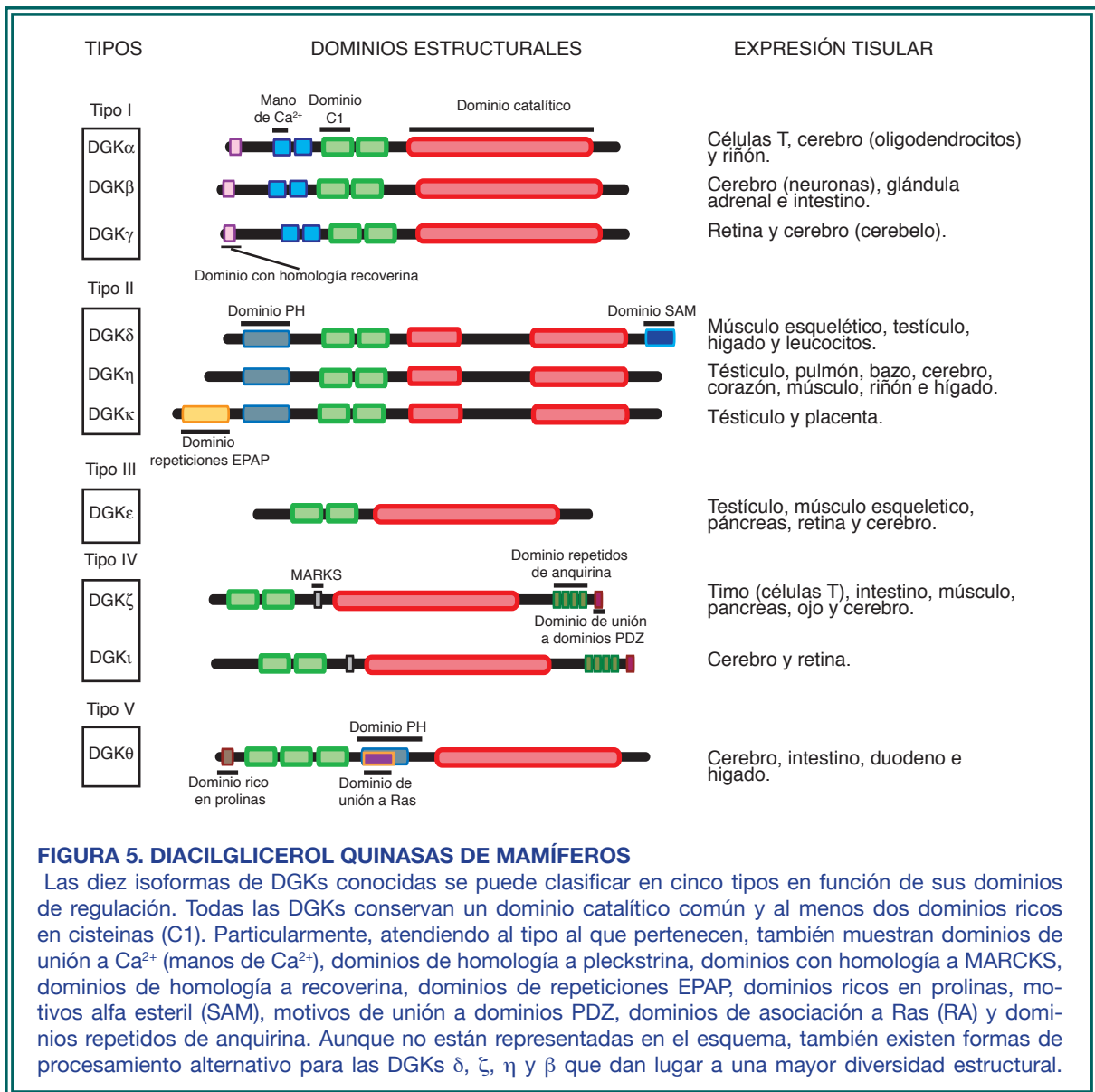


### Estructura de las DGKs

Todas las DGKs de mamíferos poseen un dominio catalítico común de 325 aminoácidos (Figura 5). No existe especificidad de sustrato por parte de las DGKs, a excepción de la DGK $\epsilon$  que necesita ácidos grasos poliinsaturados en la posición 1 y 2 de la molécula de DAG, más concretamente ácido araquidónico (Tang, Bunting et al. 1996). El resto de DGKs son capaces de fosforilar cualquier DAG siempre que los ácidos grasos estén ocupando las posiciones 1 y 2 de la molécula de glicerol (Houssa, Schaap et al. 1997; van Blitterswijk and Houssa 1999). Por lo tanto, la acción de las DGKs sobre los diferentes tipos de DAG no viene determinada por su especificidad de sustrato, sino por su accesibilidad al mismo, marcada ésta por diferentes tipos y/o dominios de regulación.

Dentro del dominio catalítico se alternan aminoácidos conservados y no conservados, destacando la secuencia altamente conservada GGXGXXG. Esta secuencia se encuentra conservada en la familia de las esfingosinas quinastas, donde se ha demostrado que la conservación de la segunda y tercera glicina es esencial para la unión del ATP y para la actividad catalítica de la enzima (Pitson, Moretti et al. 2002). La sustitución, en la secuencia de DGKs, de la segunda glicina por alanina o por aspártico da lugar a un mutante de DGK que pierde la actividad catalítica (Topham, Bunting et al. 1998; Sanjuan, Jones et al. 2001)

sugiriendo que en DGKs la función de este dominio es análoga a la esfingosina quinasa. Los inhibidores farmacológicos R59022 y R59949 son, hasta ahora, las dos únicas moléculas capaces de inhibir la actividad DGK (de Chaffoy de Courcelles, Roevens et al. 1985; de Chaffoy de Courcelles, Roevens et al. 1989) siendo R59949 el más potente de los dos (Jiang, Sakane et al. 2000). Este inhibidor actúa de forma sinérgica y no competitiva con el ATP sobre el centro catalítico de la molécula (Jiang, Sakane et al. 2000).



**FIGURA 5. DIACILGLICEROL QUINASAS DE MAMÍFEROS**

Las diez isoformas de DGKs conocidas se puede clasificar en cinco tipos en función de sus dominios de regulación. Todas las DGKs conservan un dominio catalítico común y al menos dos dominios ricos en cisteínas (C1). Particularmente, atendiendo al tipo al que pertenecen, también muestran dominios de unión a Ca<sup>2+</sup> (manos de Ca<sup>2+</sup>), dominios de homología a pleckstrina, dominios con homología a MARCKS, dominios de homología a recoverina, dominios de repeticiones EPAP, dominios ricos en prolina, motivos alfa esteril (SAM), motivos de unión a dominios PDZ, dominios de asociación a Ras (RA) y dominios repetidos de anquirina. Aunque no están representadas en el esquema, también existen formas de procesamiento alternativo para las DGKs  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$  y  $\beta$  que dan lugar a una mayor diversidad estructural.

Además del dominio catalítico, todas las DGKs presentan al menos dos dominios C1, denominados C1A y C1B según el orden que ocupan dentro de la secuencia de aminoácidos. En el caso de las DGK, los dominios C1 son funcionalmente atípicos, y excepto el dominio C1A de DGK $\beta$  y de DGK $\gamma$  (Shindo, Irie et al. 2003), el resto de dominios C1 de las DGKs no son capaces de unir DAG. El dominio C1B presenta una extensión de 15 aminoácidos que

ha servido para postular que su función es la de presentar el DAG al dominio catalítico (van Blitterswijk and Houssa 1999), si bien otros trabajos demuestran que estos dominios son dispensables para la actividad catalítica de las DGKs (Abe, Lu et al. 2003). Por otro lado, se postula que los dominios C1 pueden ser dominios de unión a otras proteínas por su analogía con la quinasa Raf que es capaz de unir Ras a través de su dominio C1 (Clark, Drugan et al. 1997; Winkler, Cutler et al. 1998; Williams, Drugan et al. 2000).

### Clasificación de las DGKs

En mamíferos la familia de las DGKs está compuesta por diez isoformas que se clasifican en cinco subgrupos o tipos, atendiendo a sus dominios de regulación y a su expresión tisular/celular (Sakane and Kanoh 1997; Topham and Prescott 1999; van Blitterswijk and Houssa 2000; Imai, Kai et al. 2005) (Figura 5).

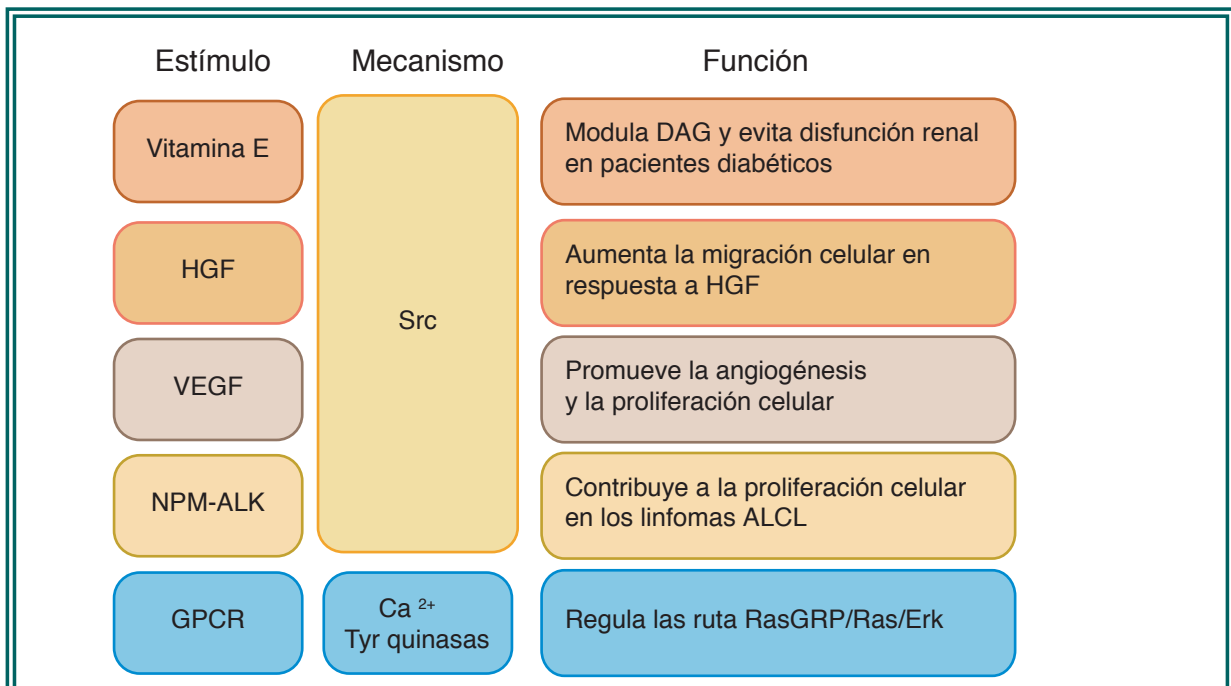
### DGKs tipo I (DGK $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )

Todas las DGKs que forman parte de esta subfamilia se caracterizan por tener dos dominios de unión a Ca<sup>2+</sup> tipo manos de Ca<sup>2+</sup> de 70 aminoácidos cada uno. Cada uno de estos dominios es capaz de unir una molécula de Ca<sup>2+</sup>, siendo la afinidad dependiente de la isoforma: en el caso de la DGK $\alpha$ , la constante de disociación ( $K_d$ ) de las manos de Ca<sup>2+</sup> es un orden de magnitud superior respecto a DGK $\beta$  y a DGK $\gamma$  (Yamada, Sakane et al. 2003). La unión del Ca<sup>2+</sup> a los dominios tipo manos de Ca<sup>2+</sup> provoca un cambio conformacional que se postula permite la apertura de la molécula de DGK dando lugar a su activación (Yamada, Sakane et al. 1997; Jiang, Qian et al. 2000). En el caso de DGK $\alpha$ , el Ca<sup>2+</sup> y la fosfatidilserina (PS), un lípido abundante en las membranas celulares, aumentan la actividad catalítica de la proteína (Sakane, Yamada et al. 1991). Sin embargo, el Ca<sup>2+</sup> y la PS actúan de manera independiente en la activación de DGK $\alpha$  (Abe, Lu et al. 2003), puesto que mutaciones en el dominio catalítico de la proteína como son D497N y D697N afectan a la activación por Ca<sup>2+</sup> pero no a la activación por PS. Además, estas mutaciones sugieren una interacción entre el dominio de regulación de la proteína que contiene las manos de Ca<sup>2+</sup> y el dominio catalítico.

Además de las manos de Ca<sup>2+</sup>, todas las DGKs de tipo I presentan un dominio de homología a recoverina (Jiang, Qian et al. 2000). Este dominio, aunque no une Ca<sup>2+</sup>, ayuda a las manos de Ca<sup>2+</sup> a acoplar el ión y con ello favorece la pérdida de la autoinhibición que las manos de Ca<sup>2+</sup> ejercen sobre la proteína (Wang, Matsumoto et al. 2004). La importancia de las manos de Ca<sup>2+</sup> también se demuestra a partir del estudio de localización de un mutante de DGK $\alpha$  acoplado a GFP que carece de estos dominios (Sanjuan, Jones et al. 2001), lo que permite demostrar que, en ausencia de las manos de Ca<sup>2+</sup>, DGK $\alpha$  permanece constitutivamente asociada a la membrana plasmática. El uso de este mutante de DGK $\alpha$  demuestra que cuando la proteína esta asociada a la membrana es capaz de regular la activación de ERK (Sanjuan, Jones et al. 2001).

La composición lipídica de la membrana también modula la actividad DGK $\alpha$ . Además de la PS, la fosfatidiletanolamina (PE) y el colesterol son capaces de aumentar la actividad DGK $\alpha$  induciendo un cambio conformacional de manera similar a como lo hace el Ca<sup>2+</sup> (Fanani, Topham et al. 2004). Los lípidos fosforilados en la posición 3 del anillo de inositol, PI345P<sub>3</sub> y PI34P<sub>2</sub>, también son capaces de unir y activar a DGK $\alpha$  (Cipres, Carrasco et al. 2003). Sin embargo, la esfingomielina, otro lípido de membrana, inhibe la actividad DGK $\alpha$  (Fanani, Topham et al. 2004). De esta manera, la composición lipídica de la membrana puede determinar, junto con el Ca<sup>2+</sup>, la activación de DGK $\alpha$ .

La movilización de DGK $\alpha$  desde el citosol a la membrana no responde a análogos de DAG, sino que es la acción conjunta del Ca<sup>2+</sup> y de las tirosinas quinasas la encargada de la movilización de la proteína desde el citosol a la membrana plasmática (Sanjuan, Jones et al. 2001). El papel de la actividad tirosina quinasa en la activación de DGK $\alpha$  se pone de manifiesto en la activación de la proteína por los receptores de siete dominios transmembrana (GPCR) (Sanjuan, Jones et al. 2001), del factor de crecimiento hepático (HGF) (Cutrupi, Baldanzi et al. 2000) y del receptor del factor de crecimiento endotelial (VEGF) (Baldanzi, Mitola et al. 2004), si bien nunca ha sido descrita la fosforilación directa de la enzima DGK $\alpha$  en respuesta, ni a éstos, ni a ningún otro tipo de estímulo o receptor (Figura 6).



**FIGURA 6 . LA PROTEÍNA DGK $\alpha$  SE ACTIVA EN RESPUESTA A DIFERENTES RECEPTORES**

La proteína DGK $\alpha$  es una enzima capaz de activarse por diferentes receptores, aunque el mecanismo general de activación depende de tirosinas quinasas, especialmente de la familia Src. En respuesta a estos receptores la función puede variar significativamente siendo una veces negativa, como es el caso de la regulación de ERK, y otras positiva como es la proliferación celular y la migración.

A pesar de su similitud estructural, las DGKs de tipo I han sido asociadas a diferentes funciones. La DGK $\beta$  posee dos formas de expresión alternativas, una de estas formas tiene una truncación de los últimos 35 aminoácidos del extremo carboxilo terminal que impide la movilización de la proteína desde el citosol a la membrana plasmática en respuesta a TPA, un análogo del DAG (Caricasole, Bettini et al. 2002). Aunque aún no se conoce bien la función de DGK $\beta$ , la sobreexpresión de la forma de DGK $\beta$  truncada en el extremo carboxilo terminal está asociada con algunos casos de trastorno bipolar (Caricasole, Bettini et al. 2002), lo que junto con su expresión en cerebro (Goto and Kondo 1999) sugiere que DGK $\beta$  participa en la regulación de PKC en ciertas áreas del cerebro que controlan aspectos emocionales y cognitivos (Caricasole, Bettini et al. 2002).

La proteína DGK $\gamma$  funciona como un supresor de Rac1, uniéndose a él e impidiendo con su actividad catalítica la formación del lamelipodio (Tsushima, Kai et al. 2004). También ha sido descrita su expresión como una forma de regulación negativa durante la diferenciación de macrófagos (Yamada, Sakane et al. 2003). Respecto a su mecanismo de activación, DGK $\gamma$  se asocia y se fosforila por PKC $\gamma$  de una manera dependiente del Ca<sup>2+</sup> y de la PS, de forma que la actividad PKC aumenta la actividad catalítica de DGK $\gamma$ . Este aumento, a su vez, provoca la relocalización de PKC $\gamma$  desde la membrana plasmática, de nuevo, hasta el citosol (Yamaguchi, Shirai et al. 2006). Así, DGK $\gamma$  se considera como un regulador negativo de la actividad de PKC $\gamma$ .

### DGK tipo II ( $\delta$ , $\eta$ y $\kappa$ )

Todas las isoformas que pertenecen a esta subfamilia se caracterizan por tener un dominio catalítico dividido en dos partes que se encuentran separadas por una secuencia de 300 aminoácidos. Además, poseen un dominio de homología a plextrina (dominio PH), que se ha descrito como un dominio de unión tanto a lípidos, como son el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PI4,5P<sub>2</sub>) y los inositoles fosfato, como a proteínas, como son las PKCs o las subunidades  $\beta\gamma$  de las proteínas G heterotriméricas (Shaw 1996). Al menos el dominio PH de DGK $\delta$  es capaz de unirse a fosfolípidos (Takeuchi, Kanematsu et al. 1997). Particularmente, DGK $\delta$  posee también un dominio SAM que ha sido descrito, en otras proteínas, como un dominio de oligo y heterodimerización (Smalla, Schmieder et al. 1999) que, al menos en DGK $\delta$ , es necesario para la unión de la proteína a otras proteínas de membrana del retículo endoplásmico (van Blitterswijk and Houssa 2000). En un modelo de ratón KO para la proteína DGK $\delta$  se muestra que la función de esta proteína es importante en queratinocitos y en pulmón. La fosforilación en treonina del receptor de crecimiento epidérmico por parte de una PKC esta aumentada en estos ratones, de manera que se produce una mayor degradación del receptor y por tanto una menor señalización a través del mismo (Crotty, Cai et al. 2006) lo que provoca que los ratones mueran tempranamente después del nacimiento.

### **DGK tipo III ( $\epsilon$ )**

---

Esta subfamilia posee un solo tipo de DGK, DGK $\epsilon$ . Esta isoforma no posee dominios reguladores y se caracteriza por ser la única DGK con especificidad de sustrato. En concreto, DGK $\epsilon$  necesita ácido araquidónico en la molécula de DAG. Dado que los lípidos enriquecidos en ácido araquidónico son muy abundantes en el ciclo de los fosfoinosítidos se postula que la DGK $\epsilon$  está muy involucrada en la síntesis de intermediarios del mismo (Walsh, Suen et al. 1995). La ausencia de DGK $\epsilon$  en un modelo de ratón KO para la proteína muestra que estos ratones poseen una mayor resistencia al shock electroconvulsivo, con ataques más cortos y una recuperación más rápida tras la inducción del mismo (Rodríguez de Turco, Tang et al. 2001). Estos ratones presentan una disminución de la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y de la tirosina 3-monooxigenasa (TH) (Lukiw, Cui et al. 2005) las cuales catalizan las primeras reacciones en la síntesis de catecolaminas, relacionadas éstas con la inducción de procesos epilépticos.

### **DGK tipo IV ( $\zeta$ y $\iota$ )**

---

Las DGKs de tipo IV se caracterizan por tener un dominio MARKS que regula la localización de la proteína a través de un residuo de serina susceptible de fosforilación (Bunting, Tang et al. 1996; Goto and Kondo 1996; Ding, McIntyre et al. 1998). La fosforilación de la serina a través de una PKC provoca un cambio conformacional en DGK que oculta una señal de localización nuclear (NLS) haciendo que la proteína permanezca en el citosol. Por el contrario, la ausencia de fosforilación genera una proteína nuclear. La proteína PKC $\alpha$  es capaz de asociarse y fosforilar a DGK $\zeta$  fuera y dentro del dominio MARKS (Luo, Prescott et al. 2003; Luo, Prescott et al. 2003). La activación de PKC $\alpha$ , y la consiguiente fosforilación del dominio MARKS de DGK $\zeta$ , impide la asociación entre ambas proteínas. Esto a su vez impide el efecto regulador negativo que DGK $\zeta$  ejerce sobre la actividad PKC $\alpha$  (Luo, Prescott et al. 2003), y provoca un efecto inhibitorio de la función de DGK $\zeta$  como regulador de los niveles de DAG durante la proliferación celular (Luo, Prescott et al. 2003).

Las DGKs de tipo IV presentan en su extremo carboxilo una serie de al menos cuatro dominios repetidos de anquirina, y un dominio de unión a proteínas con dominios PDZ. En el caso de DGK $\zeta$ , ambos dominios suponen una restricción para su migración desde el citosol hasta la membrana en respuesta al TCR, haciendo más compleja la activación de DGK $\zeta$  por este receptor (Santos, Carrasco et al. 2002).

La ausencia de DGK-2, un homólogo de DGK $\zeta$  y DGK $\iota$ , causa en *Drosophila* la degeneración retinal de tipo A (*rdgA*). Estos individuos *rdgA* tienen células fotorreceptoras que se diferencian normalmente pero que degeneran rápidamente tras la eclosión. La ausencia de DGK-2 conduce a la degeneración del rabdomero debido a defectos en el recambio de fosfolípidos (Masai, Okazaki et al. 1993).



Se han descritos ratones KO tanto para DGK $\zeta$  como para DGK $\iota$ . En el caso de DGK $\iota$  el fenotipo de estos ratones revela que la proteína regula a RasGRP3, un GEF para Ras y Rap1 (Regier, Higbee et al. 2005). La activación de Rap1 antagoniza con la activación de Ras provocando la atenuación de las rutas controladas por Ras (Kitayama, Sugimoto et al. 1989). En los ratones KO para DGK $\iota$  el aumento de la actividad RasGRP3 aumenta la activación de Rap1 y con ello una disminución de las rutas controladas por Ras (Regier, Higbee et al. 2005). El cruce de los ratones KO para DGK $\iota$  con ratones transgénicos que expresan el protooncogen v-Ha-Ras disminuye la frecuencia de tumores en estos ratones. El fenotipo de los ratones KO para DGK $\zeta$  ha sido muy estudiado en sistema inmune, donde la ausencia de la proteína provoca una mayor respuesta de la células T.

### **DGK tipo V ( $\theta$ )**

---

La DGK $\theta$  es el único representante de esta subfamilia. Esta isoforma de DGK está formada por tres dominios C1 que de forma coordinada participan en la localización de la proteína en la membrana plasmática (van Baal, de Widt et al. 2005). Presenta además un dominio PH en el cual se superpone un dominio de unión a Ras. Aunque no se ha podido determinar la unión entre DGK $\theta$  y Ras, si se ha descrito la unión entre DGK $\theta$  y RhoA (Houssa, de Widt et al. 1999), ejerciendo esta interacción un efecto inhibitorio sobre la actividad quinasa de la enzima. Dado el papel de Rho A en la reorganización del citoesqueleto, se postula que DGK $\theta$  podría tener un papel en dicho proceso. Por último, la DGK $\theta$  posee, en su extremo amino, un dominio rico en prolinas típico en la unión de dominios SH3 cuya función se desconoce (Houssa, Schaap et al. 1997).

Los receptores de braquidina y trombina, que son receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCR), son capaces de movilizar DGK $\theta$  desde el citosol a la membrana plasmática por un mecanismo dependiente de la actividad PKC (van Baal, de Widt et al. 2005). Respecto a la función de DGK $\theta$ , aunque no existe un modelo de ratón KO para estudiarla, se ha descrito que la ausencia de su homólogo en *C. Elegans*, la proteína DGK-1, afecta a la transmisión sináptica. La serotonina inhibe la transmisión sináptica activando la liberación de acetilcolina. Esta función esta mediada por la proteína GOA-1, una subunidad G $\alpha_0$ , y por DGK-1. La activación de GOA-1 provoca la disminución de DAG, el cual es importante para la localización de la proteína UNC-13, lo que sugiere que DGK-1 afecta la transmisión sináptica disminuyendo la abundancia de UNC-13 en los sitios de liberación de acetilcolina, que es la encargada final de la atenuación de transmisión sináptica.

### **DGKs Y EL SISTEMA INMUNE**

---

Las células T expresan dos familias diferentes de DGKs, DGK $\alpha$  (Tipo I) y DGK $\zeta$  (Tipo IV). La función de ambas en respuesta a la estimulación del TCR está muy relacionada, en ambos casos se ha descrito su papel como atenuador de la ruta RasGRP/Ras/ERK/AP1 (Sanjuan, Jones et al. 2001; Topham and Prescott 2001; Jones, Sanjuan et al. 2002; Zhong,

Hainey et al. 2002).

### DGK $\alpha$

---

La proteína DGK $\alpha$  se ha descrito como una enzima atenuadora de la ruta RasGRP/Ras/ERK/AP1 (Sanjuan, Jones et al. 2001; Jones, Sanjuan et al. 2002). La expresión en células T de un mutante de DGK $\alpha$  sin actividad (KD) da lugar a un aumento en el nivel de fosforilación de ERK1/2 desencadenada por la estimulación del TCR (Jones, Sanjuan et al. 2002). Este mutante KD actúa como una proteína dominante negativa respecto a la proteína DGK $\alpha$  endógena, puesto que se moviliza a la membrana plasmática de forma sostenida, impidiendo la localización de la enzima endógena (Jones, Sanjuan et al. 2002). La expresión de DGK $\alpha$  KD en células T provoca que la movilización de RasGRP1 desde el citosol a la membrana plasmática en respuesta a la activación del TCR en lugar de transitoria, sea sostenida; mientras que la expresión de un mutante de DGK $\alpha$  constitutivamente asociado a la membrana impide esta movilización (Sanjuan, Pradet-Balade et al. 2003). De esta manera la localización de DGK $\alpha$  regula la activación de la ruta RasGRP1/Ras/ERK.

Se postula que la unión del Ca<sup>2+</sup> a las manos de Ca<sup>2+</sup> y la actividad de las tirosinas quinasas son necesarias para la movilización de DGK $\alpha$  desde el citosol a la membrana plasmática donde la proteína ejerce su función (Sanjuan, Jones et al. 2001). Sin embargo, poco está descrito de las tirosinas quinasas implicadas y su mecanismo de activación, aunque, por analogía con otros receptores, se cree que la familia de tirosinas quinasas Src juega un papel importante. Durante la activación de las células T, la actividad DGK $\alpha$ , además de atenuar la señal de activación mediada por el TCR, es esencial para la proliferación celular a través del receptor de IL2 (Flores, Casaseca et al. 1996). Este doble papel llevado a cabo por DGK $\alpha$  depende del mecanismo de activación de la proteína en función del receptor. A diferencia de la activación del TCR, en respuesta al receptor de IL2, no se produce la activación de ninguna PLC y, por tanto, no hay incremento de Ca<sup>2+</sup>. En este caso es la acción de la PI3K la que, mediante la generación de lípidos fosforilados en la posición 3 del anillo de inositol, modula la actividad de DGK $\alpha$  en respuesta a este receptor (Cipres, Carrasco et al. 2003).

El estudio del modelo KO de DGK $\alpha$  revela que no hay alteraciones en el desarrollo tímico, encontrándose el mismo número y proporción de las poblaciones de dobles positivas (DP), dobles negativas (DN) y simples positivas (SP) (Olenchok, Guo et al. 2006) y tampoco está afectada la colonización de los órganos linfoides secundarios, ni las poblaciones de células de memoria, ni de células T sin activar. El estudio de las células T maduras de estos ratones sí que muestra una prolongada activación de la ruta Ras/Raf1/ERK1-2, un aumento en la activación del factor de transcripción AP-1, y un fuerte nivel de proliferación en respuesta a la estimulación del TCR.

## **DGK $\zeta$**

Las células T de ratón también expresan DGK $\zeta$ . Su función, como en el caso de DGK $\alpha$ , está muy relacionada con la atenuación de la ruta RasGRP1/Ras/ERK/AP1 (Topham and Prescott 2001; Zhong, Hainey et al. 2002). En el caso de la DGK $\zeta$ , la sobreexpresión de la proteína disminuye la activación de AP-1 en respuesta al TCR de una manera dependiente de la actividad quinasa de la proteína y de sus dominios C1 (Zhong, Hainey et al. 2002). DGK $\zeta$ , además de a RasGRP1, es también capaz de regular la actividad de otros miembros de la familia RasGRP: RasGRP3 y RasGRP4 (Regier, Higbee et al. 2005).

El modelo de ratón KO para DGK $\zeta$  ha permitido estudiar la influencia de la misma en la respuesta inmune. Al igual que en el caso de DGK $\alpha$  presenta un desarrollo tímico normal. Sin embargo, posee una mayor activación de la respuesta inmune en respuesta al TCR. El estudio de las células T revela una mayor activación de ERK1/2, una mayor expresión de CD69 y CD25, ambos marcadores de superficie cuya expresión depende del factor de transcripción AP-1, y una mayor proliferación celular (Zhong, Hainey et al. 2003). Además, los mastocitos de estos ratones tienen disminuida la degranulación después de la estimulación del Fc $\epsilon$ RI, estando este fenotipo asociado con una menor activación de PLC $\gamma$ , un menor flujo de Ca $^{2+}$ , y una menor movilización de la proteína PKC $\beta$ II a la fracción de membrana (Olenchock, Guo et al. 2006).

Aunque ambas isoformas, DGK $\alpha$  y DGK $\zeta$ , han sido caracterizadas como proteínas capaces de ser movilizadas a la membrana donde ejercen su función en respuesta a la estimulación del TCR (Santos, Carrasco et al. 2002; Sanjuan, Pradet-Balade et al. 2003), se diferencian en el mecanismo por el que se produce dicha movilización. Mientras que DGK $\alpha$  necesita de la unión del Ca $^{2+}$  y de las tirosinas quinasas, DGK $\zeta$  necesita la acción de una PKC que fosforile su dominio MARKS junto con la pérdida de la restricción negativa que suponen los dominios repetidos de anquirina y/o las secuencias de unión a dominios PDZ (Santos, Carrasco et al. 2002; Zhong, Hainey et al. 2002). La acción conjunta de ambas proteínas esta siendo estudiada a partir de la generación de los ratones doble KO para DGK $\alpha$  y DGK $\zeta$ . Éstos, aunque aún no ha sido descrito, parecen tener afectado el desarrollo tímico y cuentan con una activación inapropiada de las timocitos que consiguen diferenciarse hacia célula T madura (Olenchock, Guo et al. 2006).

## **LA INDUCCIÓN DE ANERGIA COMO UN MECANISMO DE TOLERANCIA INMUNOLÓGICA DE LAS CÉLULAS T PERIFÉRICAS**

El mantenimiento de la tolerancia inmunológica de las células T, además de por la selección negativa que se produce en el timo, está regulado en periferia por medio de la inducción de anergia en aquellas células T efectoras que son capaces de reconocer los antígenos propios, evitando con ello procesos autoinmunes.

Durante la inducción de la anergia se ven afectadas tanto la activación de Ras (Fields, Gajewski et al. 1996; Li, Whaley et al. 1996), como la producción de DAG (Heissmeyer, Macian et al. 2004). Las células T que alcanzan el estado anergia también presentan un aumento en la expresión de DGK $\alpha$  (Macian, Garcia-Cozar et al. 2002; Zha, Marks et al. 2006) y DGK $\zeta$  (Zha, Marks et al. 2006). En estas células T anérgicas, el aumento de DGK $\alpha$  se asocia con la deslocalización de RasGRP1 de la membrana plasmática (Zha, Marks et al. 2006). Esta deslocalización provoca la disminución de la actividad Ras lo que conduce a una menor expresión de genes que responden a su activación como es la expresión de IL2. Así, en la células anergizadas, la inhibición de la actividad DGK $\alpha$  restituye la expresión de IL2 revirtiendo dicho estado. Por otro lado, la expresión ectópica de DGK $\alpha$  es suficiente para causar el estado de anergia de las células T (Zha, Marks et al. 2006). La importancia de la DGK $\alpha$  en la inducción de anergia se confirma en el modelo de ratón KO para DGK $\alpha$ , donde la ausencia de la proteína interfiere en el proceso de inducción de anergia a través de un aumento en la activación de la ruta Ras/Raf/ERK1-2 (Olenchock, Guo et al. 2006).

Los estudios llevados a cabo en los modelos de ratón respecto a la inducción de anergia demuestran la importancia de DGK $\alpha$  en el establecimiento de la misma, pero no explican como una enzima fundamentalmente citosólica puede alterar el DAG presente en las membranas celulares. Al comienzo del estudio de DGK $\alpha$  llevado a cabo en esta tesis se desconocía el mecanismo exacto por el cual las tirosinas quinasas colaboran con las manos de Ca<sup>2+</sup> en la movilización de DGK $\alpha$  en respuesta al TCR. Tampoco se sabía cómo en respuesta al receptor de IL2, donde no se produce incremento de Ca<sup>2+</sup> en el citoplasma, se produce la activación de DGK $\alpha$ , y si las tirosinas quinasas colaboran en esta activación. Todo ello nos hizo plantearnos una serie de preguntas que dio lugar a un proyecto con objetivos concretos.

# Objetivos



1. Estudio de la función de la proteína DGK $\alpha$  en células T como regulador negativo de la activación desencadenada por el TCR.
2. Caracterización funcional de nuevos dominios de regulación de DGK $\alpha$  que determinan la localización de la proteína en la membrana plasmática.
3. Determinación del mecanismo y de la función de las tirosinas quinasas de la familia Src en la movilización de DGK $\alpha$  desde el citosol a la membrana plasmática en respuesta al TCR.
4. Estudio de la función de la actividad DGK $\alpha$  en la proliferación y en la diferenciación celular de los linfomas anaplásicos de célula grande (ALCL) Karpas 299 y SU-DHL1.





# Materialles y Métodos



## REACTIVOS COMERCIALES

---

- $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP redivieu (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) (Amersham)
- Anti- $\beta$ -actina (Sigma)
- Anti-CD25 (BD Pharmingen)
- Anti-CD69 (BD Pharmingen)
- Anti-IFN $\gamma$  (BD Pharmingen)
- Anti-GFP policlona (Molecular Probes)
- Anti-GFP monoclonal (Roche)
- Anti-MAPK (ERK1-2) (Zymed)
- Anti-fosfoMAPK (ERK1-2) (Cell Signalling)
- Anti-sustratos fosforilados de AKT (Cell Signalling)
- Anti-I $\kappa$ B $\alpha$  (Cell Signalling)
- Anti IgG de conejo acoplada a HRP (DAKO)
- Anti IgG de ratón acoplada a HRP (DAKO)
- Anti STAT5a/b (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti PKC $\theta$  (Transduction laboratories)
- Anti pPKC (pan) ( $\gamma$ Thr514) (Cell signalling)
- Anti sustratos de PKC fosforilados en serinaer (Cell signalling)
- Anti CD3 humano (BD Pharmingen)
- Anti CD28 humano (BD Pharmingen)
- Anti HA (Covance)
- Anti p56/Lck humano monoclonal (BD Pharmingen)
- Anti Lck humano policlona (Upstate)
- Anti PLC $\gamma$  (Upstate)
- Anti-fosfoPLC $\gamma$  (Tyr 783) (Cell Signalling)
- Anti fosfotirosina (Upstate)
- Anti- $\alpha$ -tubulina (Sigma Aldrich)
- Anti-Vimentina (Sigma Aldrich)
- Aprotinina (Sigma Aldrich)
- Brefeldin A (Sigma Aldrich)
- Coulter<sup>R</sup> ADN-Prep <sup>TM</sup> (Beckman-Coulter)
- CFSE (Molecular Probes)
- Concanavalina A (Sigma)
- DETACHaBEAD Mouse CD<sub>4</sub> (DYNAL)
- Dynabeads Mouse CD<sub>4</sub> (L<sub>3</sub>T<sub>4</sub>)
- Gateway Technology (Invitrogen)
- ECL (Enhanced Chemistry Luminiscence) (Amersham Corp)
- Fitohemaglutinina A (Roche)
- Gamma-Bind G protein shepharose (Amersham Biosciences)
- Leupeptina (Sigma Aldrich)

- Ionomicina (Calbiochem)
- LY 294002 (Calbiochem)
- Nonidet P-40 (Sigma Aldrich)
- WHI-P154 (Calbiochem)
- PMSF (Sigma Aldrich)
- PP2 (Calbiochem)
- pRV-IRES/GFP (GENETRIX)
- R59949 (Calbiochem)
- Rapamicina (Calbiochem)
- WHI-P154 (Calbiochem)

### **LÍNEAS CELULARES**

---

La línea celular BaF3 se mantiene en cultivo en medio RPMI suplementado con 2mM de glutamina, 10% suero fetal bovino (FCS), 50nM  $\beta$ -mercaptoetanol y 50 U/ml de interleuquina-2 (IL2) recombinante o sobrenadante de células Wehi3B que aporta interleuquina-3 (IL-3) al 10%. Las líneas HEK293 (Fénix), Jurkat y Jcam se mantienen con medio DMEM suplementado con 2mM de glutamina, 10% de FCS. Las líneas celulares Molt-4, SU-DHL1 y Karpas 299 se mantienen con medio RPMI suplementado con 2mM de glutamina, 10% FCS. La línea celular presentadora de antígeno, EBV-221, se mantiene en cultivo en medio RPMI suplementado con 10% de FCS, 4mM de glutamina, 1 mM de piruvato sódico y aminoácidos no esenciales. Todas las líneas se mantuvieron a 37 C y 10% de CO<sub>2</sub>.

### **AISLAMIENTO DE LINFOCITOS PRIMARIOS DE SANGRE PERIFÉRICA (PBLs)**

#### **DE RATÓN**

---

Los PBLs de ratón se aislaron de bazo y de nódulos linfáticos mediante anticuerpos monoclonales acoplados a bolas magnéticas (DYNABEADS) según el protocolo establecido por la casa comercial. Los ratones de la cepa Balb C se sacrifican y se les extraen los nódulos linfáticos y el bazo. Una vez obtenidos estos órganos, se filtran por una malla que permite aislar los tejidos conectivos de los órganos de las células libres en suspensión. Posteriormente se lisan los eritrocitos de la suspensión celular mediante un tampón de lisis de eritrocitos (140mM NH<sub>4</sub>CL y 17 mM Tris-HCl (pH 7.2) y se procede al aislamiento de la células primarias de interés, en nuestro caso células T CD4<sup>+</sup>. Para llevar a cabo este proceso, y a partir de anticuerpos monoclonales acopladas a bolas magnéticas, se utilizan métodos de selección negativa, donde se descartan las células que se unen a anticuerpos monoclonales anti-B220, anti-CD8 y anti-Mac1, o métodos de selección positiva, mediante el cual se aíslan las células que se unen al anticuerpo monoclonal anti-CD4<sup>+</sup>, y se descarta el sobrenadante. El grado de pureza del aislamiento se comprueba mediante tinción con un anticuerpo anti-CD4 acoplado a un fluorocromo y el posterior uso de técnicas de citometría de flujo. Una vez obtenidas las células T CD4<sup>+</sup>, las células reciben la estimulación correspondiente, tras la cual se mantienen en cultivo en medio RPMI suplementado con 2mM de glutamina, 10% de FCS, 50nM  $\beta$ -

mercaptoetanol y un sobrenadante celular que aporta IL2 al 5%.

### **ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T DE RATÓN MEDIANTE PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA**

Los ratones 5CC son ratones transgénicos para el reconocimiento antigénico de un péptido del citocromo C de paloma (PCC 88-104) KAERADLIAYLKQATAK, de manera que las células T de estos ratones son capaces de reconocer el péptido PCC en el contexto de la presentación antigénica del mismo por parte del MHC (Vratsanos, Jung et al. 2001). Para llevar a cabo la activación de las células T CD4<sup>+</sup> de los ratones 5CC éstas se aíslan del bazo de ratones de entre 4 y 6 semanas de vida según el protocolo descrito anteriormente. Una vez aisladas, para la estimulación con el PCC, las células se resuspenden en medio RPMI completo a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml y en la suspensión se incorporan PBLs de bazo previamente irradiados a 20 grays durante 5 minutos a una concentración de  $0.5 \times 10^6$  PBLs/ml y el péptido PCC ( $1 \mu\text{g/ml}$ ). Cada 48 horas se cambia el medio por medio RPMI completo suplementado con 5% de un sobrenadante celular que contiene IL2.

### **AISLAMIENTO DE PBLs HUMANOS**

Los PBLs humanos se aíslan de sangre periférica de individuos sanos. Para ello, un volumen de sangre se combina con un volumen igual de medio RPMI incompleto. La combinación se incorpora a un volumen igual de Ficoll, evitando la mezcla entre ambos volúmenes. La suma de los dos volúmenes se centrifuga a 840g durante 30 minutos, tras los cuales se recogen las células de la interfase. Estas células se lavan dos veces con medio incompleto y se resuspenden en medio RPMI completo (10% FCS, 2mM de glutamina, 1x aminoácidos no esenciales, 1mM piruvato sódico y antibióticos) en presencia de IL2 humana (20 U/ml) y fitohemaglutinina-L (PHA-L) ( $5 \mu\text{g/ml}$ ).

### **LISIS CELULAR**

Las células se lisan en el tampón p70 (10 mM Hepes, pH 7.5, 15 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% glicerol, 0.2% Nonidet P-40, 1 mM ditiotritol, 50 mM NaF, 10  $\mu\text{g/ml}$  de leupeptina y de aprotinina, 1 mM PMSF, 1 mM ortovanadato sódico, y 20 mM -glicerolfosfato) a 4° durante 10 minutos. Después el lisado se centrifuga a 15.000g, a 4° durante 15 minutos. En el sobrenadante se cuantifica la cantidad de proteína, una vez cuantificada mediante el detergente SDS se reducen las proteínas con tampón de Laemmli y se separan éstas en geles de poliacrilamida y electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas se transfieren a membranas de nitrocelulosa y estas se analizan con anticuerpos específicos frente a la proteína de interés.

### **PLÁSMIDOS Y TRANSFECCIONES**

Los vectores de expresión para GFP-DGK $\alpha$  wt, GFP-DGK $\alpha$   $\Delta(1-196)$  y HA-DGK $\alpha$  usados fueron previamente generados y descritos en el laboratorio (Sanjuan, Jones et al.

2001; Cipres, Carrasco et al. 2003). Sobre los mismos se realizaron tanto las truncaciones como las mutaciones puntuales descritas en la [Tabla Materiales 1](#).

Tabla Materiales 1

	<b>Y335D</b>	<b>Y335F</b>	<b>Δ(722-734)</b>	<b>G433A</b>	<b>G433A Y335F</b>	<b>G433A Δ(722- 734)</b>
<b>GFP-DGK<math>\alpha</math> wt</b>	GFP-DGK $\alpha$ Y335D	GFP-DGK $\alpha$ Y335F	GFP-DGK $\alpha$ Δ(722-734)	-	-	-
<b>GFP-DGK<math>\alpha</math> Δ(1-196)</b>	GFP-DGK $\alpha$ Δ(1-196) Y335D	GFP-DGK $\alpha$ Δ(1-196) Y335F	GFP-DGK $\alpha$ Δ(1-196) Δ(722-734)	GFP-DGK $\alpha$ Δ(1-196) G433A	GFP- DGK $\alpha$ Δ(1-196) G433A Y335F	GFP- DGK $\alpha$ Δ(1-196) G433A Δ(722- 734)
<b>HA-DGK<math>\alpha</math></b>	HA-DGK $\alpha$ Y335D	HA-DGK $\alpha$ Y335F	-	-	-	-

Los oligos de ADN usados para realizar la mutagénesis dirigida se resumen en la [Tabla Materiales 2](#).

Tabla Materiales 2

<b>MUTACIÓN</b>	<b>OLIGO DISEÑADO</b>
Y335D ratón	5' CCTCCGTGTTCCATCGACCCCAGCGTCCTGGTAT 3' 3' GGAGGCACAAGGTAGCTGGGGTTCGCAGGACCATA 5'
Y335F ratón	5' CCTCCGTGTTCCATCTTCCCCAGCGTCCTGGTAT 3' 3' GGAGGCACAAGGTAGAAAGGGTTCGCAGGACCATA 5'
Y335D cerdo	5' CCTCCATCTTCCATCGATCCCAGTGTCCCTGGCC 3' 3' GGAGGTAGAAGGTAGCTAGGGTTCACAGGACCGG 5'
Y335F cerdo	5' CCTCCATCTTCCATCTTTCCCAGTGTCCCTGGCC 3' 3' GGAGGTAGAAGGTAGAAAGGGTTCACAGGACCGG 5'
G433A cerdo (KD)	5' GTGTGTGGCGCAGATGGCACAGTA 3' 3' TAAACCACACACCGCGTCTACCG 5'

Para obtener las mutaciones puntuales de la tirosina 335 y de la glicina 433 se usa el sistema “*QuickChange Site-directed mutagenesis kit*” de Stratagene, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la transfección de las células Ba/F3 se recogen  $12.5 \times 10^6$  de células en crecimiento exponencial y se resuspenden en un volumen de 500  $\mu$ l de medio sin suero previamente atemperado. Se transfectan 20  $\mu$ g de ADN del plásmido de interés con un electrochoque que se realiza a 304 v y 975  $\mu$ F. Después del electrochoque, las células se recuperan con 30 ml

de medio completo y 24 horas después se realiza el ensayo correspondiente. En el caso de las células Jurkat, se transfectan 20µg de ADN del plásmido de interés en el mismo número de células que en BaF3 pero se resuspenden en 400 µl de medio sin suero previamente atemperado. El electrochoque se realiza a 270 v y 975 µF y las células se recuperan con 20 ml de medio completo, 24 horas después se realiza el ensayo. Las células HEK293 se transfectan con lipofectamina según las instrucciones del fabricante. Las células Fénix se transfectan con un protocolo de coprecipitación de ADN con fosfato cálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ).

### **GELES DE POLIACRILAMIDA Y WESTERN BLOT**

Las proteínas de los lisados celulares se separan en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). El porcentaje de los geles varía en función de la proteína analizada entre el 7.5% y el 12%. En el caso de DGK $\alpha$  el porcentaje fue del 10%. Una vez realizada la separación de las proteínas, éstas se transfieren a membranas de nitrocelulosa por técnicas de western blot.

El análisis de las membranas de nitrocelulosas se realiza con anticuerpos específicos siguiendo las instrucciones del fabricante. Excepto variaciones puntuales, en el protocolo básico se incuban las membranas de nitrocelulosa con leche al 5% en TBS durante una hora a temperatura ambiente para bloquearlas. Después se realizan 2 lavados de 10 minutos con TBS/Tween-20 0,1%, seguido de una incubación de 1 hora con el anticuerpo primario a temperatura ambiente. Pasada la hora, se lava la membrana de nitrocelulosa con 3 lavados de TBS/Tween-20 0,1% y se incuba con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima HRP durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se lava 2 veces la membrana con TBS/Tween-20 0,1%, y se revela mediante la reacción luminiscente que genera la HRP en presencia de su sustrato para lo cual se usa el reactivo ECL. Esta reacción luminiscente se recoge por autoradiografía y se cuantifica mediante el programa Image J.

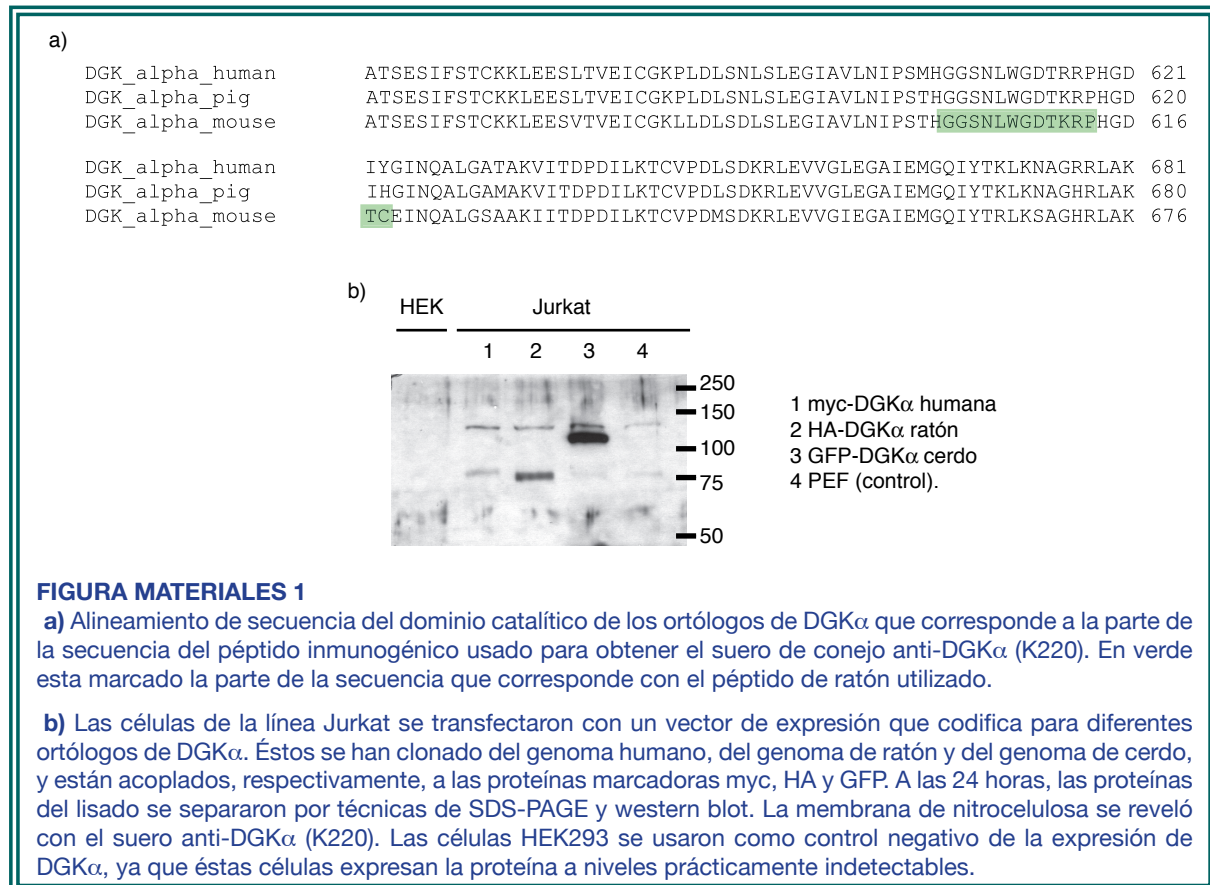
### **ANTICUERPOS NO COMERCIALES**

#### *Anti-pY335DGK $\alpha$*

Un péptido sintético correspondiente a la secuencia de DGK $\alpha$  P329-A339,  $\text{NH}_2\cdot\text{C}$  PPSS(fosfoY)PSVLA-COOH se conjuga a KLH. 300 µg del antígeno conjugado a KLH se emulsionan con adyuvante de Freund completo y se inyectan en conejas de 10 meses de edad. Cada dos semanas, se reinyectan otros 150 µg de antígeno con adyuvante de Freund incompleto. Tres días después de la sexta reinyección, se sangra el conejo y el antisuero es recolectado. La especificidad del anticuerpo es confirmada por dot blot y western blot usando un péptido no fosforilado,  $\text{NH}_2\cdot\text{C}$  PPSSIIYPSVLA-COOH, y un mutante de DGK $\alpha$  que no puede ser fosforilado en la tirosina 335, Y335F. El anticuerpo reacciona con el péptido fosforilado pero no con el no fosforilado o con el mutante Y335F.

**K220 (anti-DGK $\alpha$ )**

El antisuero específico frente a DGK $\alpha$  (anti-DGK $\alpha$ ) se obtuvo mediante la inmunización de conejos con un péptido específico de DGK $\alpha$  de ratón correspondiente a una región muy conservada del dominio catalítico de la proteína (Figura materiales 1a). Tras la obtención del suero de conejo, se comprueba la especificidad del anticuerpo mediante la transfección transiente, en la línea celular Jurkat, de vectores de expresión que codifican para DGK $\alpha$  de diferentes especies. El estudio de las proteínas del lisado por técnicas de SDS-PAGE y



western blot, y el posterior análisis de la membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo K220, demuestra la especificidad del anticuerpo (Figura materiales 1b).

**CONSTRUCCIONES RETROVIRALES**

Los vectores retrovirales utilizados permiten la expresión de una proteína de interés junto con la resistencia a un antibiótico, como es la puromicina (MSCV-PURO), o junto con la expresión de la proteína verde fluorescente (IRES-GFP). Esto posibilita el seguimiento de la transducción retroviral dado que sólo las células que sobreviven a la incorporación de la droga, puromicina, o aquellas que expresan la proteína GFP se pueden considerar positivas para la infección. Las construcciones retrovirales utilizadas se resumen en la Tabla Materiales 3. Las construcciones retrovirales (MSCV-PURO) están basadas en la tecnología GATEWAY (Invitrogen) para introducir la secuencia de ADN de la proteína de interés, mientras que las



construcciones IRES-GFP poseen sitios de restricción que permiten la incorporación de las secuencias de interés.

**Tabla Materiales 3**

<b>MSCV-puro</b>	<b>IRES-GFP</b>
DGK $\alpha$ $\Delta$ (1-196) clon 1	DGK $\alpha$ wt
DGK $\alpha$ $\Delta$ (1-196) clon 2	DGK $\alpha$ $\Delta$ (1-196)

### ***PRODUCCIÓN DE SOBRENADANTE VIRAL***

Se tranfecta el ADN del vector retroviral a través de un protocolo de coprecipitación de ADN con fosfato cálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) en las células empaquetadoras de virus de la línea celular Fénix, básicamente células HEK293 que expresan de manera estable las proteínas de la envuelta del virus (gag-env-pol). La proporción de ADN usado es de 20  $\mu\text{g}$  de ADN por cada  $8 \times 10^6$  células empaquetadoras, las cuales se encuentran creciendo en placas de cultivo de 10 cm de diámetro. Después de 16 horas desde la transfección, se cambia el medio de cultivo de las células por el medio de cultivo de las células que van a ser transducidas. A las 24 horas de cambiar el medio se recoge este primer sobrenadante y se centrifuga 16 horas a 4.000g para concentrar las partículas virales. Además, se renueva el medio de cultivo recolectado con medio fresco. A las 16 horas, se recolecta el segundo sobrenadante viral y se le incorporan las partículas virales del primer sobrenadante.

### ***TRANSDUCCIÓN RETROVIRAL***

Se purifican células T de bazo y timo de ratón que expresan CD4 mediante selección positiva de las mismas o selección negativa mediante depleción de células que expresan CD8, B220 (células B), y macrófagos. Para ambos tipos de selección se usan bolas magnéticas acopladas a anticuerpos específicos (Dynabeads) usadas según las instrucciones del fabricante. El grado de purificación se analiza por citometría de flujo. Las células T CD4<sup>+</sup> son activadas a través de la estimulación con anticuerpos anti-CD3/-CD28 pegados a placa. Para llevar a cabo esta estimulación las placas se tratan previamente durante 16 horas a 4°C con un anticuerpo contra IgG de hamster. Después, las placas se lavan 3 veces con PBS y posteriormente se incorporan las células T CD4<sup>+</sup> a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml junto con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de CD3 y 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de CD28). A las 48 horas de la activación, las células T son transducidas con el sobrenadante retroviral. Para ello, se retira el medio de las células T y se incorpora el sobrenadante viral a razón de 4-7 ml de sobrenadante por cada  $2 \times 10^6$  de células T. Las células se centrifugan a 840g durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente, y después se dejan en el incubador 3-4 horas a 37°C y 10%  $\text{CO}_2$ . Una vez ha pasado este tiempo, se retira el sobrenadante viral y se incorpora medio fresco hasta dejar las células a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. En el caso de vectores de resistencia a puromicina, se incorpora esta droga entre 36 y 48 horas después de la transducción. Entre 24 y 48 horas después de haber incorporado la puromicina, sólo las

células capaces de sobrevivir a la droga permanecen viables.

### **INMUNOPRECIPITACIÓN**

---

Las células se lisan en tampón NP-40 (1% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM PMSF, 10 ng/ $\mu\text{l}$  aprotinina, 10 ng/ $\mu\text{l}$  leupeptina), después se centrifugan a 15.000g, 4°C. Una vez se recoge el sobrenadante, se cuantifica la cantidad de proteína del mismo. La inmunoprecipitación se realiza según las especificaciones de cada anticuerpo, por lo general 1-5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anticuerpo en 300-500  $\mu\text{g}$  de proteína durante 1 hora a 4°C. Pasado ese tiempo, se incorpora el anticuerpo secundario capaz de reconocer el anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar, Gamma-Bind G protein shepharose, 1 hora a 4°C. Finalmente el inmunoprecipitado se recolecta por centrifugación, y se lava 2 veces con el tampón de lisis NP-40 usado para lisar, una vez con un tampón LiCl (0.5M LiCl y Hepes 50mM pH 7.4) y 3 veces con tampón Hepes 50mM pH 7.4.

### **FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR**

---

El fraccionamiento se realiza como se describe en Cao, Janssen et al. 2002 con las siguientes modificaciones. Las células Jurkat se recolectan y se resuspenden en tampón de lisis 1 previamente enfriado (5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 1 mM DTT y 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de digitonina) suplementado con la mezcla de inhibidores de proteínas. Se lisan las células durante 15 minutos a 4° C, después se centrifugan a 4500g durante 4 minutos a 4° C y se recoge el sobrenadante (fracción citosólica, C). La fracción insoluble se resuspende en tampón de lisis 2 previamente enfriado (5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 1 mM DTT y 0.2% NP-40) y se lisa durante 10 minutos a 4°C, después se centrifuga a 15000g, 15 minutos a 4° C y se recoge el sobrenadante (fracción de membrana, M1). La fracción insoluble de este segundo lisado es resuspendida en el tampón de lisis 3 (5 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM EGTA, 1 mM DTT y 1 % NP-40) y sujeta al mismo proceso que con el tampón 2. El sobrenadante de esta segunda fracción contiene las proteínas más fuertemente asociadas a las membranas celulares (fracción de membrana, M2). La última fracción insoluble es resuspendida en tampón de carga de proteínas (tampón de Laemmli) y corresponde a la fracción de proteínas del citoesqueleto (Ck). Las diferentes fracciones son separadas por técnicas de SDS-PAGE y western blot.

### **ENSAYO DGK**

---

Las proteínas son inmunoprecipitadas según su protocolo y su actividad se ensaya mediante incorporación del fosfato gamma de una molécula de ATP marcado radiactivamente ( $\text{P}^{32}$ ) en la molécula de DAG de cadena de ocho átomos de carbono, 1,2-octanoil- sn-glicerol (C8-DAG), para dar lugar a ácido fosfatídico con una cadena de ocho átomos de carbono marcado con fósforo 32 (C8- $^{32}\text{PA}$ ). La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 10 minutos, y una vez se produce, los lípidos son extraídos mediante un solvente

compuesto de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{HCl}(2\text{N})$  (20:10:5,v/v/v). Los lípidos son secados por medio de centrifugación en vacío atmosférico, para después ser resuspendidos en un solvente de  $\text{CHCl}_3$ , MeOH, y amonio 4M (9:7:2,v/v/v). Estos lípidos son separados en cromatografía en capa fina (TLC) y el resultado de la separación se visualiza por autoradiografía de las misma.

### ***MICROSCOPIA CONFOCAL***

---

Las células Jurkat, 24 horas después de la transfección, se centrifugan y resuspenden en HBSS (25mM de hepes KOH pH 7.4, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 132 mM NaCl, 0,1% BSA), para después transferirlas a cámaras de microscopía recubiertas con poli-D,L-lisina y, tras permitir que se adhieran, se mantienen a 37° C. Las imágenes son capturadas con un microscopio confocal Leica y analizadas con el programa ImageJ.

### ***ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS CON ANTICUERPOS ANTI-CD3/ANTI-CD28 PEGADOS A PLACA***

---

La superficie de las cámaras de microscopía se incuban con una mezcla de anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  cada uno) en 150mM Tris-HCl pH8, a temperatura ambiente durante 1 hora o a 4° C durante 16 horas. Las células Jurkat, transfectadas 24 horas antes con la construcción indicada, se centrifugan y se resuspenden en HBSS. Estas células se incorporan a las cámaras de microscopía previamente atemperadas a 37° C, y se recogen las imágenes por microscopía confocal a los tiempos indicados tomando como tiempo cero el momento en que se incorporan las células. Las imágenes son analizadas con el programa ImageJ.

### ***ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS CON ANTICUERPOS SOLUBLES CD3/CD28***

---

Las células de la línea Jurkat en crecimiento exponencial se recogen en tampón HBSS (25mM de hepes KOH pH 7.4, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 132 mM NaCl, 0,1% BSA) en tubos de 1.5 ml, uno por cada punto de estimulación, a una concentración nunca superior a  $5 \times 10^6$  células/ml. Las células son estimuladas con anticuerpos anti-CD3 o anti-CD3 y anti-CD28 a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  cada uno. En el caso de usar el inhibidor de DGK, R59949, las células son incubadas 30 minutos antes de la estimulación con el inhibidor a una concentración de 30  $\mu\text{M}$ . Tras la estimulación durante los tiempos indicados, las células se congelan a -80°C y posteriormente se lisan para analizar las proteínas por técnicas de SDS-PAGE y western blot.

### ***ESTIMULACIÓN DE LAS CÉLULAS CON MICROESFERAS RECUBIERTAS DE ANTICUERPOS ANTI-CD3 Y ANTI-CD28***

---

Para recubrir a las microesferas con los anticuerpos se incuban  $0.5 \times 10^6$  microesferas con 1 $\mu\text{g}$  de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 en 1 ml de PBS durante 90 minutos. Pasado

el tiempo, se centrifugan las microesferas para retirar el sobrenadante e incorporar 1.5 ml de BSA 1% en PBS durante 30 minutos. Las microesferas se lavan tres veces con PBS para después conservarlas a 4 °C hasta su uso. Para la estimulación de las células, éstas se ponen en contacto con las microesferas a razón de 1 célula por microesfera, y se toman imágenes con el microscopio confocal. Las imágenes son analizadas con el programa ImageJ.

### **ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS JURKAT CON PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA DE SEE**

---

Las células presentadoras de antígeno EBV-221 se cargan con el superantígeno SEE (SEE de Staphylococcus). Se incuban  $10 \times 10^6$  células con 10  $\mu$ l de SEE (0.1mg/ml) en 1 ml de medio sin suero durante 2h a 37°C. Pasado este tiempo se lavan dos veces con medio sin suero y se mantienen a 37° C en medio completo hasta su uso. En el momento de usarlas, las células EBV-221 cargadas con el superantígeno se juntan con la misma cantidad de células Jurkat, se centrifugan durante 2 minutos, se resuspenden en 500  $\mu$ l de HBSS y se incuban 15 minutos a 37° C. Las células se incorporan a una cámara de microscopía previamente atemperada. Las imágenes se toman con un microscopio confocal y se analizan mediante el programa Image J.

### **CITOMETRÍA DE FLUJO**

---

#### *Marcaje de proteínas de la superficie celular*

Las células ( $1 \times 10^5$ - $2 \times 10^5$ ) son centrifugadas a 210g en una placa multipocillo de fondo cóncavo durante 1 minuto y lavadas 2 veces con el tampón PBSs (PBS/1% FCS/1% azida sódica). Posteriormente son resuspendidas en PBSs al que previamente se le ha incorporado la mezcla de anticuerpos acoplados a fluorocromos de las proteínas que se van a analizar de la superficie celular, y la mezcla se deja incubando durante 30 minutos a 4°C en condiciones de oscuridad. A los 30 minutos, se lavan con el tampón PBSs para finalmente resuspenderlas en PBSs. El marcaje celular fue analizado por citometría de flujo en un citómetro de la marca Coulter o Beckton Dickinson.

#### *Tinción intracelular de proteínas*

Las células ( $0.5$ - $1 \times 10^6$  células) se estimulan durante 4-6h horas con anti-CD3/anti-CD28 pegado a placa (0.5  $\mu$ g/ml de anti-CD3 y 1  $\mu$ g/ml de anti-CD28). Durante las 2-3 última horas de estimulación se incorpora brefeldina A (BFA) a 10 $\mu$ g/ml. Transcurrido el tiempo de estimulación, se recogen, se resuspenden las células en 200 $\mu$ l de PFA al 4% y se incuban durante 10 minutos a 4°C, después se lavan las células con PBS y se resuspenden en 200 $\mu$ l de PBS/0.5% saponina/1% BSA, en anticuerpos de bloqueo "FcBlock" (1/100 en PBS/0.5% saponina/1% BSA) incubándose durante 10 minutos. Se centrifugan y se retira el sobrenadante, posteriormente se resuspenden en PBS/0.5% saponina/1% BSA añadiendo en ella los anticuerpos anti-IL2 y anti-IFN $\gamma$ . Se incuban durante 30 minutos a temperatura

ambiente, se lavan las células con PBS/0.5% saponina/1% BSA 3 veces, y 2 veces con PBS. Finalmente se analiza por FACS la expresión de IL2 e INF $\gamma$ .

#### *Ensayo de proliferación con el marcador fluorescente: CFSE*

Se lavan las células 2 veces con PBS y se resuspenden de nuevo en PBS a una concentración de  $2 \times 10^7$  células/ml. Se diluye el stock de CFSE (10mM) entre 1000 y 2000 veces en PBS. Se mezclan las células con el CFSE a una relación 1:1 (v/v) y se agitan, periódicamente, durante 8 minutos a temperatura ambiente. Se para la incorporación de CFSE con un volumen igual de FCS, se mezcla bien y se deja reposar la mezcla durante 1 minuto. Se lavan las células dos veces con PBS que contiene un 10% de FCS, en cada lavado se dejan reposar las células durante 5 minutos. Finalmente se resuspende en medio completo para células T.

#### *Ciclo celular*

Para analizar el ciclo celular mediante la tinción de ADN con ioduro de propidio, se recogen entre  $0.2$  y  $0.5 \times 10^6$  células a una concentración de entre  $0.5$  y  $1.0 \times 10^6$  células/ml, se centrifugan, y se lisan con  $50 \mu\text{l}$  de detergente (ADN Prep™ LPR). A la mezcla se le incorporan  $500 \mu\text{l}$  de ioduro de propidio (ADN Prep™ Stain) y se mantiene a  $37^\circ \text{C}$  y oscuridad durante 30 minutos. Las muestras se analizan mediante un citómetro de la marca Coulter.



**Resultados**





## **1. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA DGK $\alpha$ EN CÉLULAS T COMO REGULADOR NEGATIVO DE LA ACTIVACIÓN DESENCADENADA POR EL TCR**

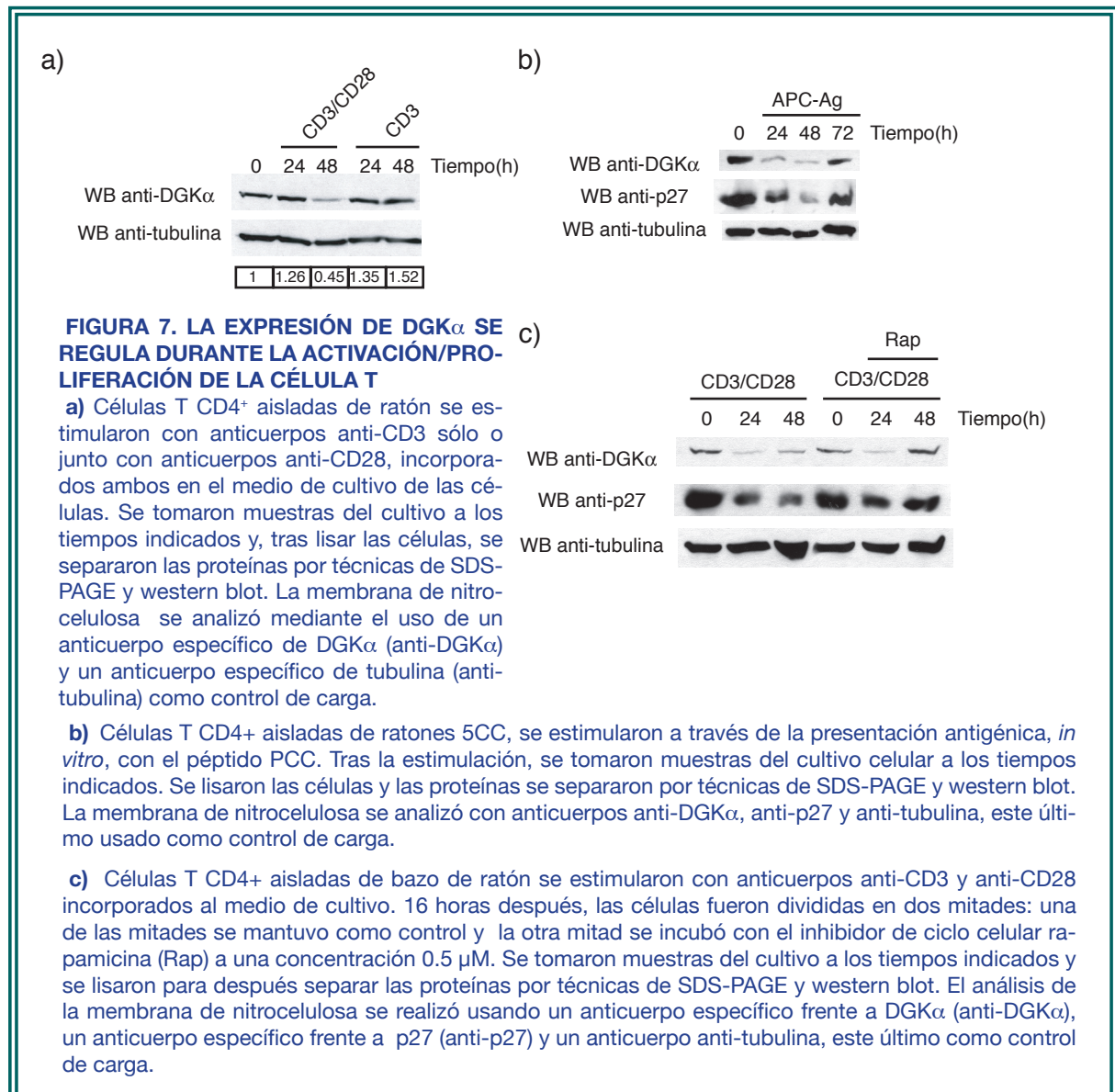
El proceso de activación de las células T está regulado tanto por la señal procedente del TCR en respuesta a la presentación antigénica, como por la señal de coestimulación procedente de la proteína transmembrana CD28 tras su interacción con la proteína B7.2 situada en la célula presentadora del antígeno (Zaru, Berrie et al. 2001; Diehn, Alizadeh et al. 2002). La activación de las células T provoca la expresión diferencial de genes que dan lugar a la respuesta inmune (Diehn, Alizadeh et al. 2002). La estimulación del TCR, en ausencia de la señal de coestimulación del CD28, induce en las células T el estado de anergia (Macian, Garcia-Cozar et al. 2002), que provoca en la célula un estado de insensibilización a la estimulación del TCR, anulando la señalización que procede del mismo. El establecimiento del estado de anergia, uno de los mecanismos que tienen las células T para mantener la tolerancia inmunológica (Schwartz 2003), implica de manera fundamental, la regulación de la ruta Ras/ERK/c-fos/AP1 (Boussiotis, Freeman et al. 1997). Está descrito que en la inducción y en el establecimiento del estado de anergia es esencial el flujo de Ca<sup>2+</sup> que lleva a la activación de la cascada de señalización que regula al factor de transcripción NFAT, de manera que, en ausencia de activación de AP-1, éste da lugar a una expresión diferencial de genes causantes del mantenimiento y de la inducción de anergia (Macian, Garcia-Cozar et al. 2002).

Dentro de la expresión diferencial que se produce durante la activación de la célula T, el gen que codifica para DGK $\alpha$  es uno de los genes cuya expresión disminuye al comienzo de la activación (Sanjuan, Pradet-Balade et al. 2003), coincidiendo con la expresión de genes que dependen de la activación de Ras/ERK/c-fos/AP-1, como es CD69 (D'Ambrosio, Cantrell et al. 1994; Castellanos, Munoz et al. 1997). A lo largo de la denominada activación tardía, DGK $\alpha$  recupera el cuarenta por ciento de la expresión que tenía previamente a la activación (Sanjuan, Pradet-Balade et al. 2003). Por otro lado, el gen que codifica para DGK $\alpha$  es uno de los genes inducidos durante el establecimiento del estado de anergia (Macian, Garcia-Cozar et al. 2002). Dada la importancia que está recibiendo el establecimiento del estado de anergia, y puesto que su inducción depende del equilibrio de señales desencadenadas por el DAG y el Ca<sup>2+</sup> generados a partir de la activación del TCR, se realizó un estudio detallado de los mecanismos que regulan la expresión de la proteína DGK $\alpha$  durante la respuesta a partir de dicho receptor.

### **La expresión de DGK $\alpha$ durante la activación del TCR depende de la señal coestimuladora del receptor CD28 y de la proliferación desencadenada en las célula T**

Puesto que las señales del TCR y del CD28 son esenciales para determinar la respuesta inmune en las células T (Diehn, Alizadeh et al. 2002), se determinó la influencia que ejercen ambas en la expresión de DGK $\alpha$ . Para ello, se aislaron células T de bazo de ratón que se estimularon con anticuerpos anti-CD3, que mimetizan la señal sólo del TCR, en presencia o en ausencia de la señal de coestimulación del CD28 mimetizada con el anticuerpo anti-

CD28. Se tomaron muestras del cultivo a diferentes tiempos de la activación donde se analizó la expresión de DGK $\alpha$ , observándose la expresión atenuada de la proteína en las células estimuladas respecto al control sin estimular, o a las células estimuladas sólo con anti-CD3. El resultado obtenido demuestra que la señal derivada de la coestimulación es necesaria para disminuir la expresión de DGK $\alpha$  en respuesta a la activación de la célula T (Figura 7a).



Para demostrar la importancia de la coestimulación en la regulación de la expresión de DGK $\alpha$ , se utilizó un estímulo más fisiológico como es la presentación antigénica. Para ello, se usaron ratones transgénicos para el TCR (ratones 5CC), cuyas células T son capaces de reconocer la presentación antigénica de un péptido específico del citocromo C de paloma (PCC) (Vratsanos, Jung et al. 2001). Se aislaron células T que fueron estimuladas, *in vitro*, con células presentadoras de antígeno (APC) cargadas con PCC en las que se analizó la expresión de DGK $\alpha$ . El resultado mostró una atenuación de la expresión de DGK $\alpha$  similar al observado

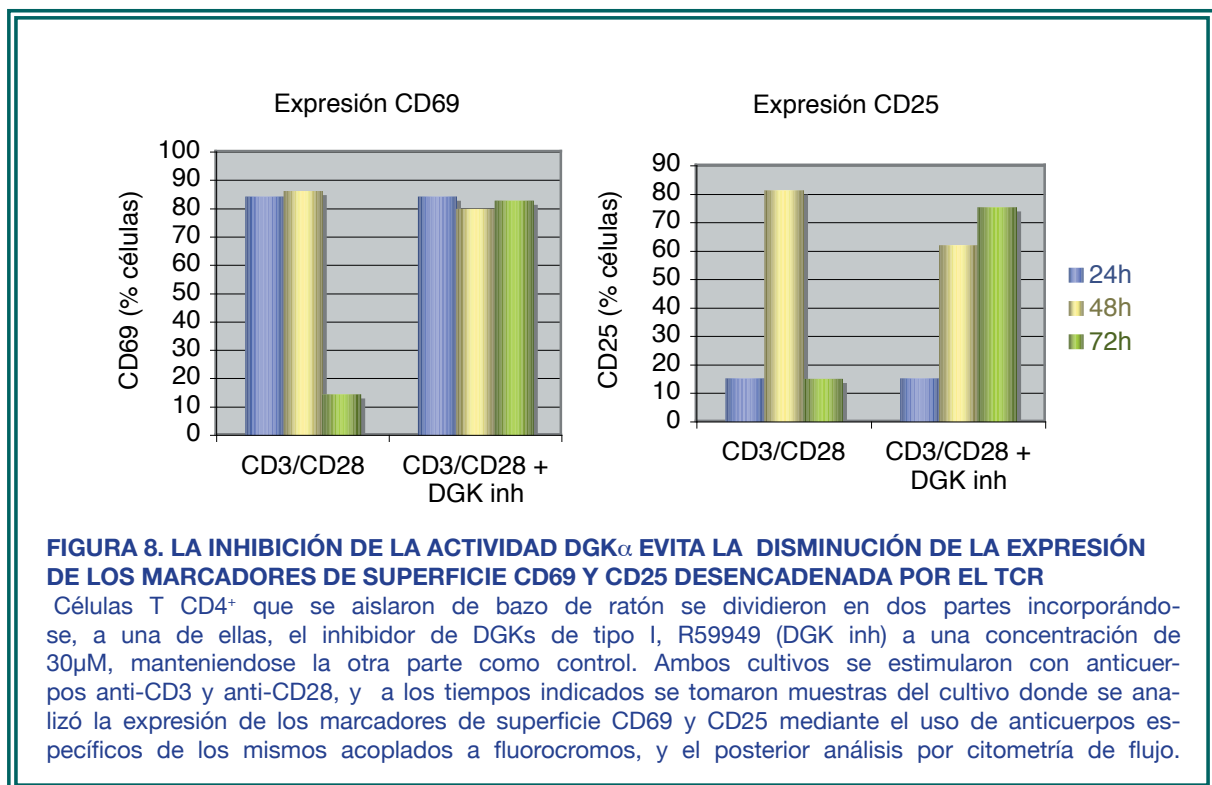
cuando las células se estimularon con anti-CD3 y anti-CD28 (Figura 7b). En estas muestras, se estudió, además, cómo era la expresión de DGK $\alpha$  durante la proliferación desencadenada por el TCR. Para visualizar la proliferación de las células T se analizó la expresión de p27, un inhibidor de ciclo celular cuya degradación permite la proliferación celular. Se observó que los niveles de expresión de DGK $\alpha$  coincidían con la disminución y el posterior aumento de los niveles de expresión de p27.

Para estudiar la relación entre la expresión de DGK $\alpha$  y la proliferación de las células T, se usó la rapamicina, un inhibidor farmacológico de ciclo celular (Terada, Lucas et al. 1993). El resultado mostró que la inhibición del ciclo, visualizada por el aumento de los niveles de expresión de la proteína p27, provocaba la recuperación de la expresión de DGK $\alpha$  a niveles similares a los que tenía antes de la estimulación del TCR (Figura 7c), demostrándose que la expresión de DGK $\alpha$  durante la activación de la célula T, no sólo depende de la señal del TCR y de la señal de coestimulación del CD28, sino que además depende de la proliferación celular desencadenada.

#### ***La actividad DGK $\alpha$ influye de manera negativa en la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 durante la activación de las células T***

La disminución en la expresión de DGK $\alpha$  durante la activación de las células T coincide con la expresión de marcadores de superficie desencadenada por la activación del TCR. Entre estos marcadores de superficie se encuentran CD69, una lectina (Castellanos, Munoz et al. 1997) que se expresa al comienzo de la activación y que se considera un marcador de activación temprana, y CD25, cuya expresión es posterior a la del CD69, y que se considera un marcador de activación tardía. CD25 es la cadena alfa del receptor de interleuquina 2 (IL2r) que, junto con la expresión de IL2, marca el comienzo de la proliferación de las células T. La ruta Ras/ERK/c-fos/AP-1 regula la expresión tanto de CD69 como de CD25 durante la activación de las células T. Puesto que CD69 ha sido descrito como un gen regulado por la actividad DGK $\alpha$  (Sanjuan, Jones et al. 2001), y los niveles de DGK $\alpha$  disminuyen durante la activación, se estudió si la disminución de los niveles de expresión de DGK $\alpha$  era suficiente para permitir la expresión de CD69 y CD25 o, por el contrario, la proteína DGK $\alpha$  que se sigue expresando ejercía influencia en la expresión de estos marcadores de activación. Para ello, se aislaron células T de ratón que se activaron a través de la estimulación del TCR y de la señal coestimuladora del CD28, en presencia o en ausencia de R59949, un inhibidor de la actividad DGK $\alpha$ . El marcaje de las células T con anticuerpos específicos de CD69 y de CD25, y el posterior análisis a través de técnicas de citometría de flujo detectó la expresión de CD69 24 horas después de la estimulación del TCR y la de CD25 48 horas después. Ambas expresiones desaparecían 72 horas después de haber recibido la estimulación del TCR. La inhibición de la actividad DGK $\alpha$  evitaba la disminución de la expresión en la membrana plasmática de CD69 y CD25 en respuesta al TCR, lo que sugiere que aunque los niveles de la DGK $\alpha$  disminuyen

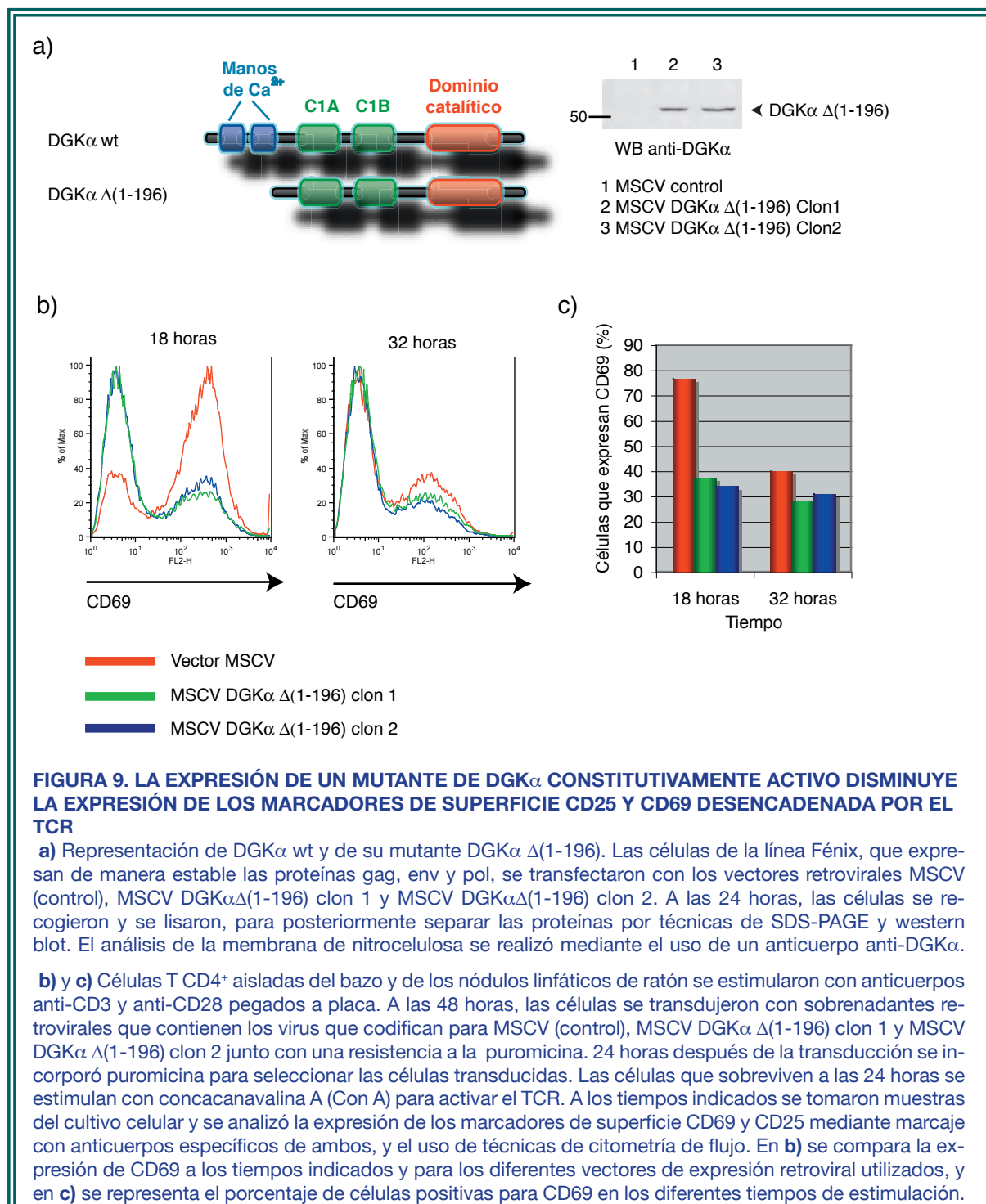
durante la activación, la DGK $\alpha$  que aún se expresa participa en la regulación negativa de las señales procedentes del TCR (Figura 8).



***La expresión de una forma de DGK $\alpha$  constitutivamente activa disminuye la expresión de CD69 y CD25 desencadenada por el TCR***

El resultado anterior pone de manifiesto el papel de la DGK $\alpha$  como regulador negativo de la señal procedente del TCR. Para determinar mejor la importancia de esta función, se analizó el efecto que tenía la expresión ectópica de DGK $\alpha$  en células T de ratón. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron técnicas de transducción retroviral. Estas técnicas permiten la introducción en una célula, en nuestro caso en células T de ratón, de un vector de expresión retroviral que codifica para una proteína de interés junto con otra proteína que infiere resistencia al antibiótico puromicina; de manera que, 24 horas después, sólo aquellas células infectadas con el vector retroviral serán capaces de sobrevivir a la puromicina (ver materiales y métodos).

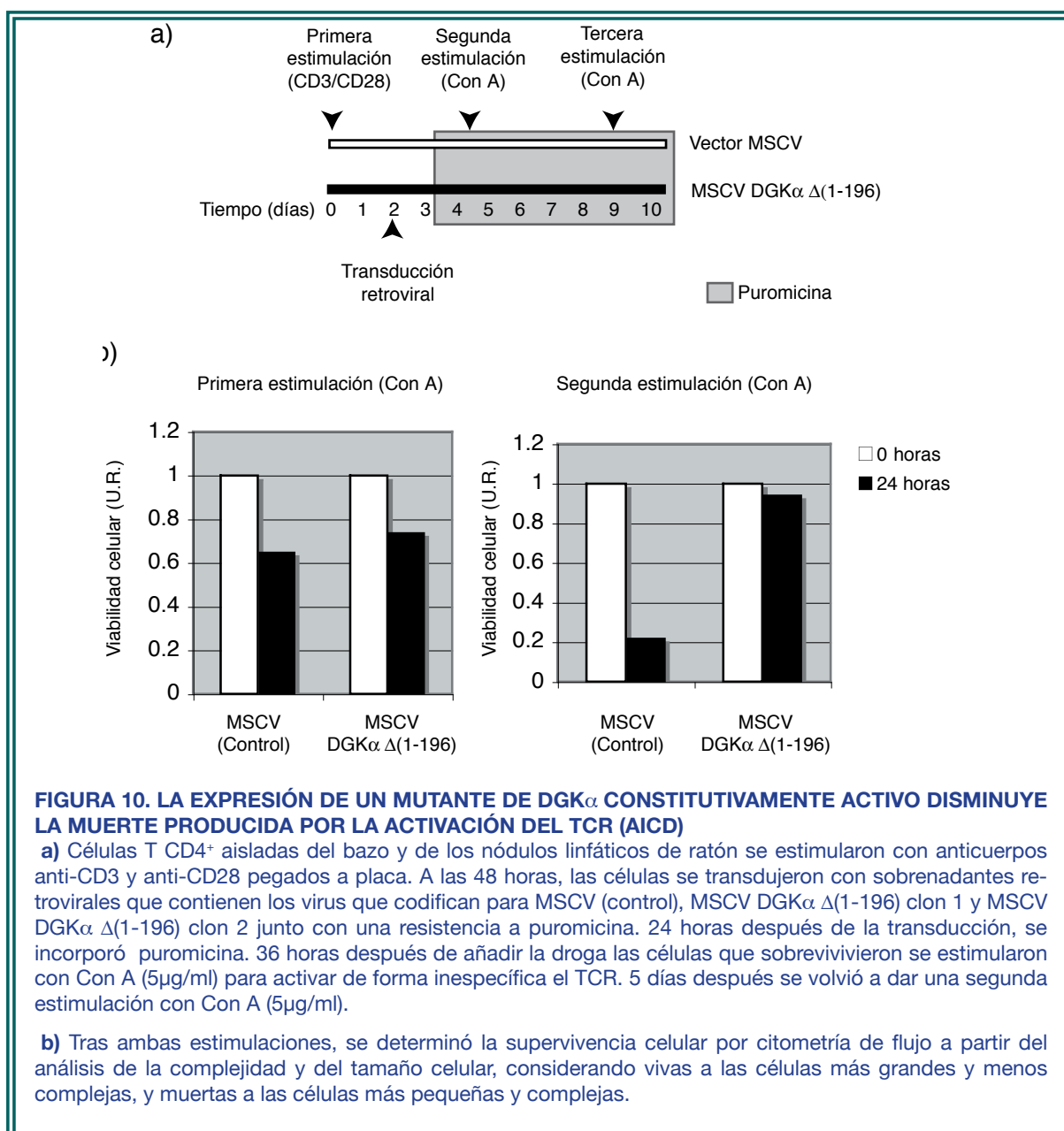
Para determinar el efecto que produce un exceso de actividad DGK $\alpha$  en la activación de las células T, se diseñó un vector retroviral que expresaba un mutante de DGK $\alpha$  constitutivamente activo, DGK $\alpha\Delta$ (1-196) (Jiang, Qian et al. 2000; Sanjuan, Jones et al. 2001). Para comprobar la expresión correcta de dicha proteína se analizaron, en los lisados de las células empaquetadoras del virus, en nuestro caso las células de la línea Fénix, la expresión de dos clones de DGK $\alpha\Delta$ (1-196) con un anticuerpo específico de DGK $\alpha$ . El resultado obtenido demuestra que ambos clones de DGK $\alpha$  expresan la proteína correctamente y al mismo nivel (Figura 9a).



Se usaron los dos clones de DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) para transducir células T de ratón previamente activadas. Tras la selección de las células T con puromicina, se estimuló el TCR de manera inespecífica con concanavalina A, y se analizó, mediante técnicas de citometría de flujo, la expresión en la superficie del marcador de activación, CD69. Este análisis demostró que la expresión de DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) provocaba una menor activación de las células T (Figura 9b y c).

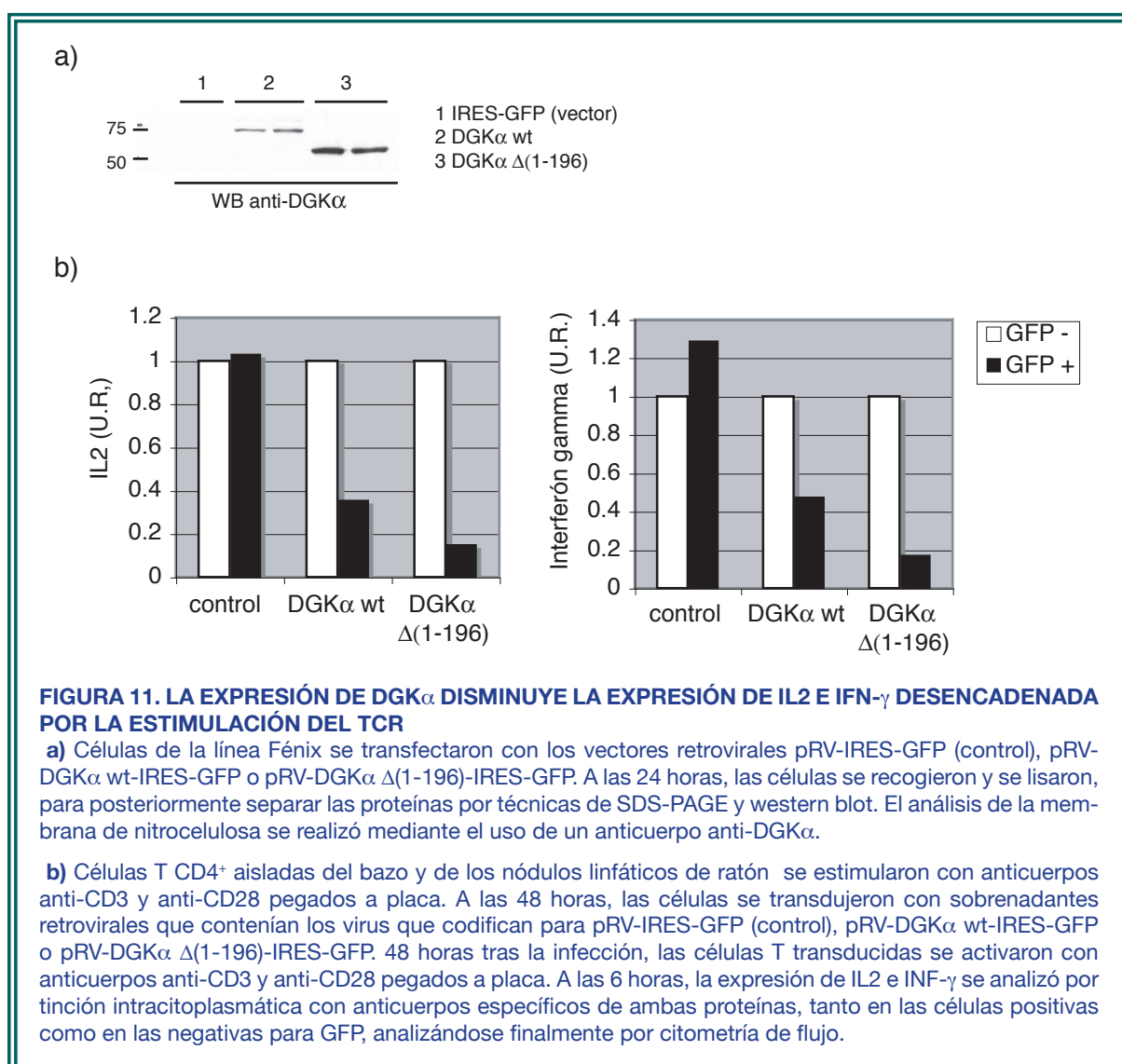
### La expresión de una forma de DGK $\alpha$ constitutivamente activa disminuye la muerte celular desencadenada por el TCR (AICD)

Puesto que DGK $\alpha$  disminuye la muerte celular procedente de la activación de las células T (Alonso, Rodriguez et al. 2005; Alonso, Mazzeo et al. 2006), se analizó la influencia de la expresión de DGK $\alpha\Delta(1-196)$  en la muerte celular tras la activación del TCR (AICD). Para ello se estudió, por técnicas de citometría de flujo, la viabilidad de las células T en respuesta a estimulaciones repetidas del TCR. Se estableció la viabilidad celular en función del tamaño y de la complejidad celular, considerándose a las células más pequeñas y complejas como células no viables. Así, se pudo comprobar cómo la expresión de DGK $\alpha\Delta(1-196)$  aumenta la viabilidad celular tras dos estimulaciones sucesivas de las células T, las cuales sí hacen disminuir la viabilidad celular en el caso del control MSCV, vector vacío (Figura 10).



### La expresión de la forma de DGK $\alpha$ constitutivamente activa disminuye la expresión de IL2 e INF $\gamma$

El DAG y el PA son lípidos responsable de la fisión y fusión de vesículas desde el aparato de Golgi hasta la membrana plasmática (Sprong, van der Sluijs et al. 2001). Para descartar que DGK $\alpha$  pudiera afectar el tráfico vesicular se analizó la expresión de IL2 e interferón gamma (INF $\gamma$ ), proteínas solubles reguladas durante la activación a través del TCR (Nel 2002; Nel and Slaughter 2002). Para llevar a cabo este estudio se desarrolló un vector retroviral bicistrónico que expresaba DGK $\alpha$  wt o DGK $\alpha\Delta(1-196)$ , junto con la proteína verde fluorescente (GFP). Se analizó la expresión de estos nuevos vectores en la línea celular empaquetadora Fénix por medio de western blot y el uso de un anticuerpo específico de DGK $\alpha$  (Figura 11a).



Se usó el sobrenadante de las células Fénix para transducir las células T y se analizó la expresión de IL2 e INF- $\gamma$  desencadenada por la estimulación del TCR, mediante la tinción intracelular con anticuerpos específicos de IL2 e INF- $\gamma$  y el uso de técnicas de citometría de

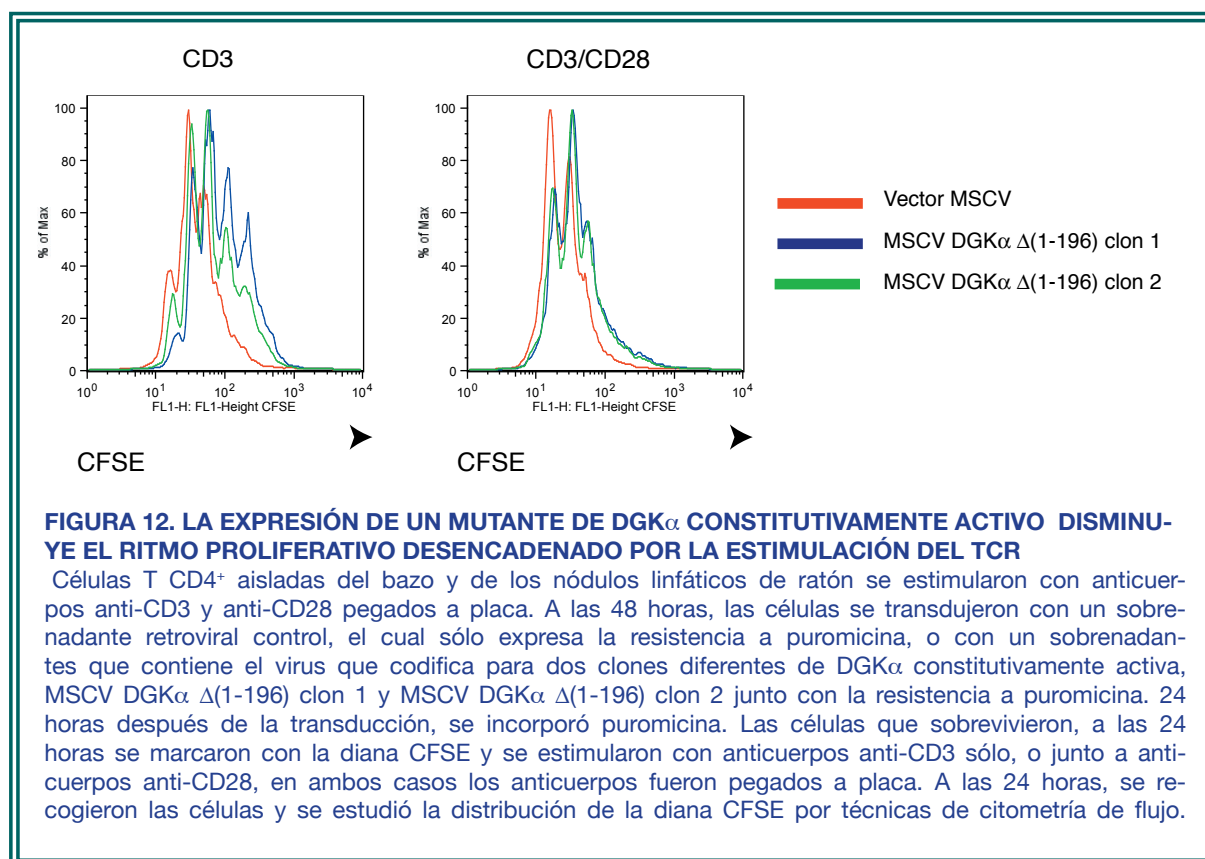
flujo. En el ensayo se usó, en todos los casos, la droga Brefeldina A para desorganizar el aparato de Golgi y con ello bloquear la secreción de las proteínas. El resultado muestra que la expresión tanto de IL2 como INF- $\gamma$  tras la estimulación del TCR disminuyen en presencia de DGK $\alpha$  wt o del mutante de DGK $\alpha$  constitutivamente activo, DGK $\alpha\Delta(1-196)$  (Figura 11b), si bien es más fuerte en presencia de este último. Por lo tanto, la actividad DGK $\alpha$  está afectando la expresión de proteínas en respuesta al TCR.

### *La actividad DGK $\alpha$ influye negativamente en el ritmo proliferativo desencadenado por el TCR*

---

La proteína DGK $\alpha$  es un atenuador de la ruta DAG/RasGRP/Ras/ERK (Sanjuan, Jones et al. 2001; Jones, Sanjuan et al. 2002) pero al mismo tiempo es un regulador positivo en la proliferación a través del receptor de IL2 (Flores, Casaseca et al. 1996; Flores, Jones et al. 1999). Como se ha comprobado, la actividad DGK $\alpha$  regula, tras la activación del TCR, la expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL2 de alta afinidad (IL2r) (Figura 8), el cual, junto con la producción de IL2, da lugar a la proliferación de las células T. Esto datos sugieren que DGK $\alpha$  juega un doble papel, por un lado regula la expresión del receptor de alta afinidad de IL2 y con ello la proliferación de las células T, pero por otro lado, la actividad DGK $\alpha$  es necesaria para proliferar. Para determinar el efecto neto que tiene DGK $\alpha$  en la proliferación mediada por el TCR, se expresó, por medio de técnicas de transducción retroviral, el mutante DGK $\alpha\Delta(1-196)$ , en células T de ratón. Tras la selección de las células que expresan el vector retroviral con puromicina, se estimuló el TCR con anticuerpos anti-CD3 en ausencia o en presencia de la señal coestimuladora CD28. La proliferación celular se midió mediante citometría de flujo por el número de ciclos de división, a través del seguimiento del reparto de la diana fluorescente CFSE entre dos células cuando la célula marcada se divide. El estudio mostró como la expresión de una DGK $\alpha$  constitutivamente activa afecta a la proliferación mediada por el TCR (Figura 12). Cuando la estimulación del TCR se produce en presencia de CD28, la regulación negativa de DGK $\alpha$  se pierde, lo que sugiere que la señal del CD28, cuando se suma a la señal del TCR, podría influir en la regulación de DGK $\alpha$  o de otras proteínas que interfieren con la función de DGK $\alpha$ . Con estos datos nos planteamos estudiar cómo la función de DGK $\alpha$  se puede ver afectada por la regulación de sus dominios conocidos y si otros dominios no estudiados hasta ahora podrían contribuir a la localización subcelular y/ o a la activación de DGK $\alpha$ .





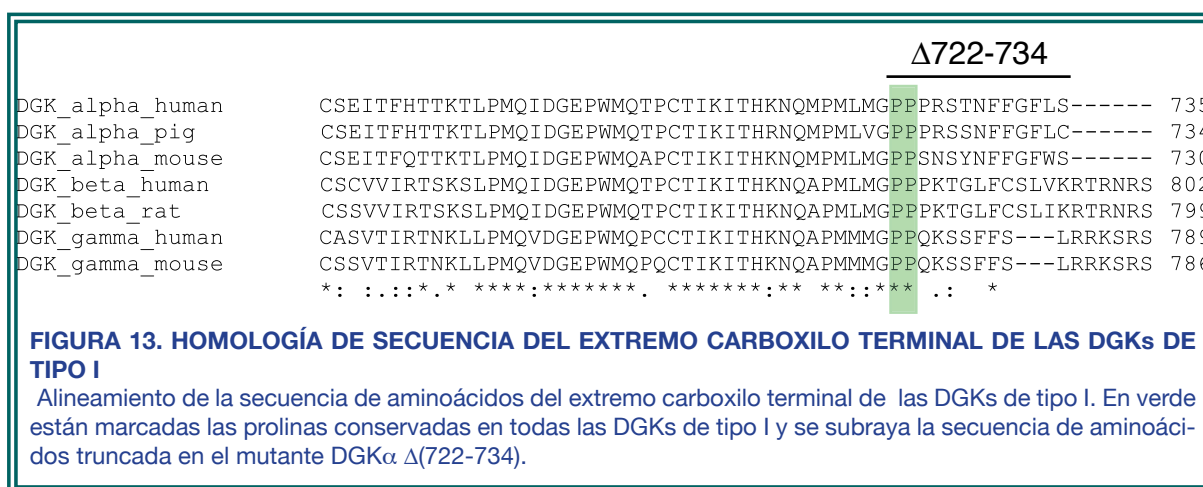
## 2. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE NUEVOS DOMINIOS DE REGULACIÓN DE DGK $\alpha$ QUE DETERMINAN LA LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA

El estudio de los dominios de regulación de la DGK $\alpha$  ha establecido que los dos dominios de unión a Ca<sup>2+</sup> de la proteína, denominados manos de Ca<sup>2+</sup>, constituyen una restricción negativa para que la molécula de DGK $\alpha$  esté presente en la membrana plasmática, donde la proteína encuentra su sustrato (Sanjuan, Jones et al. 2001). Esto constituye el principal mecanismo de regulación de la proteína, ya que cuando se retiran estos dominios obtenemos un mutante de DGK $\alpha$ , GFP-DGK $\alpha$  $\Delta$ (1-196), que posee mayor actividad catalítica y que se asocia de manera constitutiva a la membrana plasmática (Sanjuan, Jones et al. 2001). Por tanto, consideramos a este mutante como un mutante con alta afinidad por la membrana, en contraposición a la forma silvestre de DGK $\alpha$  que consideramos de baja afinidad. Nuestro interés se centró en determinar qué era importante para la localización de DGK $\alpha$  en la membrana plasmática cuando se pierde la restricción negativa de las manos de Ca<sup>2+</sup>.

### Búsqueda de nuevos dominios de regulación de las DGKs de tipo I

En el caso de DGK $\beta$ , que es una DGK de tipo I constitutivamente asociada a la membrana plasmática, está descrita la importancia del extremo carboxilo terminal (C-terminal)

de la proteína en su localización (Caricasole, Bettini et al. 2002). Para determinar si el extremo C-terminal estaba conservado en otras DGKs que forman parte de la familia de las DGKs de tipo I, se llevó a cabo un estudio de homología de la secuencia del extremo C-terminal en las DGKs de tipo I conocidas. El estudio reveló un alto grado de conservación de la secuencia aminoacídica del extremo C-terminal entre todas las DGKs (Figura 13). Dentro de éste, en la parte final del extremo, se localizan una serie de prolinas conservadas, seguidas por una serie de aminoácidos que alterna aminoácidos sin carga con otros cargados positivamente. El hecho de que la carga positiva de estos aminoácidos pudiese contribuir a la estabilidad de la proteína en la membrana plasmática nos llevó a estudiar la posible contribución del extremo C-terminal de DGK $\alpha$  en la localización de la proteína en la membrana

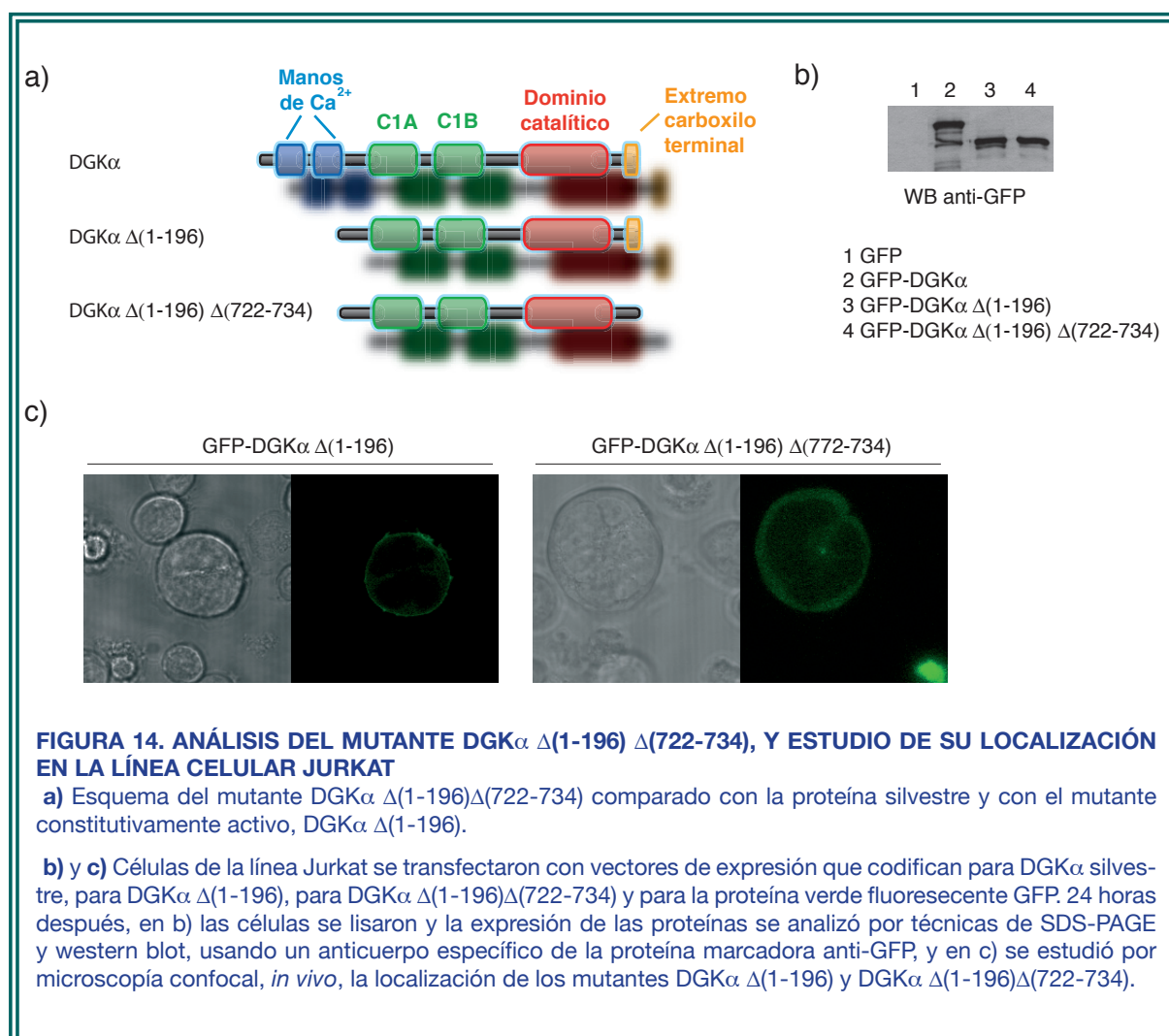


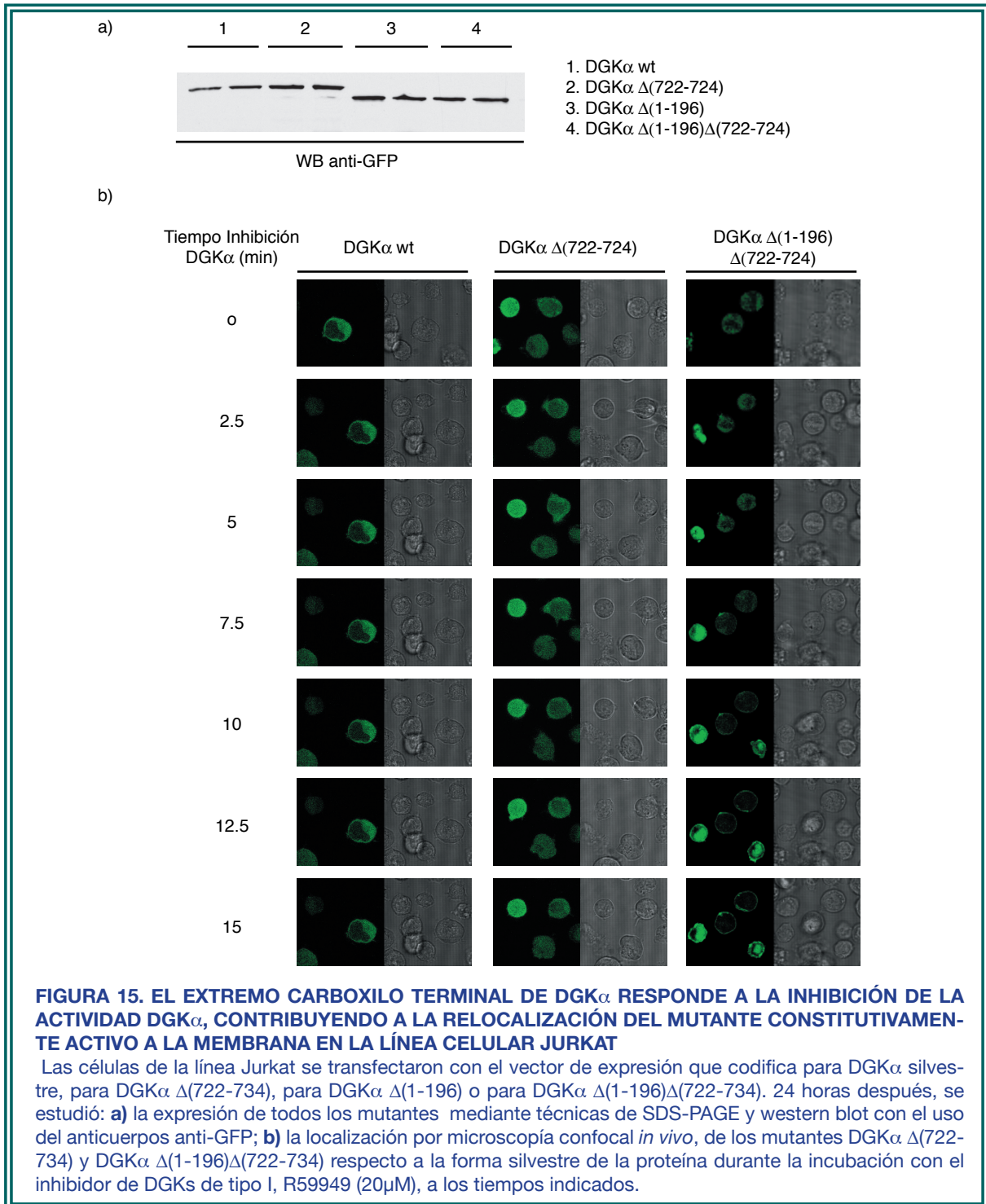
***El extremo C-terminal de DGK $\alpha$  es necesario para la localización de la proteína en la membrana plasmática***

Para analizar el papel del extremo C-terminal de DGK $\alpha$  en la localización de la proteína se generó un mutante a partir de la forma de alta afinidad por la membrana plasmática de DGK $\alpha$  (GFP-DGK $\alpha$  $\Delta$ (1-196)), en el que se truncaron los últimos trece aminoácidos generando el mutante GFP-DGK $\alpha$  $\Delta$ (1-196) $\Delta$ (722-734) (Figura 14a). La transfección del mutante en la línea celular Jurkat reveló su correcta expresión (Figura 14b). Se estudió, mediante técnicas de microscopía confocal, si la ausencia de la secuencia C-terminal afectaba a la localización en la membrana del mutante de alta afinidad GFP-DGK $\alpha$  $\Delta$ (1-196), observándose como la secuencia del extremo C-terminal de DGK $\alpha$  es determinante para la localización de la proteína en la membrana plasmática (Figura 14c).

La actividad DGK $\alpha$  determina la localización de DGK $\alpha$  en la membrana plasmática. La expresión de un mutante catalíticamente inactivo de DGK $\alpha$  o la inhibición de la actividad hace que la movilización de DGK $\alpha$  desde el citosol a la membrana en respuesta al TCR sea, en lugar de transitoria, estable. Se ha propuesto que esta regulación depende de la acción del PA sobre las manos de Ca<sup>2+</sup>, que daría lugar a una conformación cerrada de la proteína (Sanjuan, Jones et al. 2001). Así, el mutante que tiene truncados estos dominios, GFP-DGK $\alpha$

$\Delta(1-196)$ , está constitutivamente asociado a la membrana (Sanjuan, Jones et al. 2001). Puesto que GFP-DGK $\alpha$   $\Delta(1-196)$  pierde su localización cuando el extremo C-terminal no está en la proteína (Figura 14c), se estudió si la actividad DGK $\alpha$  estaba afectando negativamente a la localización de la proteína por otro dominio diferente a las manos de Ca<sup>2+</sup>. Con este fin, se expresaron en las células Jurkat la proteína GFP-DGK $\alpha$  wt, un mutante de truncación del extremo C-terminal, GFP-DGK $\alpha$   $\Delta(722-734)$ , y el mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta(1-196)\Delta(722-734)$  (Figura 15a) y se analizó su localización subcelular por microscopía confocal, en presencia o ausencia de un inhibidor de la actividad DGK $\alpha$ , R59949 (Figura 15b). Se observó que la inhibición de la actividad DGK $\alpha$  estabilizaba en la membrana al mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta(1-196)\Delta(722-734)$ , pero no a ninguna de las formas de la DGK $\alpha$  que conservan la restricción de las manos de Ca<sup>2+</sup>. Este resultado sugiere que, mientras el extremo amino terminal de DGK $\alpha$  lleva a cabo una restricción negativa de la proteína, el extremo C-terminal estabiliza a la proteína en la membrana por un mecanismo que depende de la producción de PA. Así, en presencia del flujo de Ca<sup>2+</sup> que provoca la conformación abierta de DGK $\alpha$ , la producción de PA contribuye a la estabilización de la proteína en la membrana, pero cuando desaparece el flujo de Ca<sup>2+</sup> contribuye a la conformación cerrada y a su regreso al citosol.

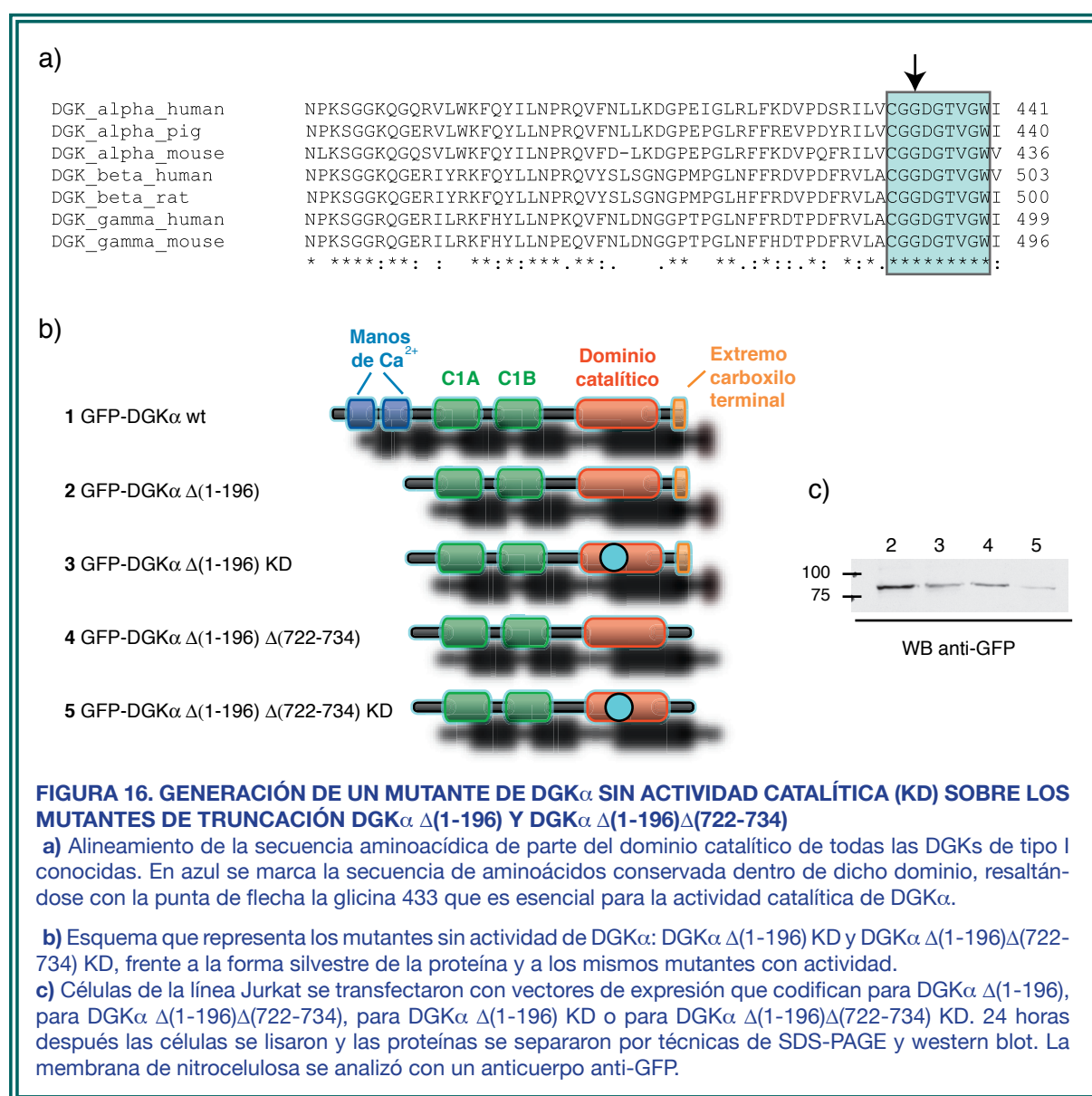


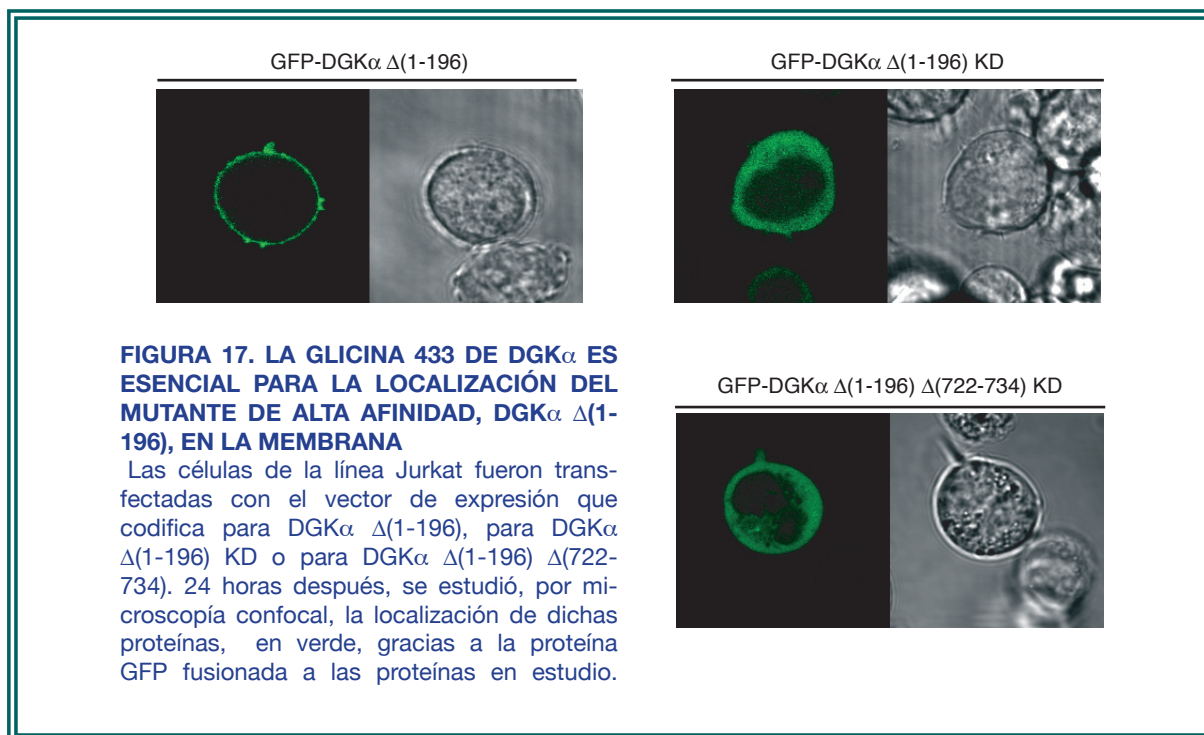


***Papel de la actividad DGK $\alpha$  en la localización del mutante de alta afinidad GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) en la membrana plasmática***

Diversos estudios han demostrado que la actividad DGK $\alpha$  es esencial para la localización de la proteína en la membrana plasmática (Sanjuan, Jones et al. 2001). Para determinar si la actividad DGK $\alpha$  afecta a la localización en la membrana del mutante de alta afinidad, GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196), se generó la mutación que da lugar a la pérdida de actividad

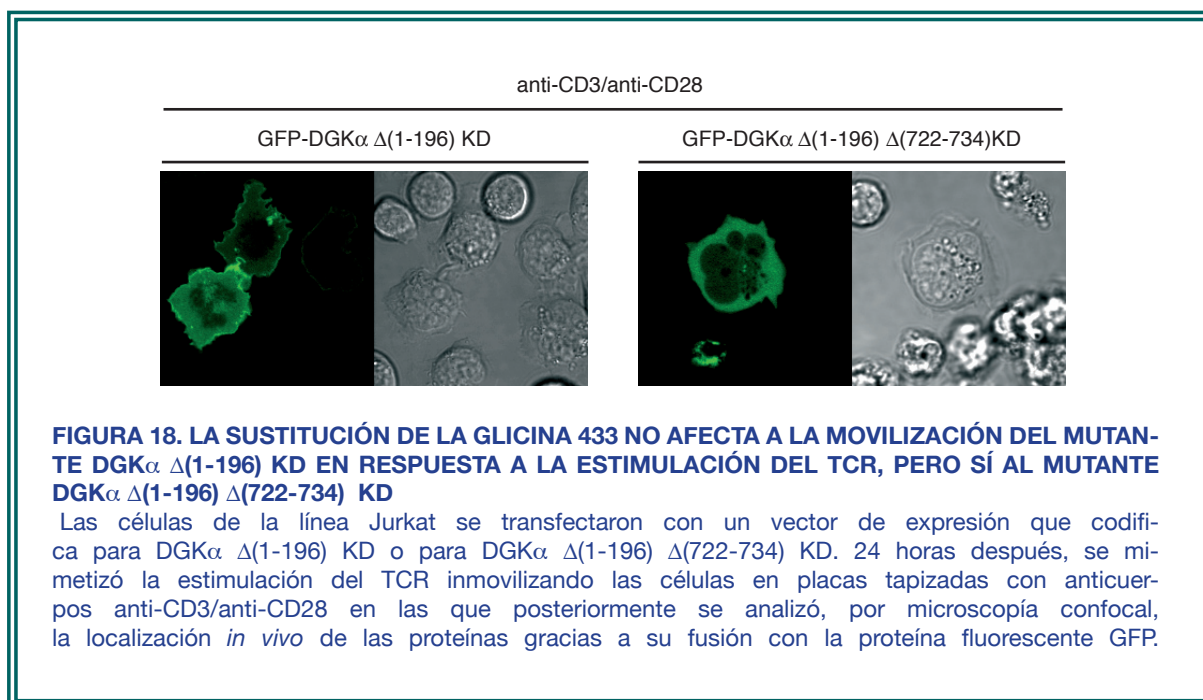
de la proteína (KD) y que consiste en la sustitución, en la secuencia de aminoácidos GGDG, conservada dentro del dominio catalítico de la proteína, de la segunda glicina, situada en la posición 433 de la secuencia completa de la proteína, por alanina (Figura 16a). Esta sustitución se realizó tanto en GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) como en GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) $\Delta$ (722-734) (Figura 16b). Ambas proteínas se transfectaron en la línea celular Jurkat para analizar su expresión (Figura 16c). El análisis por microscopía confocal reveló que tanto GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) $\Delta$ (722-734) KD como GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) KD tenían afectada su afinidad por la membrana (Figura 17), poniendo de manifiesto que la glicina 433 no sólo es importante para la actividad de la proteína, sino que también contribuye en la localización en la membrana del mutante de alta afinidad GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196).





*El mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) KD posee los dominios necesarios para la movilización de la DGK $\alpha$  desde el citosol a la membrana plasmática en respuesta a la estimulación del TCR*

La proteína DGK $\alpha$  se moviliza a la membrana plasmática en respuesta al TCR. Dado que el mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) KD pierde su estabilización en dicha membrana, se determinó si la glicina 433, además de estar implicada en la localización de DGK $\alpha$  de alta afinidad por la membrana, interfería en su movilización en respuesta al TCR. Con este fin, se estudió la movilización del mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) KD en respuesta a dicho receptor. Para ello, se transfectaron las células de la línea celular Jurkat con el mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) KD y se analizó, por técnicas de microscopía confocal, la localización de la proteína en respuesta a la estimulación con anticuerpos específicos anti-CD3 y anti-CD28 pegados a placa. El resultado obtenido permitió determinar que la sustitución de la glicina 433 por alanina, que afecta a la localización en la membrana del mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196), no afecta a la movilización de la proteína en respuesta al TCR (Figura 18). Esto sugiere que existen diferentes mecanismos que contribuyen a la estabilización de DGK $\alpha$  en la membrana plasmática y que, de alguna manera, unos compensan la ausencia de los otros.

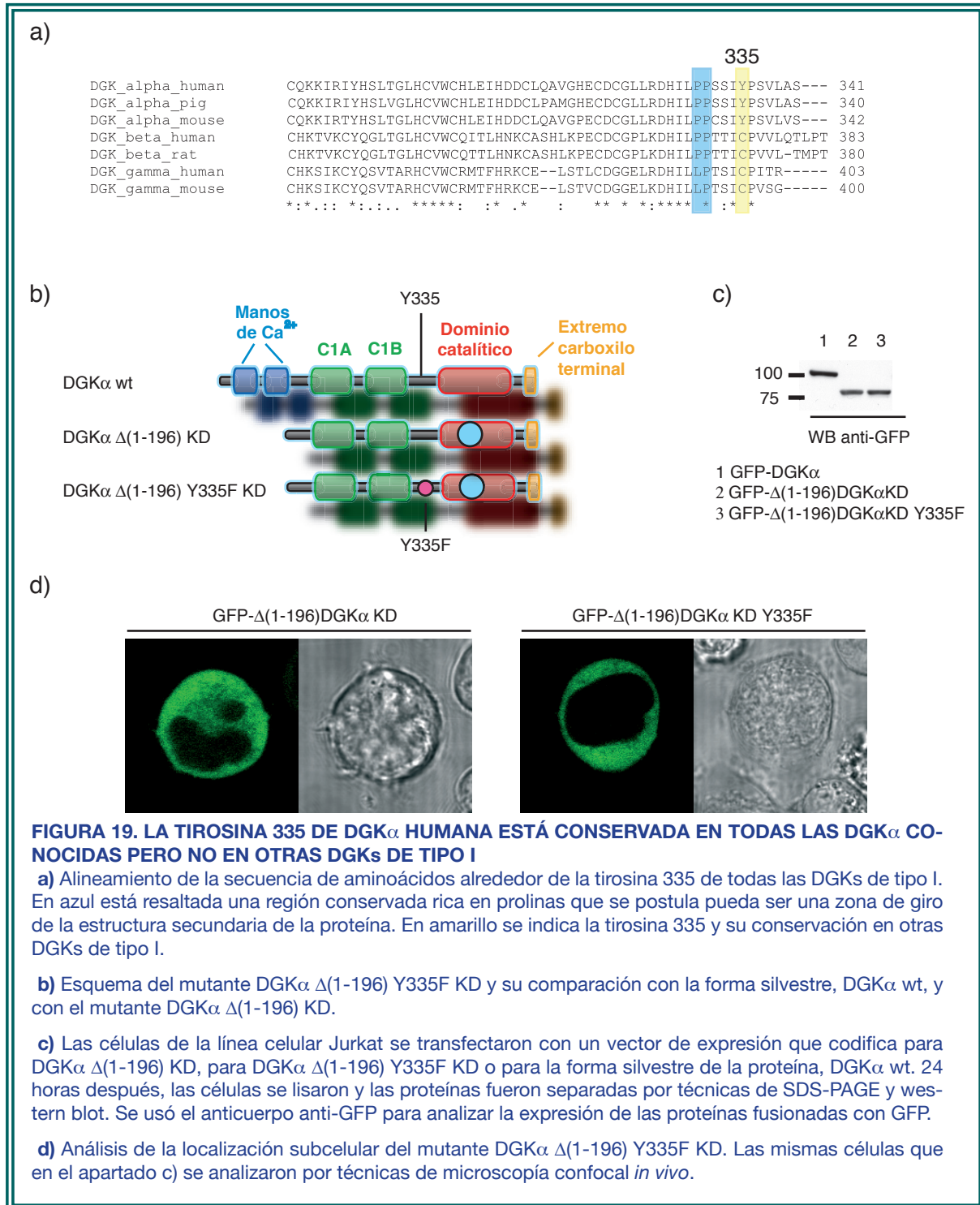


### 3. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DE DGK $\alpha$ POR TIROSINAS QUINASAS DE LA FAMILIA SRC

La proteína DGK $\alpha$  es capaz de migrar a la membrana plasmática por un mecanismo que depende de Ca<sup>2+</sup> y de la actividad de las tirosinas quinasas (Sanjuan, Jones et al. 2001). La activación de DGK $\alpha$  a través de tirosinas quinasas de la familia Src pone de manifiesto la importancia de éstas en la activación y función de la proteína (Baldanzi, Cutrupi et al. 2002; Baldanzi, Mitola et al. 2004; Bacchiocchi, Baldanzi et al. 2005). Aunque al comienzo de este trabajo no se conocía ninguna fosforilación directa de la proteína, si se proponía que la tirosina 335 pudiera tener un papel importante en el mecanismo de activación en respuesta al HGF (Cutrupi, Baldanzi et al. 2000; Baldanzi, Cutrupi et al. 2002). La tirosina 335 de DGK $\alpha$  se encuentra en una región muy conservada dentro de la secuencia primaria de todos los ortólogos de DGK $\alpha$  conocidos (humano, ratón y cerdo), pero no así en DGK $\beta$  o en DGK $\gamma$  (Figura 19a), lo que sugiere cierta especificidad funcional de dicho residuo.

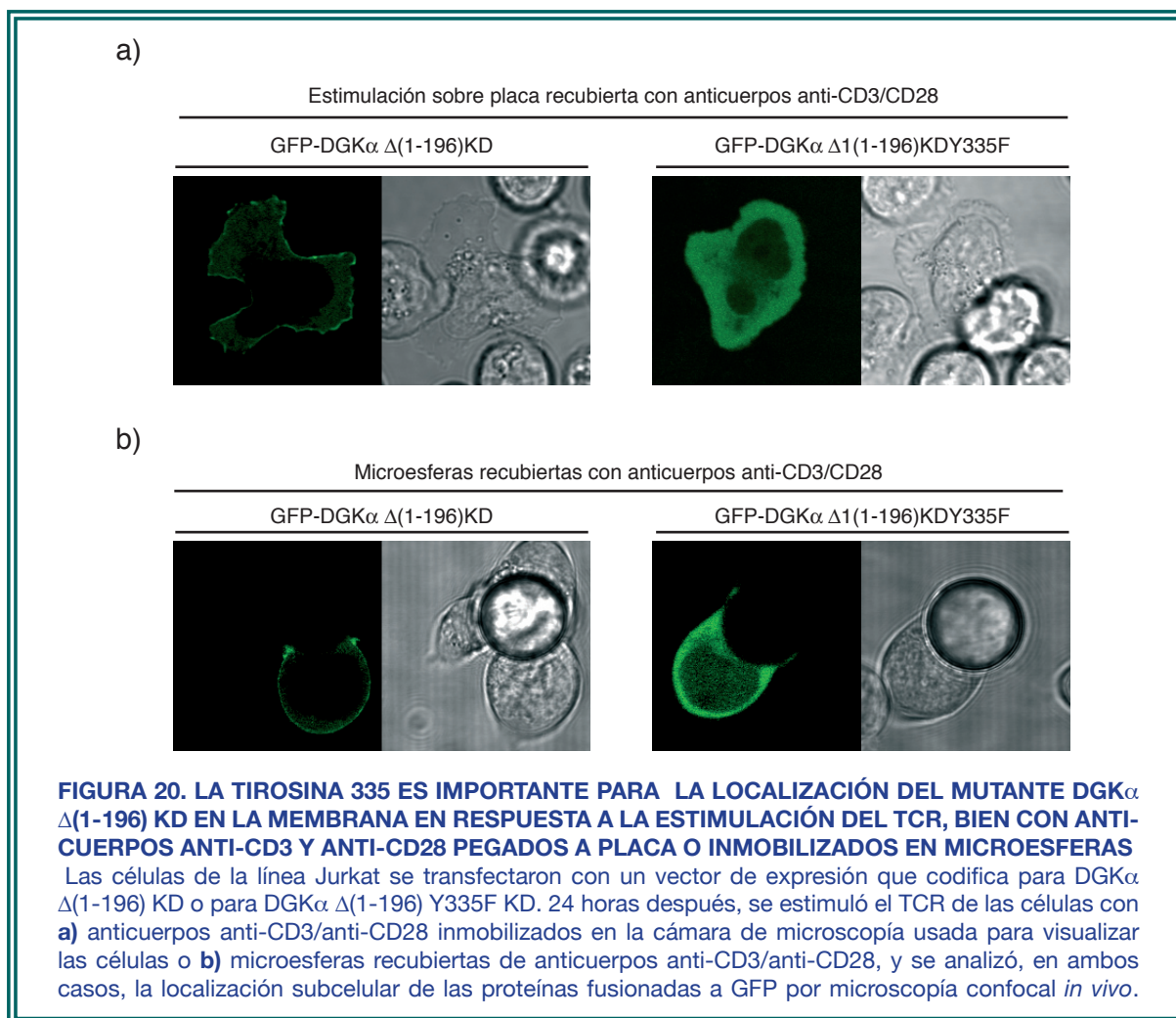
#### La tirosina 335 de DGK $\alpha$ es necesaria para la movilización del mutante GFP-DGK $\alpha$ $\Delta$ (1-196) KD en respuesta a la estimulación del TCR

Para determinar el papel que tiene la tirosina 335 en la movilización del mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) KD desde el citosol a la membrana, se sustituyó, mediante mutagénesis dirigida, dicha tirosina por fenilalanina, impidiendo con ello la fosforilación, y generando un mutante denominado DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) KD Y335F (Figura 19b). La expresión del nuevo mutante en la línea celular Jurkat reveló que ésta se produce de manera correcta (Figura 19c) y que la tirosina 335 no afecta a la localización citosólica del mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) KD (Figura 19d).

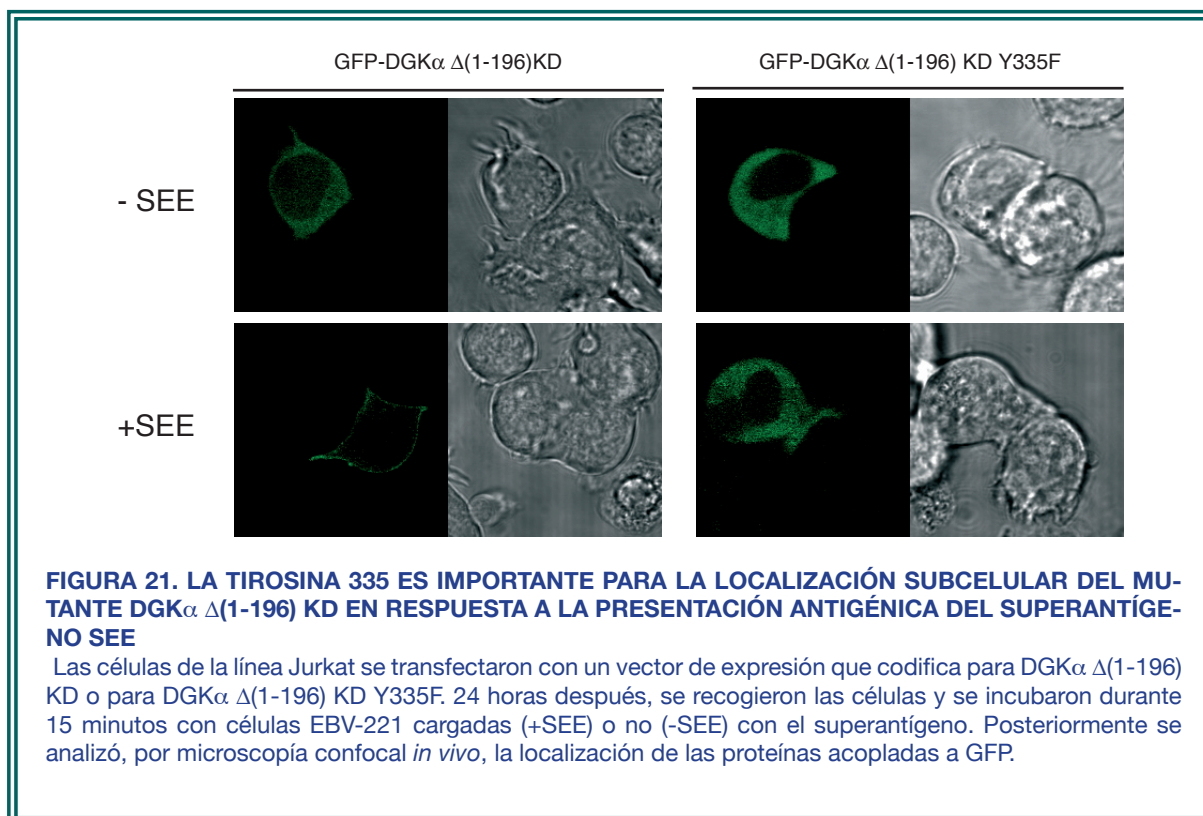


Se analizó, por microscopía confocal, la movilización del mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) KD Y335F frente a GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) KD en respuesta a la estimulación del TCR, mediante el uso anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 inmobilizados en placa (Figura 20a), o por medio de bolas de sefarosa recubiertas por los mismos anticuerpos (Figura 20b). El resultado mostró cómo, ante ambos estímulos, el mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) KD Y335F no puede movilizarse a la membrana plasmática.





Para confirmar que la translocación del mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) KD dependía de la tirosina 335, se analizó, en células Jurkat, la movilización de la pareja de mutantes en presencia o ausencia de un estímulo fisiológico como es la presentación antigénica del superantígeno (SEE de *Staphylococcus*) a través de las células presentadoras de antígeno EBV-221 (Figura 21). Así, se pudo observar que la ausencia de la tirosina 335 impedía la movilización de GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) KD desde el citosol a la membrana plasmática, demostrando la importancia de dicho residuo en la movilización de DGK $\alpha$  a partir de la estimulación del TCR.

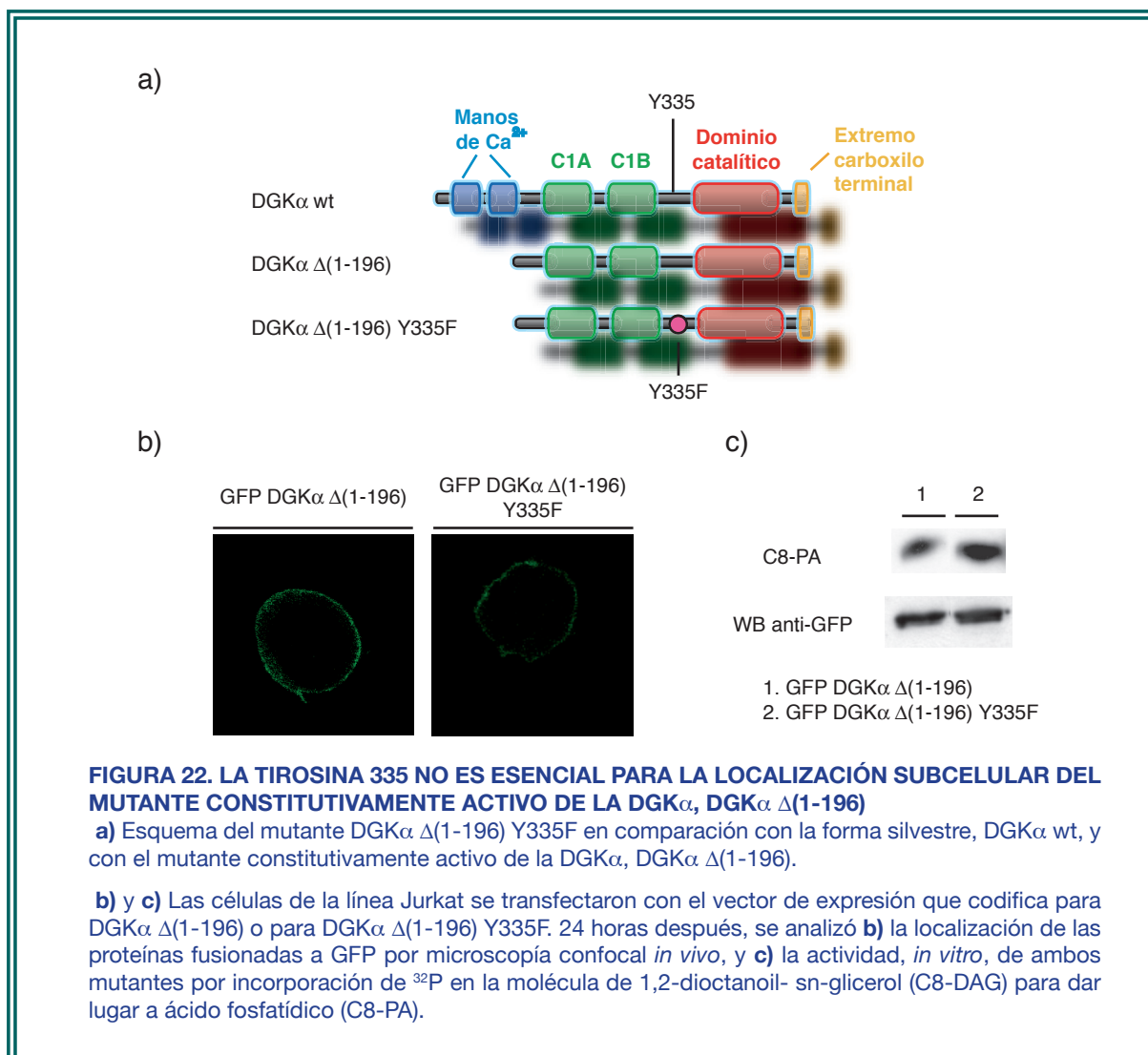


***La tirosina 335 no afecta a la localización en la membrana plasmática del mutante constitutivamente activo de DGK $\alpha$ , GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196)***

Los experimentos llevados a cabo con el mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) KD Y335F demostraron la importancia de la tirosina 335 en la movilización de DGK $\alpha$  desde el citosol a la membrana. Para determinar si este residuo afecta a la afinidad por la membrana del mutante constitutivamente activo de DGK $\alpha$ , GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196), se realizó, mediante mutagénesis dirigida, la sustitución de la tirosina 335 por fenilalanina en este mutante (Figura 22a). Se analizó, por microscopía confocal, la localización de los mutantes GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) y GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) Y335F en la línea celular Jurkat, y se comprobó que ambos mutantes poseen una alta afinidad por la membrana, no viéndose afectada, por tanto, la localización del mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) por la presencia o ausencia de la tirosina 335 (Figura 22b). Dado que la tirosina 335 se encuentra en una posible zona de giro de la proteína entre los dominios C1 y el dominio catalítico, se estudió, mediante ensayos de actividad DGK por incorporación de  $^{32}\text{P}$  en la molécula de DAG, si la tirosina 335 afectaba a la actividad de GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196). La separación de los lípidos generados mediante cromatografía en capa fina determinó que no había diferencias en la actividad DGK $\alpha$  entre GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) y GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196) Y335F (Figura 22c).

Estos resultados sugieren que la tirosina 335 no juega un papel importante en la localización de DGK $\alpha$  en la membrana cuando esta pierde la restricción de las manos de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero sí es importante para estabilizarse en la membrana en respuesta al TCR cuando el

mutante de alta afinidad pierde la función estabilizadora del dominio catalítico. Sin embargo, puesto que estos análisis se llevaron a cabo en ausencia de la restricción negativa que las manos de  $\text{Ca}^{2+}$ , no se puede descartar que la fosforilación en la tirosina 335 actúe de manera coordinada con las manos de  $\text{Ca}^{2+}$  en el mecanismo de estabilización de la proteína en la membrana plasmática.



**FIGURA 22. LA TIROSINA 335 NO ES ESENCIAL PARA LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DEL MUTANTE CONSTITUTIVAMENTE ACTIVO DE LA DGK $\alpha$ , DGK $\alpha$   $\Delta(1-196)$**

**a)** Esquema del mutante DGK $\alpha$   $\Delta(1-196)$  Y335F en comparación con la forma silvestre, DGK $\alpha$  wt, y con el mutante constitutivamente activo de la DGK $\alpha$ , DGK $\alpha$   $\Delta(1-196)$ .

**b)** y **c)** Las células de la línea Jurkat se transfectaron con el vector de expresión que codifica para DGK $\alpha$   $\Delta(1-196)$  o para DGK $\alpha$   $\Delta(1-196)$  Y335F. 24 horas después, se analizó **b)** la localización de las proteínas fusionadas a GFP por microscopía confocal *in vivo*, y **c)** la actividad, *in vitro*, de ambos mutantes por incorporación de <sup>32</sup>P en la molécula de 1,2-dioctanoil- sn-glicerol (C8-DAG) para dar lugar a ácido fosfatídico (C8-PA).

### La proteína DGK $\alpha$ se fosforila en tirosina tras la activación del TCR

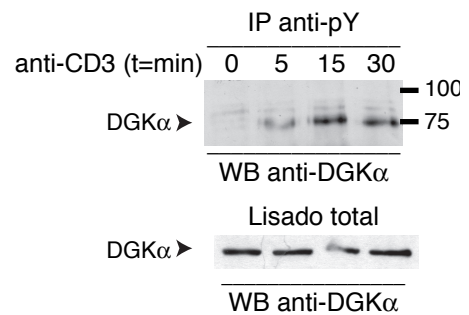
Los resultados obtenidos con el mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta(1-196)$ KD sugieren que la tirosina 335 es importante en la movilización de DGK $\alpha$  en respuesta al TCR, lo que refuerza la hipótesis de que DGK $\alpha$  se recluta a la membrana plasmática en respuesta a este estímulo, por un mecanismo que depende de la acción del flujo  $\text{Ca}^{2+}$  y de las tirosinas quinasas activadas.

Para comprobar si la proteína DGK $\alpha$  endógena se fosforila en respuesta a la estimulación del TCR, se mimetizó, en células de la línea Jurkat, la activación del TCR con anticuerpos

anti-CD3. Tras la inmunoprecipitación de las proteínas fosforiladas en tirosina, se estudió la presencia de DGK $\alpha$  en el inmunoprecipitado, determinándose que sólo en respuesta a la estimulación del TCR y de una manera rápida, tras cinco minutos de estímulo, es posible observar la presencia de la proteína en el inmunoprecipitado (Figura 23). Sin embargo, este resultado no permitió discriminar entre fosforilación directa de la proteína y/o la asociación a proteínas fosforiladas en tirosina.

**FIGURA 23. LA PROTEÍNA DGK $\alpha$  ENDÓGENA CO-INMUNOPRECIPITA CON PROTEÍNAS FOSFORILADAS EN TIROSINA EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DEL TCR**

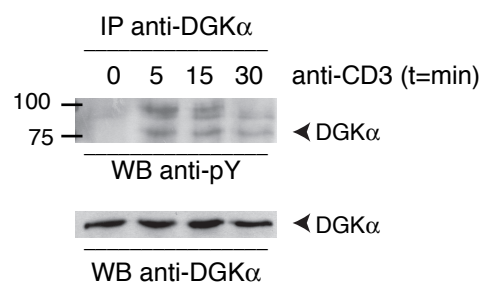
Las células de la línea Jurkat deplecionadas durante 2 horas se estimularon con anticuerpos anti-CD3 (1  $\mu$ g/ml) a los tiempos indicados. Posteriormente las células se lisaron y, tras separar la fracción particulada del sobrenadante, se inmunoprecipitaron de este último las proteínas fosforiladas en tirosina mediante el uso de un anticuerpo específico de proteínas fosforiladas en este residuo (anti-pY). Se separaron, por técnicas de SDS-PAGE y western blot, las proteínas del inmunoprecipitado y parte del lisado total de las muestras (30  $\mu$ g), y se analizó la presencia de DGK $\alpha$  mediante el uso de un anticuerpo específico frente a la proteína (anti-DGK $\alpha$ ).



Está descrito que DGK $\alpha$  se activa en respuesta al factor de crecimiento hepático (HGF) por asociación a proteínas fosforiladas en tirosina como Src, pero sin fosforilación directa de la propia DGK $\alpha$  (Cutrupi, Baldanzi et al. 2000). Para discriminar entre fosforilación directa de DGK $\alpha$  y asociación a proteínas fosforiladas en respuesta al TCR, se estimuló dicho receptor con anticuerpos anti-CD3, y se inmunoprecipitó DGK $\alpha$  usando una mezcla de tres anticuerpos monoclonales que reconocen tres epítopos diferentes de la proteína. El inmunoprecipitado de DGK $\alpha$  se analizó mediante técnicas de western blot con anticuerpos que reconocen proteínas fosforiladas en tirosina, observándose que la proteína DGK $\alpha$  se fosforila en tirosina en respuesta a la estimulación del TCR y que esta fosforilación, además de ser estequiométricamente baja, es rápida y transitoria, alcanzándose su máximo entre los cinco y los quince minutos, para decaer a los treinta (Figura 24).

**FIGURA 24. LA PROTEÍNA DGK $\alpha$  ENDÓGENA SE FOSFORILA EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DEL TCR**

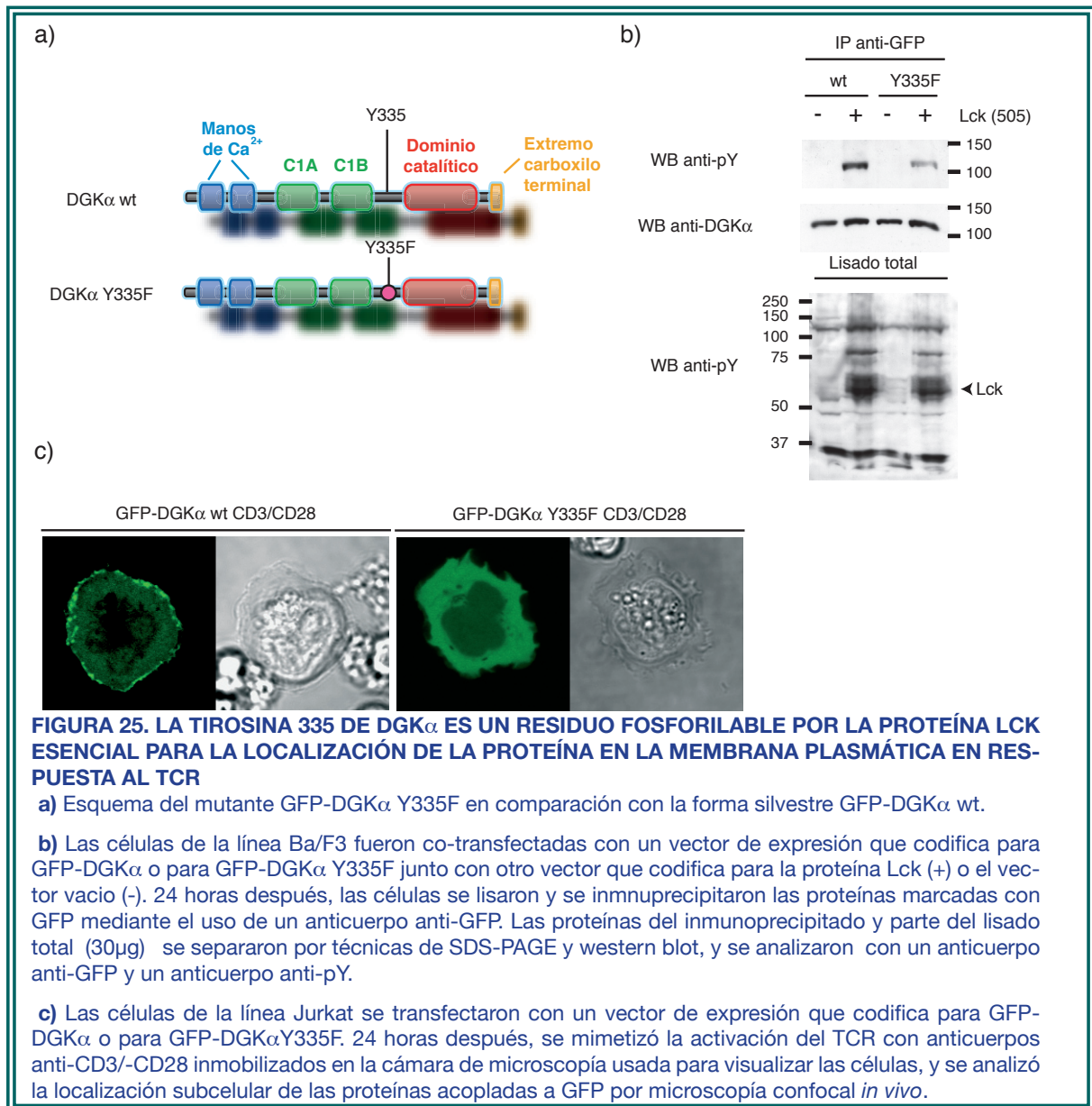
Las células de la línea Jurkat, deplecionadas durante 2 horas, fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3 (1  $\mu$ g/ml) a los tiempos indicados. Las células se lisaron y, tras separar la fracción particulada del sobrenadante, se inmunoprecipitó de este último la proteína DGK $\alpha$  mediante el uso de un anticuerpo específico de la proteína. Tras la inmunoprecipitación, se separaron las proteínas del inmunoprecipitado y parte del lisado total (30  $\mu$ g) por técnicas de SDS-PAGE y western blot. La membrana de nitrocelulosa se analizó con un anticuerpo anti-pY para analizar la presencia de las proteínas fosforiladas, y con un anticuerpo anti-DGK $\alpha$ .



### ***La tirosina quinasa Lck, fosforila a DGK $\alpha$ en la tirosina 335 para estabilizarla en la membrana plasmática en respuesta al TCR***

Los resultados obtenidos con los mutantes de DGK $\alpha$  en los que se sustituyó la tirosina 335 por fenilalanina demuestran que este residuo es importante para la movilización de la proteína en respuesta a la estimulación del TCR. Estos datos, junto con la fosforilación de la proteína endógena, postulan que esta tirosina puede ser importante para la movilización de la DGK $\alpha$  desde el citosol a la membrana plasmática. Dado que DGK $\alpha$  se activa principalmente en respuesta a la activación de las tirosinaa quinasas de la familia Src, el estudio se enfocó en el papel que juega esta familia en la activación de DGK $\alpha$  en respuesta al TCR. Lck y Fyn son los dos únicos miembros de la familia de Src quinasas activados en respuesta a dicho receptor, siendo Lck de la que mayor importancia se ha descrito. Para definir el posible papel de la tirosina 335 en el mecanismo de activación de DGK $\alpha$  por Lck, se realizó un mutante de sustitución de la tirosina 335 por fenilalanina sobre la proteína de fusión GFP-DGK $\alpha$  (Figura 25a). En primer lugar se analizó el nivel de fosforilación de dicho mutante en presencia de Lck, para lo cual se usaron las células de la línea Ba/F3, que es una línea proB que no expresa ni Fyn ni Lck, aunque sí otros miembros de la familia Src como Lyn o Blk. En estas células, se transfectaron las construcciones GFP-DGK $\alpha$  wt y el mutante GFP-DGK $\alpha$  Y335F y se analizó la fosforilación de las proteínas expresadas en el lisado total, detectándose un menor nivel de fosforilación del mutante GFP-DGK $\alpha$ Y335F respecto a la forma silvestre (Figura 25b). Este resultado indica que la tirosina 335 es accesible a la tirosina quinasa Lck. Sin embargo, el hecho de que aparezcan otros residuos de tirosina fosforilados en DGK $\alpha$  sugiere que otros residuos pueden estar implicados en el mecanismo de regulación de DGK $\alpha$  a través de Lck.

Para determinar la importancia de la fosforilación en la tirosina 335 en la movilización de DGK $\alpha$  en respuesta al TCR, se estudió la movilización de GFP-DGK $\alpha$  wt y del mutante en fenilalanina en respuesta a dicho receptor. Con este fin, se transfectaron células de la línea Jurkat con vectores de expresión para ambas proteínas y se analizó por microscopía confocal la movilización de la proteína en respuesta a la estimulación del TCR mimetizada con anticuerpos anti-CD3 y anti CD28 pegados a placa. El resultado mostró que, a diferencia de GFP-DGK $\alpha$  wt, el mutante GFP-DGK $\alpha$  Y335F era incapaz de moverse a la membrana plasmática en respuesta al estímulo del TCR (Figura 25c), lo que demuestra que aunque haya otras tirosinas accesibles a la tirosina quinasa Lck, la fosforilación en tirosina 335 es esencial para el mecanismo de movilización de DGK $\alpha$  desde el citosol a la membrana plasmática en respuesta al TCR.



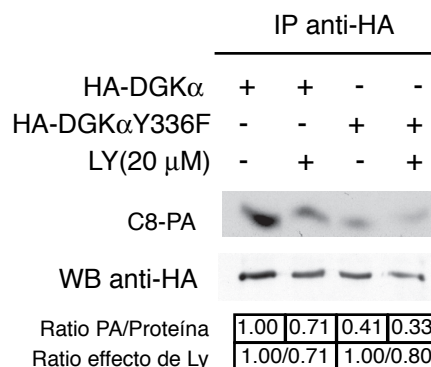
**La tirosina 335 de DGK $\alpha$  es importante para regular la actividad de DGK $\alpha$  por un mecanismo independiente de la actividad de PI3K**

Para que las DGKs lleven a cabo su función es importante tanto su localización en la membrana, como la regulación de la propia actividad catalítica de la proteína. En el caso de DGK $\alpha$ , los lípidos fosforilados en la posición tres del anillo de inositol generados por la PI3K dan lugar a la localización de la proteína en la membrana plasmática, así como a un aumento en la actividad DGK $\alpha$  (Cipres, Carrasco et al. 2003). Como hemos demostrado la sustitución de la tirosina 335 por fenilalanina afecta a la fosforilación de DGK $\alpha$ . Para definir si dicha fosforilación afecta a la actividad de DGK $\alpha$  se transfectaron, en la línea celular Ba/F3, las construcciones que codifican para HA-DGK $\alpha$  wt y para HA-DGK $\alpha$ Y335F. Dichas proteínas se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA y se analizó la actividad de DGK $\alpha$  por incorporación de <sup>32</sup>P a la molécula de DAG y su posterior separación por cromatografía

en capa fina. Se usó el inhibidor de PI3K, LY294002, para analizar si la tirosina 335 tenía alguna función en la activación de DGK $\alpha$  por los lípidos generados por la PI3K. El resultado mostró que el mutante HA-DGK $\alpha$ Y335F pierde un 60% de la actividad respecto a la forma silvestre, sin embargo, ambas proteínas pierden un porcentaje similar de actividad en presencia del inhibidor de PI3K (Figura 26), lo que sugiere que la actividad PI3K actúa de manera independiente de la tirosina 335 en la activación de DGK $\alpha$ .

**FIGURA 26. LA TIROSINA 335 DE DGK $\alpha$  ES NECESARIA PARA LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA POR UN MECANISMO INDEPENDIENTE DE LA PROTEÍNA PI3K**

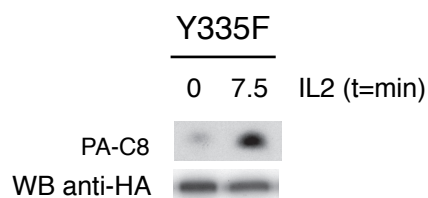
Las células de línea Ba/F3 se transfectaron con un vector de expresión que codifica para HA-DGK $\alpha$  silvestre (wt) o para HA-DGK $\alpha$  Y335F. 24 horas después, las células de ambos casos fueron divididas en dos, incorporando a una de las partes el inhibidor de PI3K, LY294002 (ambos grupos estaban privados de suero). Las células se lisaron, y las proteínas marcadas con HA se inmunoprecipitaron mediante el uso de un anticuerpo anti-HA. Tras la inmunoprecipitación, se realizó el análisis de la actividad DGK en el inmunoprecipitado por medio de la incorporación de  $^{32}$ P en la molécula de 1,2-dioctanoil- sn-glicerol (C8-DAG) para dar ácido fosfatídico (C8-PA), y su posterior separación por una cromatografía en capa fina (TLC). La visualización de los lípidos marcados radiactivamente se realizó por autoradiografía. La presencia de HA-DGK $\alpha$  se analizó en el inmunoprecipitado por técnicas de SDS-PAGE y western blot con un anticuerpo anti-HA.



La proteína DGK $\alpha$  se regula por PI3K en respuesta al receptor de IL2 por un mecanismo independiente del Ca $^{2+}$  (Cipres, Carrasco et al. 2003). Para demostrar que la regulación de DGK $\alpha$  por la tirosina 335 es independiente de la actividad PI3K en respuesta al receptor de IL2, se usó una línea derivada de Ba/F3, que expresa de manera estable la cadena  $\beta$  del receptor de alta afinidad de IL2, en la que se transfectó la construcción que codifica para HA-DGK $\alpha$  Y335F. Tras la estimulación del receptor de IL2, se analizó en los inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-HA, la actividad de DGK $\alpha$  mediante la incorporación de  $^{32}$ P a la molécula de DAG (Figura 27). El incremento de la actividad DGK $\alpha$  indicó que en respuesta a la estimulación del receptor de IL2 la activación de la proteína es independiente de la tirosina 335.

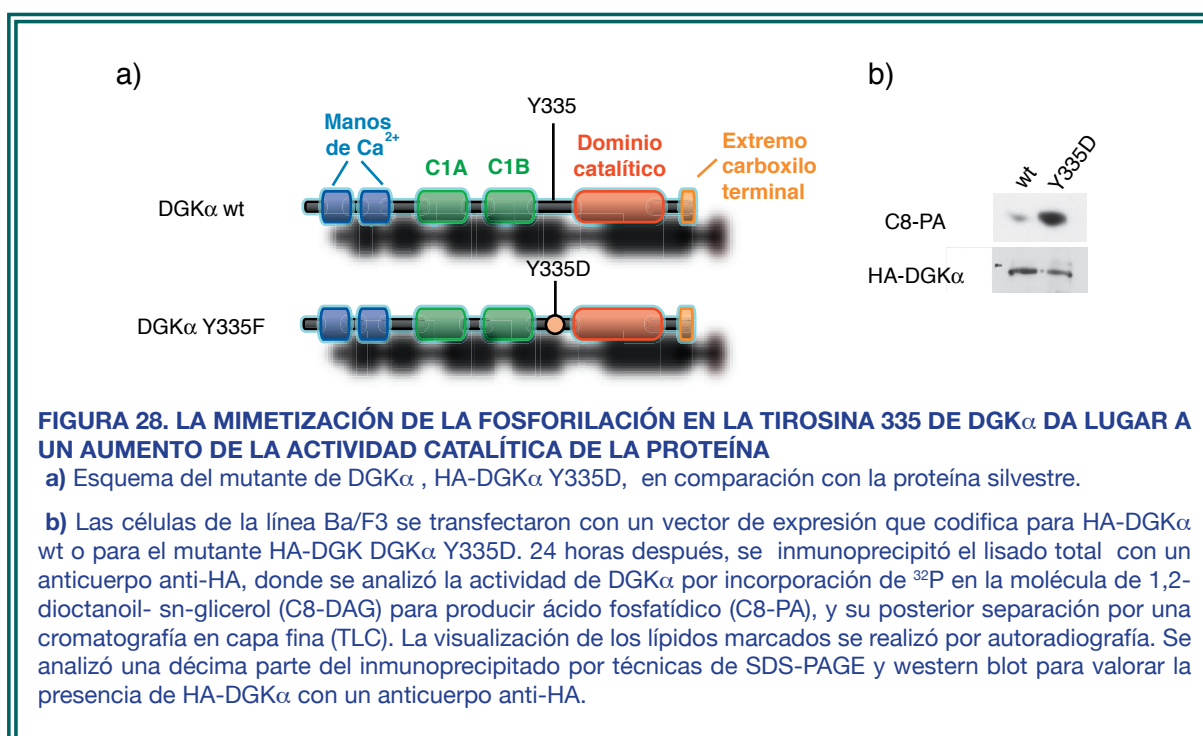
**FIGURA 27. LA TIROSINA 335 DE DGK $\alpha$  NO ES NECESARIA PARA LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA PRODUCIDA EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DEL RECEPTOR DE IL2**

Las células de la línea Ba/F3 se transfectaron con un vector de expresión que codifica para el mutante HA-DGK $\alpha$  Y335F. 24 horas después, las células fueron privadas de suero y 3 horas después estimuladas con IL2 (250 u/ml) durante el tiempo indicado. El lisado celular se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-HA donde se midió la actividad de DGK $\alpha$  por medio de la incorporación de  $^{32}$ P en la molécula de 1,2-dioctanoil- sn-glicerol (C8-DG) para producir ácido fosfatídico (C8-PA) y su posterior separación por una cromatografía en capa fina (TLC). La visualización de los lípidos marcados radiactivamente se realizó por autoradiografía, analizándose también una décima parte del inmunoprecipitado por técnicas de SDS-PAGE y western blot para valorar la presencia de HA-DGK $\alpha$  con un anticuerpo anti-HA.



### **La mimetización de la fosforilación de DGK $\alpha$ en la tirosina 335 da lugar al aumento de la actividad catalítica de la proteína**

Los resultados de la actividad de DGK $\alpha$  obtenidos en células Ba/F3 demuestran la importancia de la tirosina 335 en la regulación de dicha actividad. En estas condiciones fue imposible detectar la fosforilación de la proteína, lo cual, no permitió establecer claramente la relación entre fosforilación directa y aumento de la actividad de DGK $\alpha$ . La mimetización de la fosforilación de una proteína, ya sea en un residuo de tirosina o en un residuo de serina, permite estudiar el efecto de ésta en la función de la proteína (Santos, Carrasco et al. 2002; Diaz-Flores, Siliceo et al. 2003). Para mimetizar la fosforilación se intercambió el aminoácido de interés por el aminoácido aspártico cuya carga negativa se asemeja a la carga negativa que introduce el fosfato en la proteína fosforilada. Partiendo de este punto se generó, mediante mutagénesis dirigida, en la proteína HA-DGK $\alpha$  wt la sustitución de la tirosina 335 por aspártico (Figura 28a), y se analizó tanto su expresión en las células Ba/F3 como su actividad enzimática comparándola con la proteína silvestre (Figura 28b). El resultado obtenido mostró que la actividad DGK $\alpha$  del mutante en aspártico de DGK $\alpha$  (HA-DGK $\alpha$ Y335D) es mayor que la de la enzima silvestre. Esto sugiere que la carga negativa que proporciona el fosfato a la tirosina cuando es fosforilada favorece la actividad catalítica de la misma.

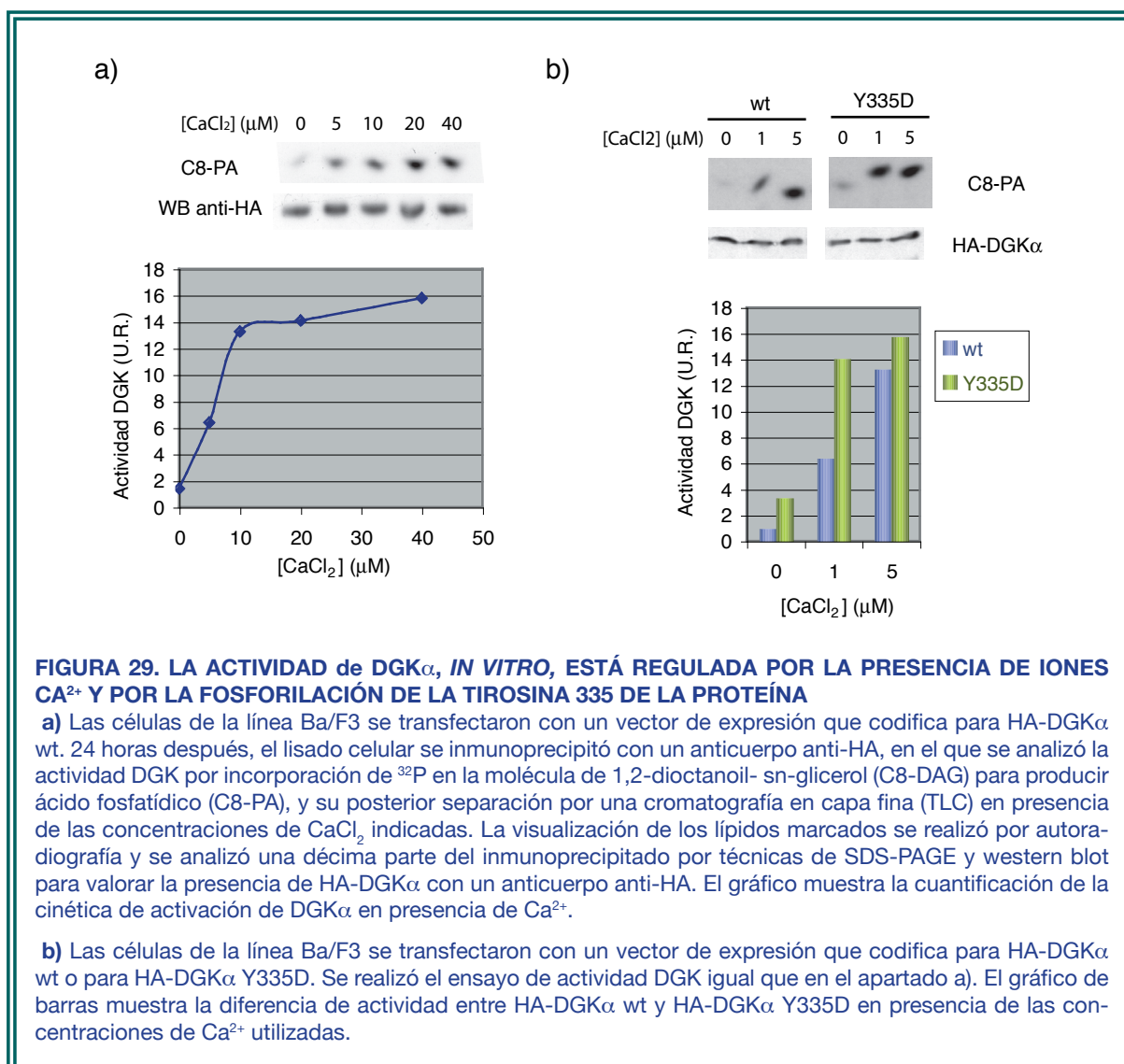


### **La tirosina 335 y el Ca $^{2+}$ actúan de manera coordinada en el aumento de la actividad de DGK $\alpha$**

Las DGKs de tipo I son capaces de unir, con distinta afinidad, iones Ca $^{2+}$  a través de los dominios denominados manos de Ca $^{2+}$  (Yamada, Sakane et al. 1997). Para estudiar el papel del Ca $^{2+}$  en la activación de DGK $\alpha$ , se realizó un ensayo para medir la actividad



catalítica de la proteína en presencia de una concentración creciente de dicho ión. Para ello, se transfectaron las células Ba/F3 con un vector de expresión que codifica para la proteína HA-DGK $\alpha$  wt. Estas células se lisaron y se inmunoprecipitó la proteína con anticuerpos anti-HA para después realizar un ensayo de actividad DGK en presencia de concentraciones crecientes de CaCl $_2$ . El resultado demostró que los iones de Ca $^{2+}$  aumentan la actividad DGK $\alpha$  y que ésta sigue una cinética michaeliana (Figura 29a).



En el caso de DGK $\alpha$ , la acción coordinada del Ca $^{2+}$  y de las tirosinas quinasas es la encargada de la movilización de la proteína a la membrana plasmática. Para establecer si existía alguna relación entre la regulación a la alta de la actividad de DGK $\alpha$  a través de la tirosina 335 y el flujo de Ca $^{2+}$ , células Ba/F3 se transfectaron con el vector de expresión que codifica para HA-DGK $\alpha$  wt o para el mutante HA-DGK $\alpha$  Y335D, y se analizó la actividad DGK de ambos en presencia de diferentes concentraciones de CaCl $_2$ . El análisis mostró que, aunque la actividad del mutante en aspártico es mayor que la de la proteína silvestre, este

mutante es capaz de responder a la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 29b). El hecho de que una concentración de  $\text{CaCl}_2$  de 1  $\mu\text{M}$  provoque un aumento más potente en la actividad DGK del mutante en aspártico respecto a la proteína silvestre apunta a que el  $\text{Ca}^{2+}$  actúa de manera sinérgica con la tirosina 335 en la activación de  $\text{DGK}\alpha$ .

### ***La proteína $\text{DGK}\alpha$ atenúa la ruta DAG/Ras/ERK en células de la línea HEK293 por un mecanismo dependiente de la tirosina 335***

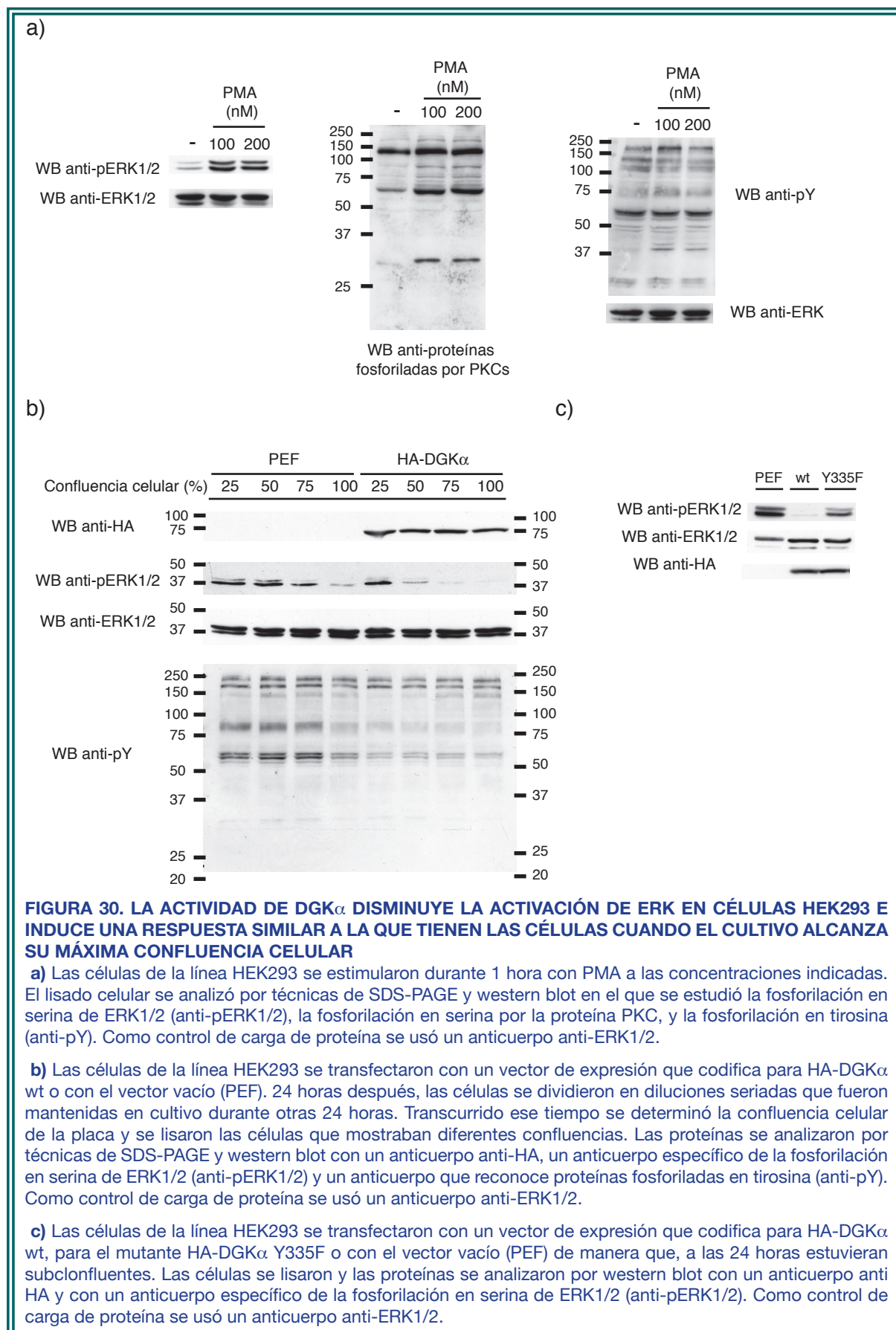
Para determinar la importancia de la tirosina 335 en la función de  $\text{DGK}\alpha$  se eligió la línea celular HEK293, que no expresa  $\text{DGK}\alpha$ , evitando con ello interferencias de la proteína endógena. Inicialmente se comprobó si las células de esta línea podían responder al incremento de DAG. Para ello se analizó, por técnicas de western blot, la activación de ERK en respuesta a PMA, un análogo no metabolizable del DAG. Se observó que las células expuestas a PMA mantenían un mayor nivel de activación de ERK, una mayor activación de PKC y un aumento en la fosforilación de algunos sustratos de tirosinas quinasas (Figura 30a).

La expresión de  $\text{DGK}\alpha$  a través de la transfección de un vector de expresión que codifica para HA- $\text{DGK}\alpha$  wt en la línea celular HEK293, y el posterior análisis del lisado total por técnicas de western blot, mostraron que la sobre-expresión de HA- $\text{DGK}\alpha$  produce una disminución de los niveles de activación de ERK y de los niveles de fosforilación en tirosina de algunos sustratos (Figura 30b), siendo esta señalización similar a la alcanzada por las células cuando están en un estado de confluencia.

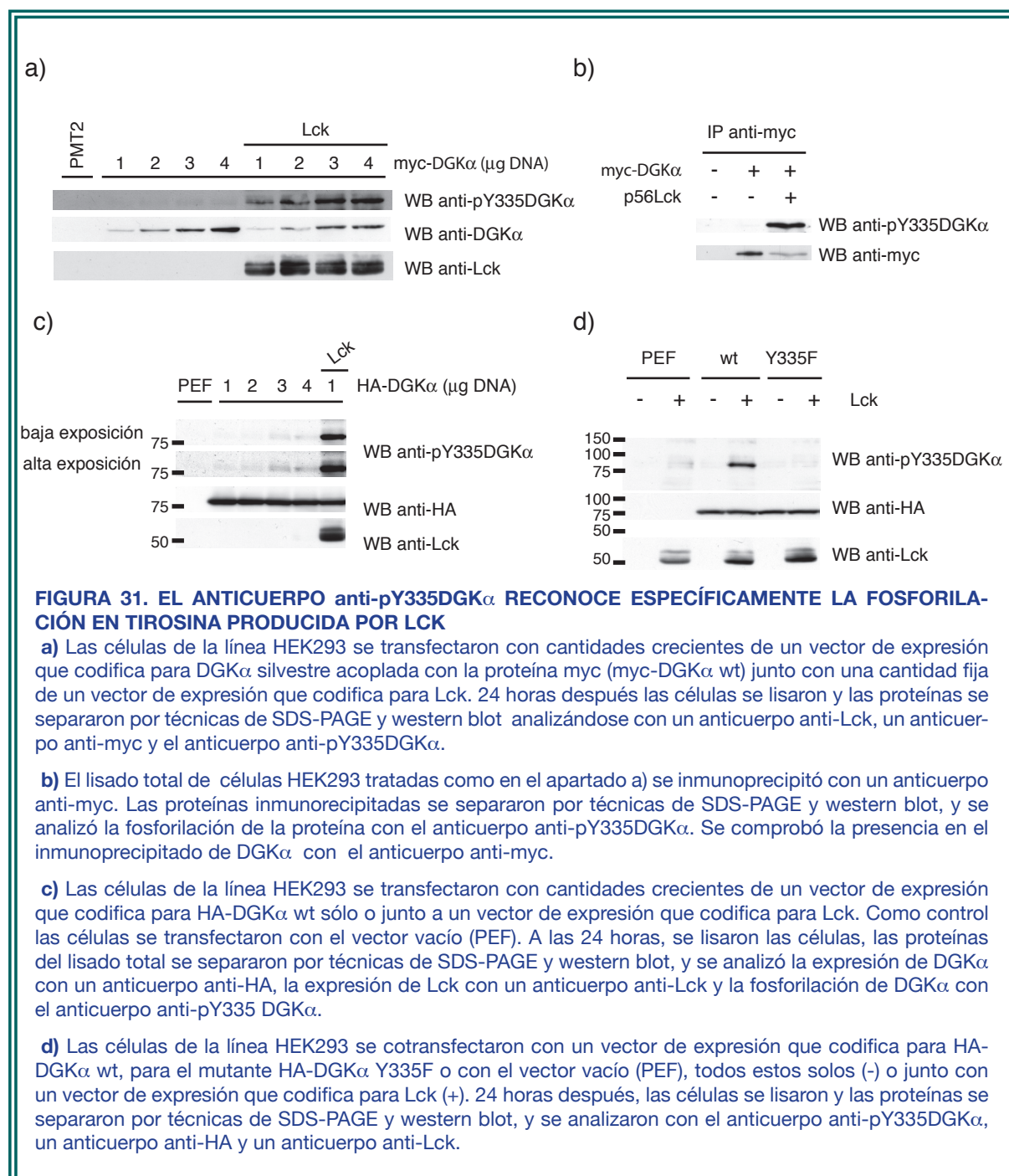
Puesto que la sobreexpresión de  $\text{DGK}\alpha$  es capaz de disminuir la activación de ERK en este sistema celular, se analizó, en estas condiciones, el papel de la tirosina 335 en la función de  $\text{DGK}\alpha$  como atenuador de la ruta DAG/Ras/ERK. Para ello se transfectó en la línea celular HEK293 el vector de expresión que codifica para la proteína HA- $\text{DGK}\alpha$  wt o para HA- $\text{DGK}\alpha$  Y335F, y se analizó la activación de ERK mediante técnicas de western blot. El estudio mostró como HA- $\text{DGK}\alpha$  es capaz de disminuir la activación de ERK sólo cuando la tirosina 335 está presente en la proteína (Figura 30c), lo que sugiere que la proteína  $\text{DGK}\alpha$  fosforilada ejerce funciones como atenuador de la ruta DAG/Ras/ERK.

### ***Generación de un anticuerpo capaz de reconocer la fosforilación en la tirosina 335 de $\text{DGK}\alpha$***

Todos los datos anteriores demuestran que la tirosina 335 es importante en el mecanismo de activación de  $\text{DGK}\alpha$  por tirosinas quinasas. Por otro lado, los datos de la proteína endógena demuestran que la fosforilación de la proteína es directa, si bien ésta es estequiométricamente baja y rápida en el tiempo. Para analizar mejor el papel de la tirosina 335 en la fosforilación directa de  $\text{DGK}\alpha$ , se generó un anticuerpo específico que reconociera exclusivamente la proteína fosforilada en esta posición (ver métodos).



Para valorar la especificidad del nuevo anticuerpo, se co-transfectó en la línea celular HEK293, un vector de expresión que codifica para DGK $\alpha$  de origen humano acoplada a un marcador myc (myc-DGK $\alpha$ ), junto con un vector que codifica para Lck. El análisis por técnicas de western blot, tanto del lisado total (Figura 31a) como del inmunoprecipitado, con un anticuerpo específico de myc (anti-myc) (Figura 31b) demostró que el anticuerpo anti-fosfotirosina 335 (pY335) reconoce a DGK $\alpha$  cuando ésta se expresa junto con Lck, usando como control la expresión de myc-DGK $\alpha$  en ausencia de Lck.

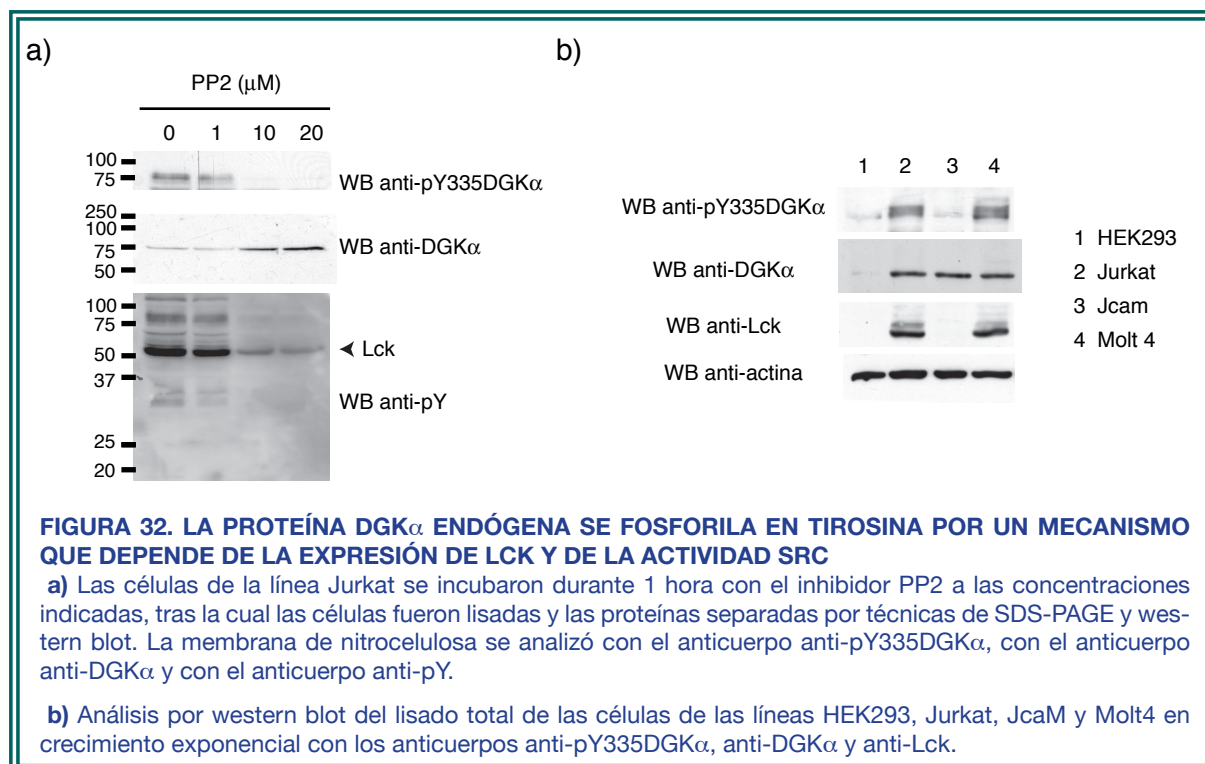


Se validó también si el anticuerpo anti-pY335DGK $\alpha$  reconocía la fosforilación en el residuo de tirosina 335 de la DGK $\alpha$  de ratón. Con este fin, se cotransfectaron células HEK293 con un vector de expresión que codifica para DGK $\alpha$  de ratón marcada con HA (HA-DGK $\alpha$  wt), junto con un vector de expresión para Lck. El análisis por técnicas de western blot mostró como el anticuerpo es capaz de reconocer fuertemente la fosforilación de la proteína en el residuo de tirosina cuando DGK $\alpha$  se expresa junto con Lck (Figura 31c), pero también puede detectarse débilmente la fosforilación en ausencia de Lck (Figura 31c alta exposición), lo que sugiere que DGK $\alpha$  es un sustrato accesible fundamentalmente a Lck pero que posiblemente es también accesible, en menor medida, a otros miembros de la familia Src como ocurre en células HEK293 donde la tirosina 335 afecta a la función de DGK $\alpha$  como atenuador de la ruta DAG/Ras/ERK (Figura 30c).

Para comprobar si el anticuerpo anti-pY335DGK $\alpha$  era capaz de reconocer específicamente a la tirosina 335 fosforilada y no una fosforilación inespecífica de la proteína, se cotransfectó un vector de expresión que codifica para Lck junto con un vector que codifica para la forma silvestre de DGK $\alpha$  fusionada con HA (HA-DGK $\alpha$  wt) o para la forma mutante que tiene la tirosina 335 sustituida por fenilalanina (HA-DGK $\alpha$ Y335F). El análisis por western blot con el anticuerpo anti-pY335DGK $\alpha$  mostró que el anticuerpo no es capaz de reconocer la fosforilación de DGK $\alpha$  en la tirosina 335 cuando mutamos este residuo por fenilalanina, demostrando la especificidad y la capacidad de discriminación del anticuerpo anti-pY335DGK $\alpha$  (Figura 31d).

De acuerdo con los datos obtenidos, la proteína Lck fosforila a DGK $\alpha$  en la tirosina 335 cuando ambas son expresadas de manera ectópica. Para corroborar si ocurría lo mismo con las proteínas endógenas, se usó la línea celular Jurkat que expresa tanto DGK $\alpha$  como Lck, y se inhibió la actividad tirosina quinasa de los miembros de la familia Src mediante un inhibidor específico, PP2. Se analizó, por western blot, tanto la fosforilación en la tirosina 335 con el anticuerpo anti-pY335DGK $\alpha$ , como la fosforilación en tirosina de las proteínas del lisado celular, observándose que el nivel de fosforilación es inversamente proporcional a la dosis de PP2 utilizado (Figura 32a).

Sin embargo, este resultado no descartaba que otros miembros de la familia Src, como Fyn, pudieran estar fosforilando a DGK $\alpha$  en la tirosina 335. Para descartar esto se usó la línea celular JcaM, que deriva de Jurkat pero que no expresa Lck (Straus and Weiss 1992), la línea celular Molt4 que, al igual que Jurkat, expresa Lck y DGK $\alpha$ , y la línea celular HEK293 que expresa DGK $\alpha$  a niveles muy bajos y no expresa Lck. El análisis de la fosforilación en la tirosina 335 por medio del anticuerpo anti-pY335DGK $\alpha$  en los lisados de las células Jurkat, JcaM y Molt4 mostró que, aun expresando los mismos niveles de DGK $\alpha$ , sólo es posible detectar la fosforilación cuando se expresa Lck (Figura 32b). Este resultado demuestra que Lck fosforila a DGK $\alpha$  en el residuo de tirosina 335.



### ***La proteína DGK $\alpha$ fosforilada en la tirosina 335 se localiza en la membrana plasmática***

La movilización de DGK $\alpha$  desde el citosol a la membrana depende del flujo de Ca<sup>2+</sup> y de la activación de las tirosinas quinasas (Sanjuan, Jones et al. 2001). Para determinar como influía la fosforilación por parte de Lck de la tirosina 335 de DGK $\alpha$  en la localización subcelular de la proteína, se realizó, en células Jurkat, un fraccionamiento subcelular. El análisis del fraccionamiento, por técnicas de western blot, nos permitió corroborar los datos ya descritos: la mayor parte de DGK $\alpha$  es citosólica (Sanjuan, Pradet-Balade et al. 2003) frente a una pequeña fracción que está presente en la membrana plasmática y en el citoesqueleto (Figura 33). Se analizó la fosforilación de DGK $\alpha$  en la tirosina 335 por medio del anticuerpo anti-pY335DGK $\alpha$  lo que mostró que la proteína fosforilada está presente en la fracción de membrana plasmática mayoritariamente, y de citoesqueleto, coincidiendo además con la presencia de Lck en las mismas fracciones. Este resultado sugiere que la proteína DGK $\alpha$  fosforilada en el residuo tirosina 335 es la fracción de proteína que, al estar en la membrana, ejerce la función de atenuador de los niveles de DAG.

### ***La proteína DGK $\alpha$ se asocia a Lck tras la estimulación del TCR***

Puesto que DGK $\alpha$  se encuentra en la misma fracción subcelular que Lck, se estudió si existe una asociación entre ambas en respuesta a la estimulación del TCR. Con este fin se estimuló el TCR de células Jurkat con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, y tras la lisis celular, se inmunoprecipitó la proteína Lck con anticuerpos específicos de la proteína. Se separaron las proteínas del inmunoprecipitado por western blot y se analizó la membrana

con los anticuerpos anti-Lck, anti-pY335DGK $\alpha$  y anti-DGK $\alpha$ , observándose que la proteína DGK $\alpha$  se asocia a Lck de manera inducible por el TCR. Sin embargo fue imposible detectar la fosforilación de DGK $\alpha$  en la tirosina 335 en la fracción de DGK $\alpha$  asociada a Lck (Figura 34).

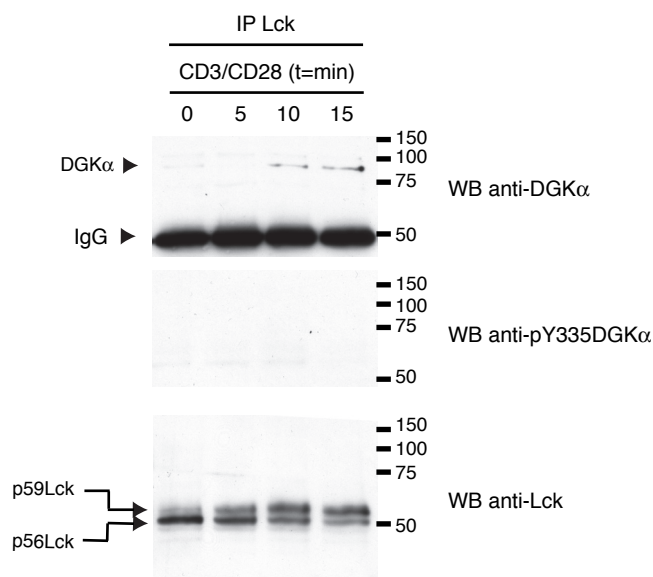
### FIGURA 33. LA PROTEÍNA DGK $\alpha$ FOSFORILADA EN LA TIROSINA 335 SE LOCALIZA EN LA FRACCIÓN DE MEMBRANA

Se separaron mediante técnicas de fraccionamiento diferentes compartimentos de las células de la línea Jurkat en los que se analizó la distribución de DGK $\alpha$  (anti-DGK $\alpha$ ) y la fosforilación de la misma (anti-pY335DGK $\alpha$ ) mediante técnicas de SDS-PAGE y western blot. Se usaron los anticuerpos anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , anti-Lck y anti-Vimentina como control de la fracción citosólica (C), de la fracción membrana (M1 y M2) y de la fracción citoesquelética (Ck) respectivamente.



### FIGURA 34. LA PROTEÍNA DGK $\alpha$ SE ASOCIA A LCK EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DEL TCR CON ANTICUERPOS ANTI-CD3 Y ANTI-CD28

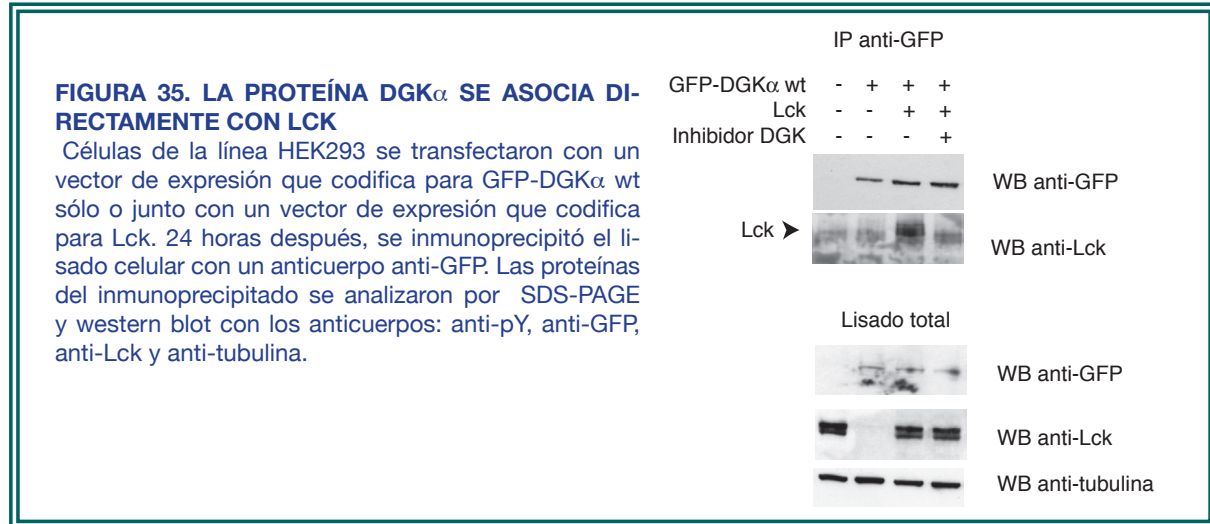
Las células de la línea Jurkat se estimularon con anticuerpos anti-CD3 y anti CD28 durante los tiempos indicados. Tras la lisis celular se inmunoprecipitó Lck con anticuerpos específicos anti-Lck. Las proteínas del inmunoprecipitado se separaron por técnicas de SDS-PAGE y western blot. El análisis de la membrana de nitrocelulosa se realizó con anticuerpos anti-pY335DGK $\alpha$  y anti-DGK $\alpha$ , junto con un anticuerpo anti-Lck como control del inmunoprecipitado.



### La proteína DGK $\alpha$ se asocia directamente a Lck en células de la línea HEK293

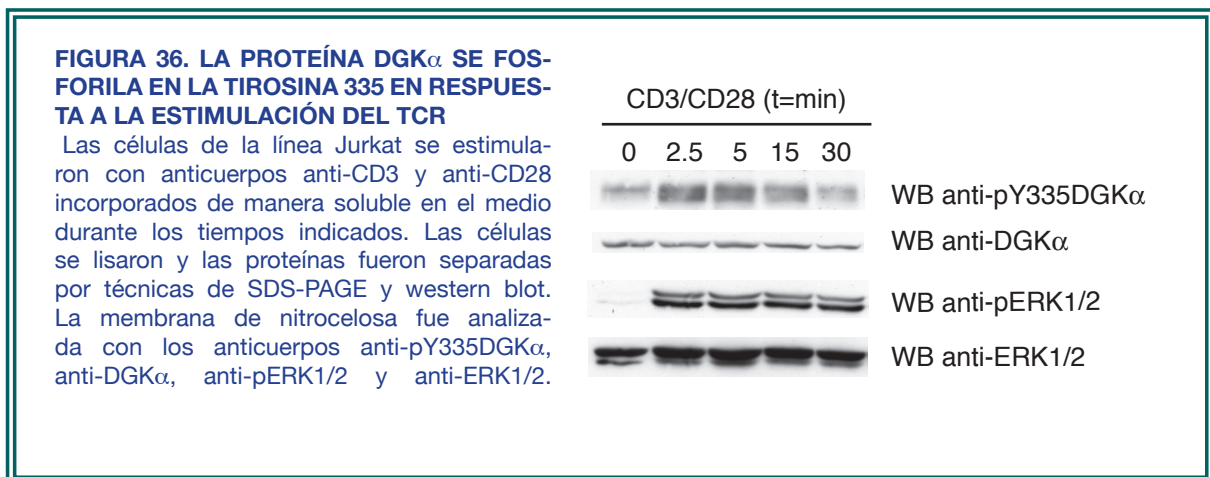
Para estudiar si la asociación entre DGK $\alpha$  y Lck era directa, o por el contrario, alguna otra proteína ejercía un papel de intermediario en dicha asociación, se analizó la unión de DGK $\alpha$  y Lck mediante la expresión ectópica de ambas en la línea celular HEK293. Para ello, las células se cotransfectaron con un vector de expresión que codifica para GFP-DGK $\alpha$  junto con un vector que codifica para Lck. Para valorar si la actividad de DGK $\alpha$  afectaba a la unión y/o a la fosforilación en tirosina de la proteína, se inhibió dicha actividad tratando a las células que coexpresan GFP-DGK $\alpha$  y Lck con el inhibidor de las DGKs de tipo I, R59949. Se lisaron las células y se inmunoprecipitó GFP-DGK $\alpha$  con anticuerpos específicos de la

proteína marcadora GFP. Tras la separación de las proteínas por western blot, se analizó la presencia de Lck utilizando un anticuerpo anti-Lck. El resultado mostró que la proteína GFP-DGK $\alpha$  se une a Lck y que la inhibición de la actividad catálitica de DGK $\alpha$  evita la unión entre ambas proteínas (Figura 35).



**La proteína DGK $\alpha$  se fosforila en la tirosina 335 en respuesta a la estimulación del TCR**

Los resultados obtenidos del mutante GFP-DGK $\alpha$   $\Delta$ (1-196)KD demuestran que la tirosina 335 es importante para la movilización de DGK $\alpha$  desde el citosol a la membrana plasmática en respuesta al TCR (Figura 20a, 20b y 21). Además, los resultados de fosforilación de DGK $\alpha$  endógena sugerían que la fosforilación es rápida y transitoria (Figura 24). Para estudiar la posible fosforilación de DGK $\alpha$  en la tirosina 335 en respuesta al TCR, se estimuló el TCR de células Jurkat mediante anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, y se analizó el estado de fosforilación de DGK $\alpha$  a través del anticuerpo anti-pY335DGK $\alpha$  a diferentes tiempos de estimulación. El resultado obtenido mostró que la fosforilación de DGK $\alpha$  era rápida y transitoria, detectándose un aumento de la fosforilación a los 2.5 minutos y una bajada a los 15, hasta casi alcanzar los niveles basales a los 30 (Figura 36).



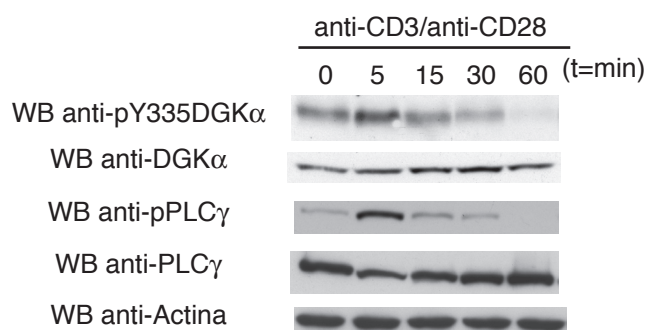


### **Las activaciones de la proteína PLC $\gamma$ y de DGK $\alpha$ están coordinadas tras la estimulación del TCR**

Durante la activación temprana desencadenada por el TCR, se produce una cascada de señalización dominada por una serie ordenada de fosforilaciones en residuos de tirosina (Nel 2002; Houtman, Houghtling et al. 2005). En respuesta a la activación del TCR mediada por Lck, la proteína ZAP70, una tirosina quinasa de la familia Syk, fosforila a la proteína adaptadora LAT en las tirosinas 136 y 195, lo que contribuye a la activación de PLC $\gamma$ . Una vez que PLC $\gamma$  se une a LAT, para ser correctamente activada, necesita ser fosforilada en el residuo 783, función que lleva a cabo ITK, una tirosina quinasa de la familia Tec. El hecho de que tres familias de tirosinas quinasas distintas participen en la producción de DAG pone de manifiesto la compleja regulación de la misma. Puesto que DGK $\alpha$  regula los niveles de DAG generados por PLC $\gamma$ , se estudió qué relación podría existir entre la fosforilación de PLC $\gamma$  en el residuo de tirosina 783 y la fosforilación de DGK $\alpha$  en el residuo de tirosina 335 en respuesta a la activación del TCR. Para ello, tras la estimulación del TCR en células Jurkat, se analizó la fosforilación de ambos residuos por técnicas de western blot usando los anticuerpos anti-pY335DGK $\alpha$  y anti-p783 de PLC $\gamma$  (Figura 37), y se observó una correlación entre ambas fosforilaciones, demostrando que ambas ocurren de manera coordinada y que, por tanto, la generación de DAG en respuesta al TCR va acompañada de la eliminación del mismo.

#### **FIGURA 37. LA ACTIVACIÓN DE DGK $\alpha$ Y LA ACTIVACIÓN DE PLC $\gamma$ ESTÁN COORDINADAS EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN DEL TCR**

Las células de la línea Jurkat se activaron con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 incorporados de manera soluble en el medio de cultivo durante los tiempos indicados. Tras la lisis celular, las proteínas fueron separadas por técnicas de SDS-PAGE y western blot, y posteriormente analizadas con los anticuerpos anti-pY335DGK $\alpha$ , anti-DGK $\alpha$ , anti-pPLC $\gamma$ , anti-PLC $\gamma$  y anti-actina como control de carga de proteínas.



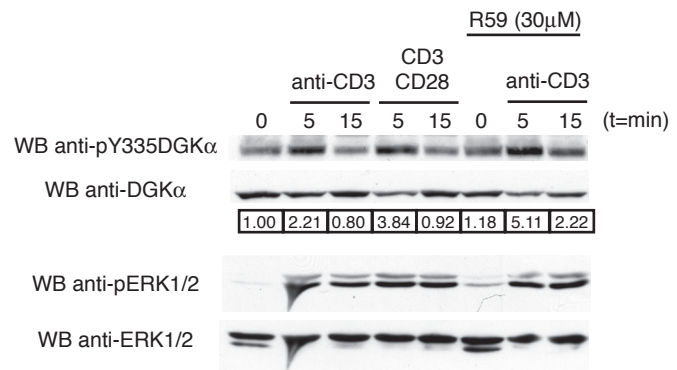
### **DGK $\alpha$ se fosforila en la tirosina 335 en respuesta al TCR de manera independiente de la señal de coestimulación del receptor CD28, y su cinética de fosforilación depende de la actividad de DGK $\alpha$**

La señal de coestimulación del receptor CD28 es importante para regular la respuesta procedente del TCR. Para analizar si esta señal es importante para la fosforilación de DGK $\alpha$  en la tirosina 335 se analizó la fosforilación de dicho residuo en células Jurkat estimuladas con anticuerpos anti-CD3 en ausencia o en presencia de la señal de coestimulación procedente del receptor CD28. El análisis por western blot mostró que la señal de coestimulación

procedente del CD28 provocaba un ligero aumento en el nivel de fosforilación de la tirosina 335, respecto a la señal obtenida tras la estimulación del TCR únicamente con anti-CD3. Por tanto, la señal del CD28, aunque ejerce un papel positivo en la fosforilación de DGK $\alpha$  en la tirosina 335, no ejerce un papel significativo en el mecanismo de activación en respuesta al TCR (Figura 38).

**FIGURA 38. LA FOSFORILACIÓN DE DGK $\alpha$  EN LA TIROSINA 335 EN RESPUESTA AL TCR ES INDEPENDIENTE DE LA SEÑAL DE COESTIMULACIÓN DEL RECEPTOR CD28 Y SE REGULA POR LA PROPIA ACTIVIDAD DE DGK $\alpha$**

Las células de la línea Jurkat se estimularon con anticuerpos anti-CD3 sólo, con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28, y con anticuerpos anti-CD3 en presencia de R59949, todos ellos solubles en el medio de cultivo durante los tiempos indicados. Las células se lisaron y las proteínas fueron separadas por técnicas de SDS-PAGE y western blot, y analizadas con los anticuerpos anti-pY335DGK $\alpha$ , anti-DGK $\alpha$ , anti-pERK1/2 y anti-ERK1/2. En la tabla se muestra la relación de la fracción fosforilada de DGK $\alpha$  respecto a la proteína total.



La inhibición de la actividad quinasa de DGK $\alpha$  provoca que la localización en la membrana plasmática de la proteína en respuesta al TCR, en lugar de ser transitoria, sea sostenida (Sanjuan, Jones et al. 2001), poniendo de manifiesto la relación entre la actividad de la proteína y su localización en la membrana. Puesto que DGK $\alpha$  se fosforila en tirosina, también con un cinética rápida y transitoria, se estudió si había alguna relación entre el aumento del estado fosforilado de DGK $\alpha$  en la tirosina 335 en respuesta al TCR y la actividad quinasa de la proteína. Para ello se inhibió la actividad por medio de R59949 y se analizó, por western blot, el estado de fosforilación de DGK $\alpha$  durante la activación del TCR con el anticuerpo anti-pY335DGK $\alpha$ . Los datos obtenidos mostraron que la inhibición de la actividad DGK $\alpha$  aumenta el nivel de fosforilación de la tirosina 335 a partir de la activación del TCR (Figura 38). Esto demostró que, a través de su actividad quinasa, DGK $\alpha$  regula su nivel de fosforilación.

**La fosforilación de DGK $\alpha$  en la tirosina 335 requiere de la acción coordinada del Ca<sup>2+</sup> y de las tirosinas quinasas de la familia Src**

La proteína DGK $\alpha$  necesita de un flujo de Ca<sup>2+</sup> y de la acción enzimática de las tirosinas quinasas para movilizarse desde el citosol a la membrana plasmática (Sanjuan, Jones et al. 2001). En respuesta a la estimulación del TCR, la activación de tirosinas quinasas que lleva a la activación de PLC $\gamma$  da lugar a la producción de DAG y de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), el cual permite la salida de Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico a través de la apertura de los canales de

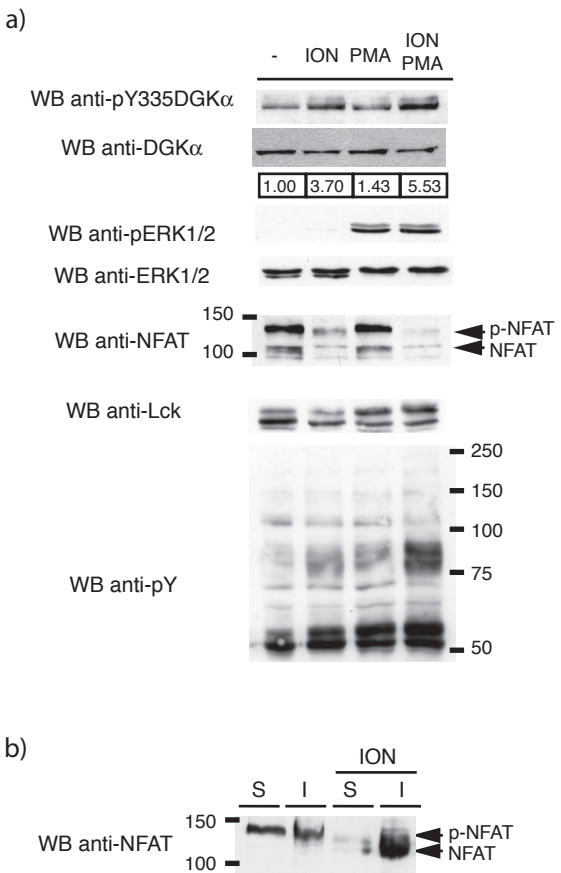
$\text{Ca}^{2+}$ . DGK $\alpha$ , a través de sus manos de  $\text{Ca}^{2+}$ , es capaz de unir este ión y perder la restricción negativa que proporcionan éstas a la proteína (Jiang, Qian et al. 2000; Sanjuan, Jones et al. 2001). Por otro lado, está descrito que Lck se regula positivamente por DAG en respuesta a la estimulación del TCR por un mecanismo que depende de la fosforilación de Lck en la serina 59 (Schroder, Quehl et al. 2000). Esta fosforilación produce un cambio conformacional que provoca que el dominio SH2 de Lck deje de interactuar con proteínas fosforiladas en tirosina (Joung, Kim et al. 1995), entre ellas la fosfatasa SHP-1 (Stefanova, Hemmer et al. 2003) que a su vez regula la activación de ZAP70 (Plas, Johnson et al. 1996) y de la propia Lck (Chiang and Sefton 2001). El análogo del DAG, PMA, mimetiza la regulación de Lck por el DAG, lo cual se puede visualizar fácilmente por el cambio de movilidad electroforética que provoca la fosforilación en la serina 59, de forma que Lck pasa a tener un peso molecular aparente de 59 kDa, denominándose en este caso p59Lck (Schroder, Quehl et al. 2000).

Para analizar el efecto que provoca la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y el aumento de la concentración de DAG en la fosforilación de DGK $\alpha$ , se mimetizaron ambos estímulos de manera farmacológica: el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un ionóforo, la ionomicina, que abre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática, y la formación de DAG por medio del análogo no metabolizable del DAG, PMA (Weiss, Imboden et al. 1986; Schroder, Quehl et al. 2000). Se analizó, en la línea celular Jurkat, el lisado total por medio de técnicas de western blot, usando el anticuerpo anti-pY335DGK $\alpha$ , observándose que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  es suficiente para alcanzar un mayor nivel de fosforilación de DGK $\alpha$ , mientras que el análogo de DAG, PMA, sólo da lugar a cambios en los niveles de fosforilación de DGK $\alpha$  cuando participa de manera coordinada con la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 39). Estos datos sugieren que la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  facilita la accesibilidad de la tirosina quinasa Lck a la tirosina 335, y que esta fosforilación puede ser regulada por un mecanismo que depende de DAG y de tirosinas quinasas, siempre y cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  permita la accesibilidad a dicho residuo.

**FIGURA 39. LA FOSFORILACIÓN DE DGK $\alpha$  EN LA TIROSINA 335 DEPENDE DEL FLUJO DE CA $^{2+}$**

**a)** Las células de la línea Jurkat se estimularon con ionomicina (ION), con PMA o con ambos durante 5 minutos. Tras la lisis celular, se separaron las proteínas por técnicas de SDS-PAGE y western blot, y se analizaron con anticuerpos anti-pY335DGK $\alpha$  y anti-DGK $\alpha$ . Como control de estimulación con ionomicina se usó un anticuerpo anti-NFAT, y como control de activación con PMA se usó el anticuerpo anti-pERK1/2 y anti-ERK1/2. Como control de activación de las células Jurkat se usaron los anticuerpos anti-Lck y anti-pY. En la tabla se muestra la relación entre la fracción fosforilada y la proteína total de DGK $\alpha$ .

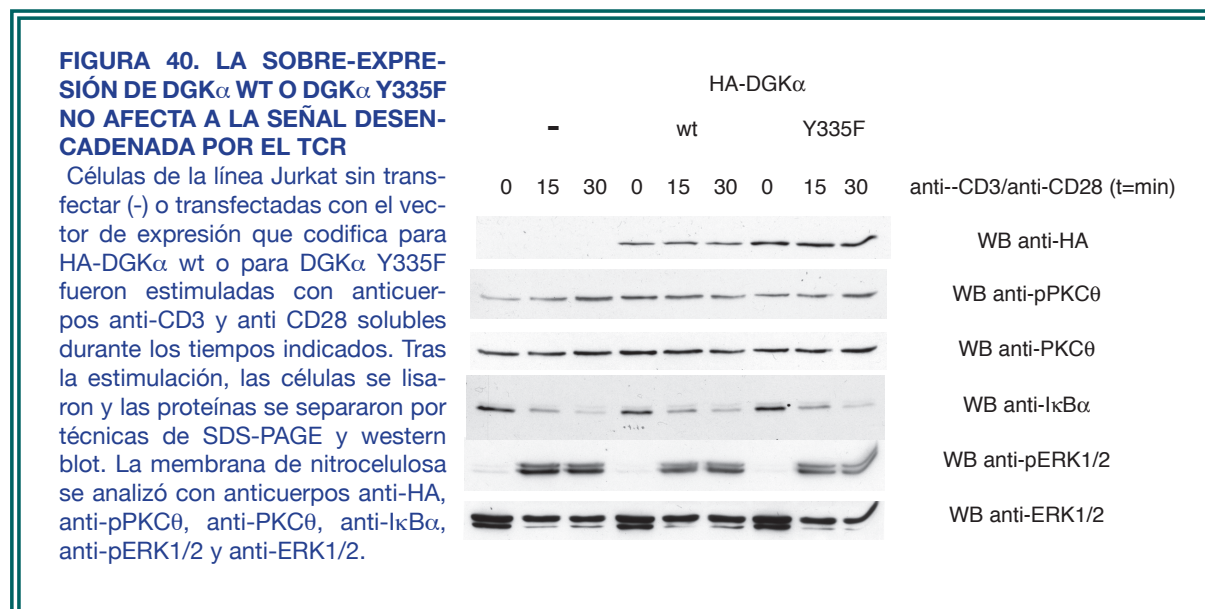
**b)** Las células de la línea Jurkat se estimularon con ionomicina (ION) durante 5 minutos. Tras la lisis de estas células se analizó por separado la fracción insoluble (I) y la fracción soluble (S) del lisado. Se separaron las proteínas de ambas fracciones por técnicas de SDS-PAGE y western blot y la membrana de nitrocelulosa se analizó con el anticuerpo anti-NFAT usado en el apartado a).



**Estudio de la fosforilación de la tirosina 335 en la función de DGK $\alpha$  como atenuador de la ruta de activación de ERK**

La proteína DGK $\alpha$  regula la activación de la ruta RasGRP1/Ras/ERK (Sanjuan, Pradet-Balade et al. 2003). Dado que la tirosina 335 regula tanto la actividad de DGK $\alpha$  como la localización en la membrana de la proteína, se estudió qué papel juega la fosforilación de este residuo en la regulación de dos efectores conocidos del DAG como son la ruta RasGRP1/Ras/ERK y la ruta PKC $\theta$ /NF $\kappa$ B. Para este estudio se transfectó, en la línea celular Jurkat, el vector de expresión que codifica para la proteína HA-DGK $\alpha$  wt o para HA-DGK $\alpha$  Y335F. Tras la estimulación del TCR con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, se analizó la activación de ERK usando un anticuerpo específico de la fosforilación de la proteína ERK1/2 (anti-pERK1/2), y la activación de PKC $\theta$  con un anticuerpo específico de su fosforilación en tirosina (anti-pPKC $\theta$ ) y también mediante la degradación que experimenta I $\kappa$ B $\alpha$ , mecanismo dependiente de la actividad PKC $\theta$ . El resultado determinó que ni la activación de ERK, ni la activación de PKC $\theta$  estaban afectadas por la sobre-expresión de HA-DGK $\alpha$  wt o de HA-DGK $\alpha$  Y335 (Figura 40). El hecho de que la proteína silvestre no afecte a la activación de ERK sugiere que la sobre-expresión de la forma silvestre de DGK $\alpha$  no puede competir con la proteína DGK $\alpha$  endógena en la regulación de las rutas dependientes de DAG, como se propuso en estudios anteriores (Sanjuan, Jones et al. 2001). Tampoco podemos descartar que el porcentaje de

células que se transfectan con las construcciones que expresan DGK $\alpha$ , aproximadamente 30% de eficiencia de transfección, no sea suficiente como para ver el efecto en la expresión de dichas proteínas.

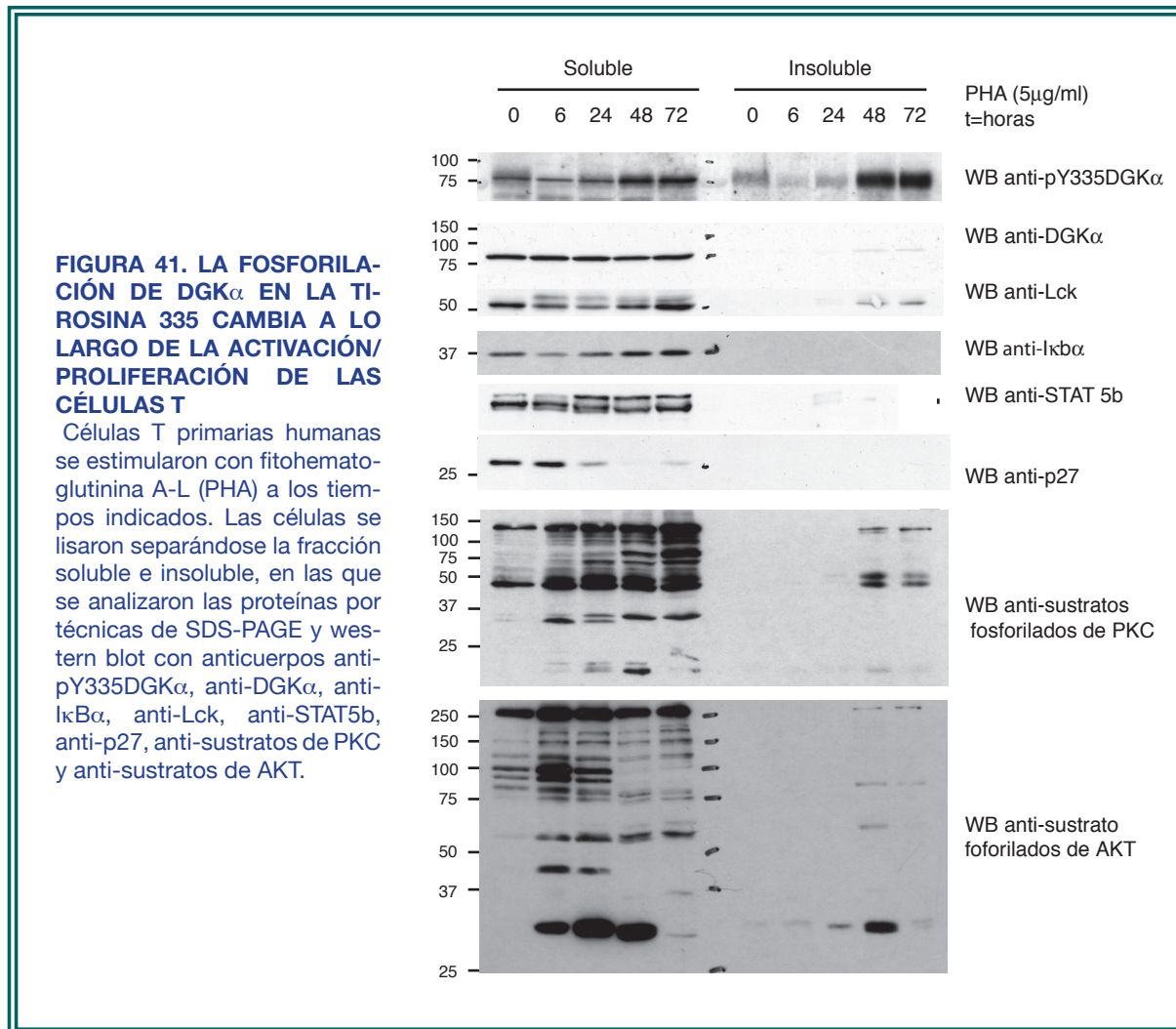


### ***La fosforilación de DGK $\alpha$ varía a lo largo de la activación/proliferación desencadenada a partir de la señal del TCR***

Durante la activación de las células T, DGK $\alpha$  ejerce un efecto atenuador sobre la ruta DAG/RasGRP/Ras/ERK1-2, y un efecto estimulador de la proliferación mediada por el receptor de IL2, puesto que el PA es necesario para proliferar en respuesta a este receptor (Flores, Casaseca et al. 1996; Flores, Jones et al. 1999). Para determinar cómo es la fosforilación de DGK $\alpha$  a lo largo de la activación/proliferación celular a través del TCR, se estudiaron, en células primarias aisladas de sangre humana, y por técnicas de western blot, las proteínas que varían a lo largo de la activación/proliferación de las células T.

Entre los parámetros medidos durante la activación/proliferación se encuentran: el cambio de movilidad electroforética de Lck debido a la fosforilación en la serina 59 que da lugar a la forma denominada p59Lck; la fosforilación de sustratos de AKT, proteína reclutada a la membrana plasmática a través de los lípidos generados por PI3K; la fosforilación de sustratos de PKC que se produce por la activación de diferentes PKCs; la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  a partir de la activación de PKC $\theta$ ; la fosforilación de las proteínas STAT5 que se produce a través de la activación del receptor de IL2; y la degradación del inhibidor de ciclo celular p27, por medio de la ubiquitinación de la proteína a partir de la estimulación del receptor de IL2, proceso que es inmediatamente anterior a la proliferación celular (Figura 41). El seguimiento de la fosforilación de DGK $\alpha$  en la tirosina 335 con el anticuerpo anti-pY335DGK $\alpha$  permitió observar que dicha proteína está fosforilada antes de la estimulación del TCR. Durante la activación del receptor el nivel de fosforilación disminuye, pero alcanza niveles máximos

cuando las células comienzan a proliferar. El estudio de la fracción insoluble de la lisis celular mostró que una gran parte de DGK $\alpha$  fosforilada en la tirosina 335 se encuentra localizada en esta fracción, donde además de DGK $\alpha$  fosforilada se detecta la presencia de Lck y de algunos sustratos fosforilados por PKCs.



#### 4. ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN Y DE LA FUNCIÓN DE DGK $\alpha$ EN LOS LINFOMAS ANAPLÁSTICOS DE CÉLULA GRANDE (ALCL)

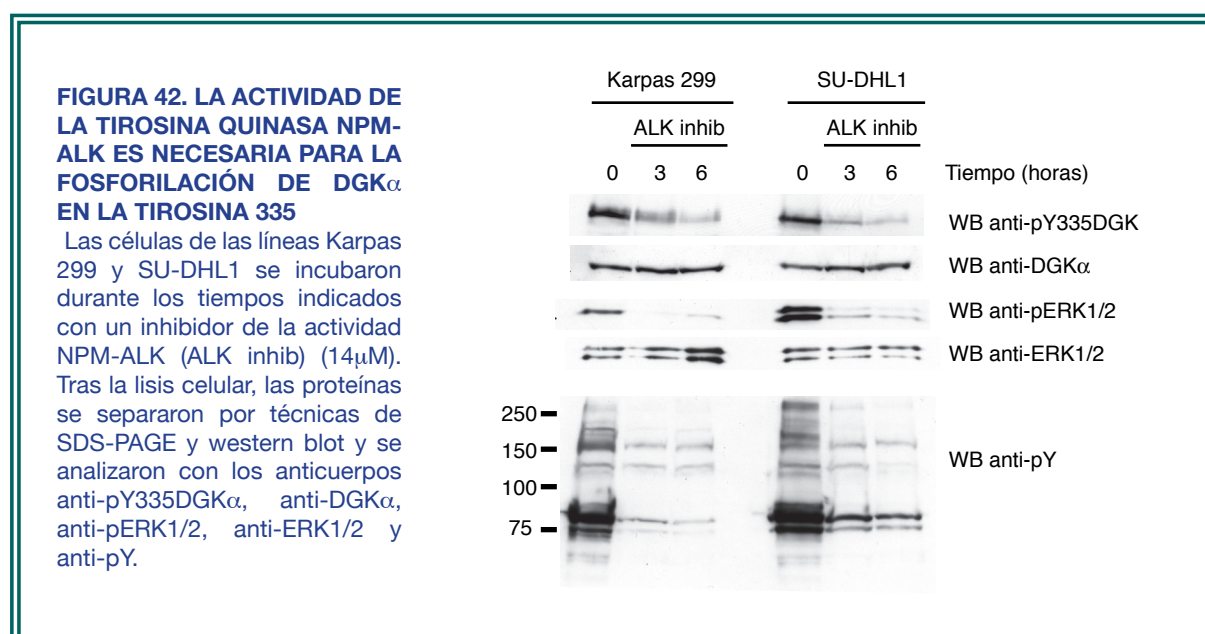
El linfoma de tipo anaplástico de célula grande (ALCL) es uno de los linfomas más frecuente en las tres primeras décadas de vida (Morris, Kirstein et al. 1994). La translocación cromosómica t(2;5)(p23;q35) está ampliamente extendida en estos linfomas y da lugar a formación de una proteína de fusión denominada NPM-ALK (Morris, Kirstein et al. 1994). Por separado, la proteína NPM es una proteína nucleolar implicada en el tránsito de proteínas entre el citoplasma y el núcleo (Chan, Liu et al. 1989), y la proteína transmembrana ALK es un receptor tirosina quinasa cuya expresión, en condiciones normales, está restringida a tejido neuronal (Iwahara, Fujimoto et al. 1997). La fusión de la porción citoplasmática de ALK con la proteína NPM da lugar a una proteína de aproximadamente 80 kDa que, a través de su

dominio NPM, es capaz de dimerizar y dar lugar a la autofosforilación de la propia NPM-ALK (Kuefer, Look et al. 1997), lo cual activa a la proteína de fusión.

La actividad de NPM-ALK se ha asociado a la activación de p60Src, PLC $\gamma$ , PI3K y DGK $\alpha$  (Bai, Dieter et al. 1998; Bai, Ouyang et al. 2000; Cussac, Greenland et al. 2004; Bacchiocchi, Baldanzi et al. 2005). En el caso de DGK $\alpha$ , está descrito que su actividad es importante para la proliferación de la línea celular Karpas 299, que es una línea derivada de un linfoma ALCL. Se sabe que la activación de DGK $\alpha$  en estas células depende de la asociación entre p60Src y NPM-ALK (Bacchiocchi, Baldanzi et al. 2005), pero el mecanismo que define la relación entre DGK $\alpha$  y p60Src se desconoce.

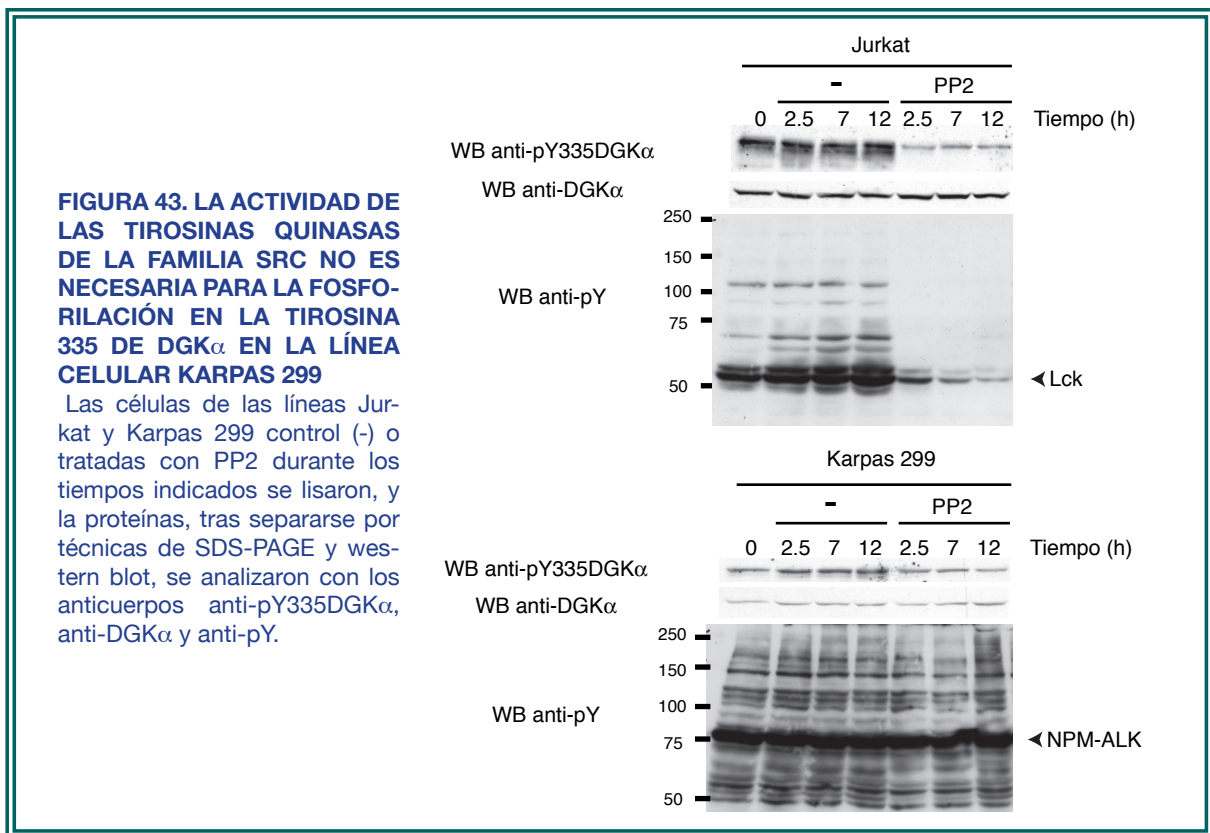
### **La actividad tirosina quinasa de NPM-ALK provoca la fosforilación de DGK $\alpha$ en la tirosina 335**

Puesto que la actividad tirosina quinasa de NPM-ALK es fundamental para la señalización en los tumores que expresan la proteína (Marzec, Kasprzycka et al. 2005; Kasprzycka, Marzec et al. 2006), se estudió el efecto que tenía dicha actividad en la fosforilación de DGK $\alpha$ . Para llevar a cabo este estudio, se inhibió la actividad de NPM-ALK en las células de las líneas Karpas 299 y SU-DHL1, otro linfoma ALCL, por medio del inhibidor WHI-P154. Posteriormente, se analizaron los lisados celulares por técnicas de western blot, y se usó el anticuerpo anti-PY para visualizar la actividad quinasa de NPM-ALK, y el anticuerpo anti-pERK para analizar si la activación de ERK se veía afectada por la inhibición de NPM-ALK. Además, se usó el anticuerpo anti-pY335DGK $\alpha$  para determinar el estado de fosforilación de DGK $\alpha$ . El análisis mostró una bajada en la fosforilación de la mayor parte de las proteínas, incluida la propia NPM-ALK, junto con la bajada en la fosforilación de DGK $\alpha$  en la tirosina 335 (Figura 42).



Por otra parte, se estudió la activación de ERK en ambas líneas celulares, comprobándose que dicha activación era prácticamente indetectable en el caso de Karpas 299 y que, en el caso de SU-DHL1, estaba regulada a la baja tras la inhibición de la actividad tirosina quinasa de NPM-ALK. Este resultado demuestra que NPM-ALK controla, entre otras muchas, la fosforilación en tirosina y la activación de DGK $\alpha$  (Figura 42).

Para intentar definir la relación entre p60Src y DGK $\alpha$ , se comprobó en las células Karpas 299 si se producía la fosforilación de la proteína DGK $\alpha$  en la tirosina 335 al igual que ocurría en las células Jurkat. Para ello, se estudió la fosforilación de DGK $\alpha$  en los lisados totales de las líneas Jurkat y Karpas 299 por medio de técnicas de western blot y el posterior análisis con el anticuerpo anti-pY335DGK $\alpha$ . El análisis reveló que, aunque la fosforilación en la tirosina 335 depende de la actividad Src en ambas líneas celulares, la dependencia es mucho mayor en el caso de las células Jurkat (Figura 43). El análisis de la fosforilación del total de proteínas mostró, no sólo el gran número de sustratos fosforilados en la línea Karpas 299, sino además el escaso efecto que tiene la inhibición de las tirosinas quinasas de Src en la fosforilación de muchos sustratos. Esto sugiere la importancia de NPM-ALK como desencadenante de la mayoría de las rutas de señalización de los tumores que expresan esta proteína. En este contexto, la actividad NPM-ALK podría sustituir en parte la actividad de Src en el mecanismo de activación de DGK $\alpha$ .





### ***La actividad quinasa de DGK $\alpha$ es importante para la proliferación celular de los linfomas ALCL***

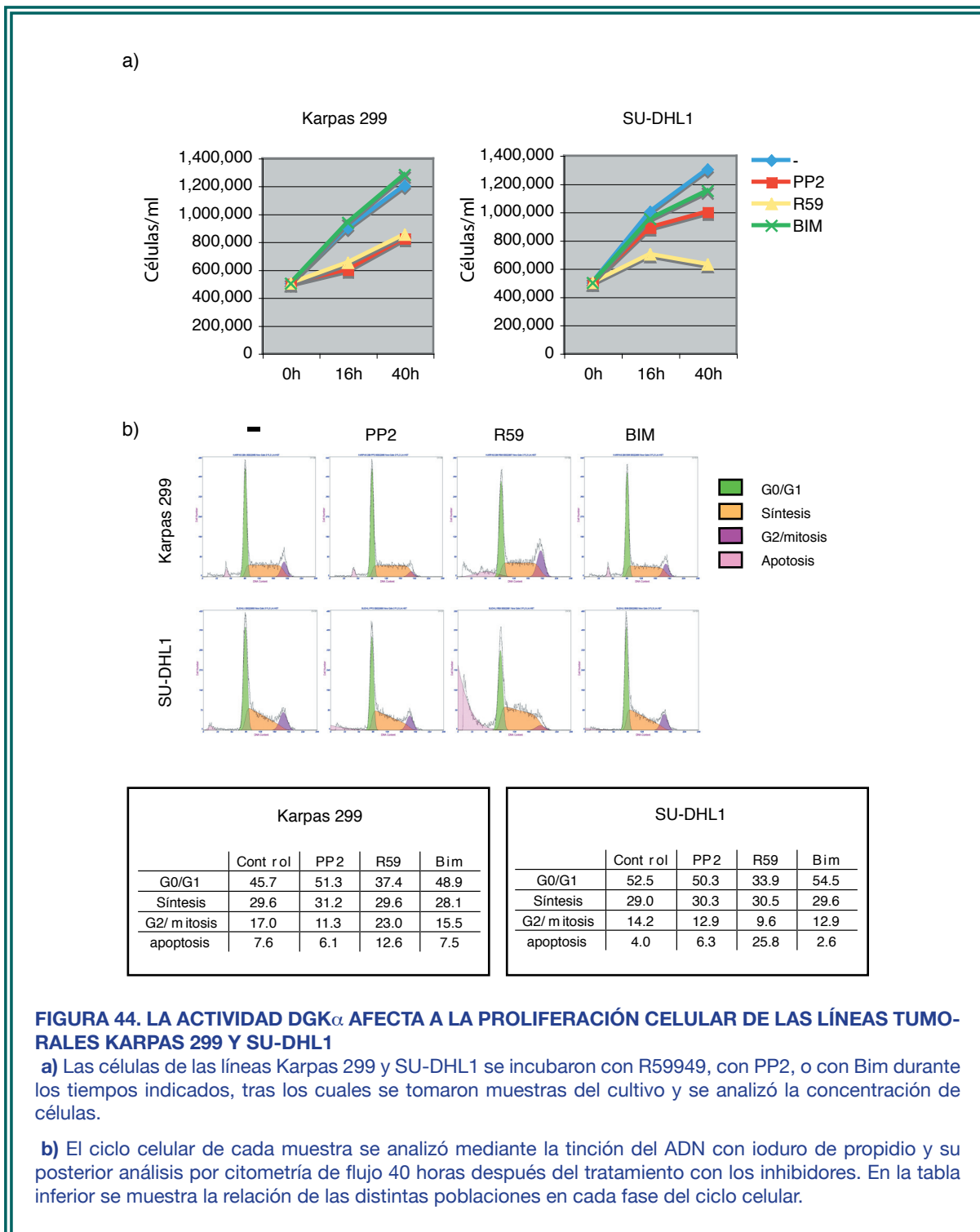
La actividad de DGK $\alpha$  es importante para la proliferación celular tanto en condiciones fisiológicas, como ocurre a partir de la respuesta al receptor de IL2 (Flores, Casaseca et al. 1996; Flores, Jones et al. 1999) o en la activación del receptor del VEGF (Baldanzi, Mitola et al. 2004), como en condiciones patológicas como la que depende de la proteína NPM-ALK (Bacchiocchi, Baldanzi et al. 2005). Además, tanto en el caso del receptor VEGF como en el caso de NPM-ALK, la función proliferativa de la actividad DGK $\alpha$  está mediada por la proteína p60Src.

Para determinar el efecto que tenía la inhibición de la actividad quinasa de DGK $\alpha$  en la proliferación celular, se utilizaron la línea Karpas299 y la línea SUDHL1. Ambas líneas celulares se trataron con PP2, con R59949 o con Bisindolilmaleimida (Bim), un inhibidor de las PKCs clásicas, y se determinó el número de células a lo largo del tiempo como indicador de la proliferación celular. El resultado mostró cómo la inhibición de la actividad de DGK $\alpha$  y la inhibición de la actividad Src disminuyen el ritmo proliferativo tanto en la línea celular Karpas 299 como en SU-DHL1 (Figura 44a). Para descartar que el efecto en proliferación se debiera a que ambos inhibidores estaban afectando la viabilidad celular, se analizó, por citometría de flujo, el ciclo celular de ambas líneas en presencia de los inhibidores antes indicados. El estudio determinó que ni la inhibición de Src ni la inhibición de DGK $\alpha$  afectaban a la viabilidad celular en el caso de Karpas 299. En el caso de SU-DHL1, se observó que la inhibición de la actividad de DGK $\alpha$  disminuye la viabilidad celular (Figura 44b), lo que sugiere que dicha actividad puede estar afectando diferentes rutas de señalización en función del tipo celular.

### ***Estudio de la señalización celular regulada por la actividad DGK $\alpha$ y la actividad Src en la proliferación de los tumores que expresan la proteína NPM-ALK***

Para intentar determinar las rutas de señalización que se ven afectadas cuando se inhiben la actividad de DGK $\alpha$  y la actividad Src en las líneas Karpas 299 y SU-DHL1, se llevó a cabo un análisis de diferentes parámetros en función de su previa descripción como mediadores del fenotipo de ambas líneas tumorales o por su potencial función en la regulación de rutas reguladas por DAG. Entre los parámetros estudiados se encuentra la activación de la proteína STAT3, cuya activación es fundamental para la expresión de inteleuquina 10 (IL10) (Kasprzycka, Marzec et al. 2006), la cual favorece la viabilidad celular de los tumores ALCL. También se estudió la activación de PKC a través de la fosforilación de sus sustratos, y la activación de ERK, en ambos casos por el potencial papel que DGK $\alpha$  puede jugar en su activación. El análisis de los lisados celulares por técnica de western blot determinó que aunque la inhibición de la actividad Src provoca una disminución en la fosforilación de DGK $\alpha$  en la tirosina 335, esta inhibición no provoca ningún efecto en la fosforilación en serina o tirosina que activa a las proteínas STAT3, ni en la activación de ERK, donde se comprobó de nuevo que la línea celular Karpas 299 no posee actividad de ERK (Figura 45). La inhibición

de DGK $\alpha$  no tiene ningún efecto aparente en la señalización de los parámetros analizados en la línea celular Karpas299, sin embargo, el mismo análisis en la línea celular SU-DHL1, donde si hay activación de ERK, demuestra que la actividad DGK es capaz de afectar tanto la activación de ERK como a la fosforilación de algunos sustratos de PKC. Estos resultados sugieren que la activación de ERK puede marcar el modo en que DGK $\alpha$  afecta a ésta y a otras rutas de señalización.



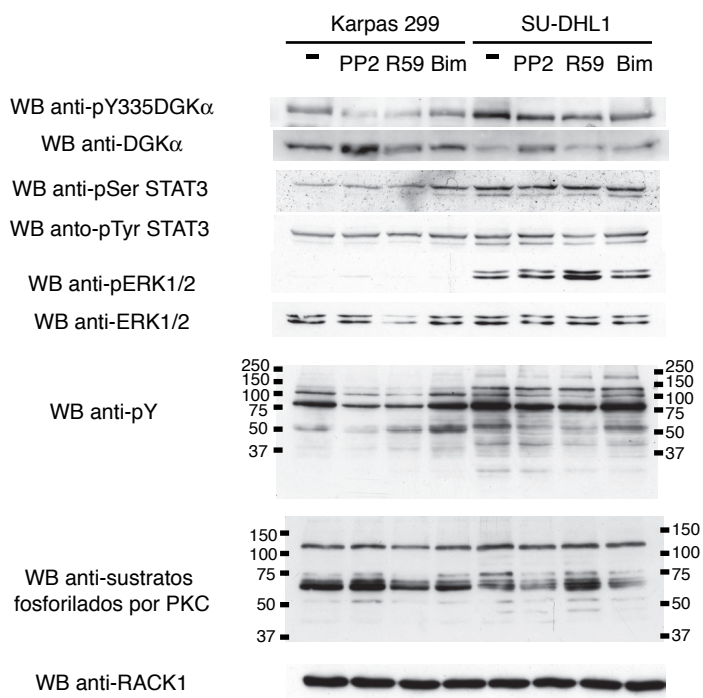
**FIGURA 44. LA ACTIVIDAD DGK $\alpha$  AFECTA A LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LAS LÍNEAS TUMORALES KARPAS 299 Y SU-DHL1**

a) Las células de las líneas Karpas 299 y SU-DHL1 se incubaron con R59949, con PP2, o con Bim durante los tiempos indicados, tras los cuales se tomaron muestras del cultivo y se analizó la concentración de células.

b) El ciclo celular de cada muestra se analizó mediante la tinción del ADN con yoduro de propidio y su posterior análisis por citometría de flujo 40 horas después del tratamiento con los inhibidores. En la tabla inferior se muestra la relación de las distintas poblaciones en cada fase del ciclo celular.

**FIGURA 45. LA ACTIVIDAD DGK $\alpha$  NO AFECTA LA ACTIVACIÓN DE LAS PROTEÍNAS STAT3 EN LAS LÍNEAS KARPAS 299 Y SU-DHL1**

Las células de las líneas tumorales Karpas 299 y SU-DHL1 se trataron durante 24 horas con el inhibidor R59949, con PP2, o con Bim. Después las células se lisaron y las proteínas del sobrenadante se separaron por técnicas de SDS-PAGE y western blot. La membrana de nitrocelulosa se analizó con los anticuerpos anti-pY335DGK $\alpha$ , anti-DGK $\alpha$ , anti-pSerSTAT3, anti-pTyrSTAT3, anti-pERK1/2, anti-ERK1/2, anti-pY, anti-sustratos fosforilados de PKC y anti-RACK1.





# Discusión



La producción de DAG por parte de la proteína PLC $\gamma$  en respuesta al TCR desencadena la activación de las proteínas RasGRP1 y PKC $\theta$  a través de la asociación de sus dominios C1 con el DAG (Carrasco and Merida 2004), lo que provoca la activación, respectivamente, de las rutas Ras/ERK/AP-1 (Dower, Stang et al. 2000) y NF $\kappa$ B (Sun, Arendt et al. 2000) esenciales para el desencadenamiento de la respuesta inmune de la célula T. En la activación de PLC $\gamma$  en respuesta al TCR contribuyen hasta tres familias de tirosinas quinasas, Src, Syk y Tec (Nel 2002; Nel and Slaughter 2002). Además, diferentes dominios de PLC $\gamma$  participan en su mecanismo de activación que incluye la interacción con proteínas adaptadoras, como LAT y SLP-76 (Kurosaki and Tsukada 2000; Wange 2000), la fosforilación directa de la proteína en el residuo de tirosina 783 (Sekiya, Poulin et al. 2004; Houtman, Houghtling et al. 2005) y la activación a través de lípidos de membrana como PIP $_3$  y PA (Jones and Carpenter 1993). Estas evidencias reafirman la teoría de que la producción de DAG a lo largo de la respuesta desencadenada en la célula T es un proceso altamente regulado en tiempo y en intensidad. Pero, durante la activación de la célula T, los niveles de DAG no sólo depende de su producción, sino, además, de su metabolismo.

Las DGKs son proteínas quinasas que metabolizan el DAG para producir PA (Sakane and Kanoh 1997; Kurosaki and Tsukada 2000; van Blitterswijk and Houssa 2000). Al menos dos isoformas, DGK $\alpha$  y DGK $\zeta$ , se expresan en las células T (van Blitterswijk and Houssa 2000). Ambas isoformas de DGK son capaces de regular, mediante la disminución de los niveles de DAG, la ruta RasGRP/Ras/ERK durante la activación de las células T (Sanjuan, Jones et al. 2001; Topham and Prescott 2001; Jones, Sanjuan et al. 2002; Zhong, Hainey et al. 2002). Sin embargo, DGK $\alpha$  y DGK $\zeta$ , a partir de sus diferentes dominios de regulación, participan de manera distinta en el mecanismo que regula los niveles de DAG. La proteína DGK $\zeta$  para ser reclutada a la membrana plasmática en respuesta al TCR necesita la fosforilación de su dominio MARKS a través de una PKC y la pérdida de la restricción negativa que supone el extremo carboxilo de la proteína (Santos, Carrasco et al. 2002). Sin embargo, la proteína DGK $\alpha$  necesita la unión del Ca $^{2+}$  a la proteína y la actividad de las tirosinas quinasas para estabilizarse en la membrana (Sanjuan, Jones et al. 2001).

Las proteínas DGKs forman parte del conjunto de señales negativas que regulan la activación de la célula T. El equilibrio entre las señales positivas y negativas que se desencadenan en respuesta a la activación del TCR, junto con las que proceden de la señal de coestimulación del CD28 es lo que va a determinar la respuesta celular (Diehn, Alizadeh et al. 2002; Nel 2002; Nel and Slaughter 2002). De esta manera, la respuesta inmune que las células T desarrollan frente un patógeno está fuertemente regulada para que ésta se dé sólo contra el patógeno y dure el tiempo necesario para eliminarlo (Lenardo 1997). En caso contrario, la respuesta desencadenada podría darse de manera exagerada o contra las células del propio organismo, provocando fenómenos autoinmunes.

La correcta generación de DAG es responsable de establecer los procesos de

tolerancia que evitan enfermedades autoinmunes. Existen dos mecanismos esenciales para mantener la tolerancia inmunológica: la selección negativa en el timo y la inducción de anergia en las células T en periferia. En el timo, los timocitos que reciben una señal moderada procedente de la presentación antigénica son capaces de diferenciarse y proliferar, proceso que se denomina selección positiva. Por el contrario, los timocitos que reciben una señal fuerte mueren por apoptosis, proceso denominado selección negativa (Grossman and Singer 1996). La intensidad de la señal está determinada por el tipo de péptido presentado: si el péptido procede del propio organismo, la señal será fuerte y se dará una selección negativa, sin embargo, si el péptido es foráneo, la señal será moderada y se producirá una selección positiva de los timocitos (Grossman and Singer 1996; Sebzda, Mariathasan et al. 1999). La activación de los diferentes miembros de la familia de las MAPK quinasas es esencial para determinar la respuesta desencadenada y si la selección va a ser positiva o negativa. Así, la señal moderada da lugar preferentemente a la activación de ERK, mientras que la señal fuerte produce una potente activación de JNK y p38 (Gong, Cheng et al. 2001; Priatel, Teh et al. 2002). Por tanto, el balance entre la activación de ERK y la activación de JNK y p38 marca, en gran medida, el destino final del timocito. En este contexto, está descrito que RasGRP1, un GEF para Ras, está involucrado en la activación de ERK por el TCR, y por tanto es importante para la selección positiva (Dower, Stang et al. 2000; Priatel, Teh et al. 2002). RasGRP1 depende de DAG para su activación (Ebinu, Bottorff et al. 1998; Carrasco and Merida 2004), además, se sabe que DGK $\alpha$ , a partir de su actividad, disminuye la activación de RasGRP1 (Jones, Sanjuan et al. 2002; Sanjuan, Pradet-Balade et al. 2003). Aunque, los ratones KO para DGK $\alpha$  no revelan ningún defecto en las poblaciones de timocitos diferenciados (Olenchock, Guo et al. 2006), al igual que no lo hacen los ratones KO para DGK $\zeta$  (Zhong, Hainey et al. 2003), el doble KO de ambas proteínas, aunque aún no ha sido completamente descrito, sí parece presentar un número bajo de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tanto en timo como en periferia (Olenchock, Guo et al. 2006), lo que demuestra que la redundancia funcional de ambas proteínas existe y es importante para asegurar unos correctos niveles de DAG durante la diferenciación del timocito hacia célula T madura.

El otro gran mecanismo que permite garantizar la tolerancia inmunológica consiste en que todos aquellos timocitos autoreactivos que escapan a la selección negativa en el timo, y que maduran a células T en periferia, se conviertan en células anérgicas, células incapaces de responder a la estimulación antigénica (Nel 2002; Nel and Slaughter 2002; Schwartz 2003). En este proceso también es importante el papel que juega el DAG pues la activación de NFAT, un factor de transcripción dependiente de Ca<sup>2+</sup>, en ausencia de AP-1, un factor de transcripción dependiente de DAG, da lugar al establecimiento de un programa de expresión génica que impide a la célula T responder a la estimulación antigénica (Macian, Garcia-Cozar et al. 2002).

En el trabajo desarrollado en esta tesis hemos estudiado: la regulación de la expresión de DGK $\alpha$  durante la señalización desencadenada por el TCR; el papel de sus dominios en



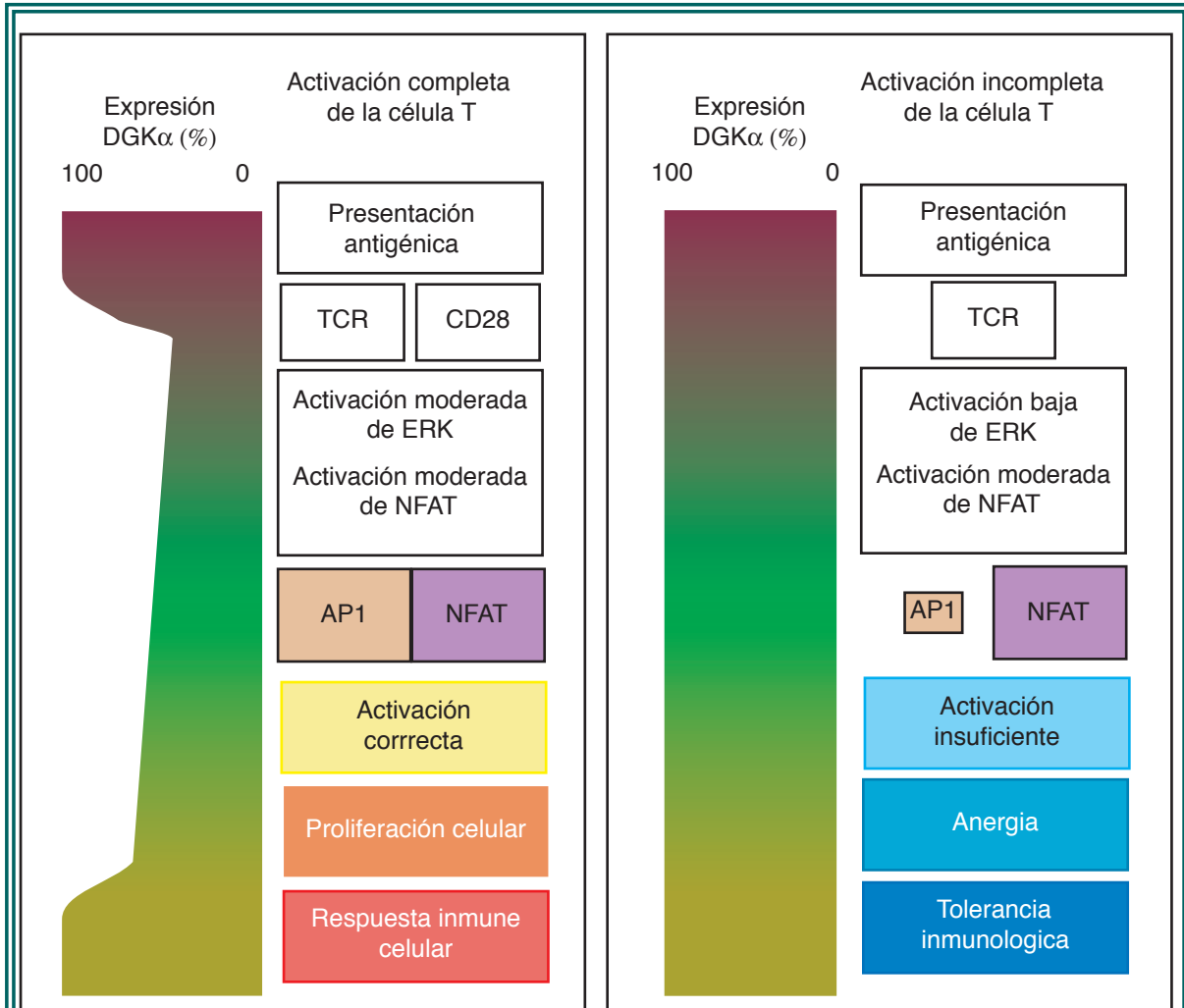
la localización de la proteína en la membrana plasmática; y los mecanismos que regulan su movilización a la membrana plasmática en respuesta al TCR.

### Regulación de la expresión de DGK $\alpha$ durante la activación del TCR

Trabajos anteriores desarrollados en nuestro grupo describieron que durante la estimulación antigénica de células T primarias de ratón los niveles de expresión de DGK $\alpha$  disminuyen (Sanjuan, Pradet-Balade et al. 2003). Los nuevos datos presentados en esta tesis demuestran que, ante una señal incompleta, es decir, una señal del TCR en ausencia de la señal de coestimulación procedente del receptor CD28, no se produce la disminución de los niveles de DGK $\alpha$ , por tanto, la señal desencadenada por el CD28 durante la activación de la célula T es importante para la regulación de los niveles de DGK $\alpha$ . Esto, en condiciones fisiológicas, aseguraría la necesidad de alcanzar un umbral de activación a través del TCR y del CD28 que provoque, entre otros efectos, la disminución de los niveles de DGK $\alpha$  y con ello unos niveles adecuados de DAG que conduzcan a la correcta activación de la célula T.

Los estudios llevados a cabo en esta tesis demuestran que los niveles de expresión de DGK $\alpha$  no sólo dependen de la señal del TCR y del CD28, sino, además, de la proliferación celular desencadenada por el TCR puesto que, cuando la célula T deja de proliferar, bien sea porque las células comienzan a agotar la IL2 o porque forzamos su inhibición farmacológicamente, los niveles de expresión de DGK $\alpha$  regresan a los que había antes de la estimulación. Según este mecanismo, una vez que la célula T deja de proliferar como consecuencia del fin de la respuesta inmune, el aumento de los niveles de DGK $\alpha$  podría estar contribuyendo a la generación de células T de memoria que sobreviven para generar una respuesta inmune más eficiente en caso de que el organismo entre de nuevo en contacto con el mismo patógeno.

¿Por qué es importante que las células T disminuyan sus niveles de DGK $\alpha$  tras el reconocimiento antigénico?. Para contestar a esta pregunta expresamos en células T, de forma ectópica, una DGK $\alpha$  constitutivamente activa, y posteriormente estudiamos la respuesta desencadenada. Los resultados obtenidos de dicho análisis demuestran que la actividad constitutiva de DGK $\alpha$  disminuye la expresión de proteínas esenciales para una correcta activación de la célula T, como son CD69, CD25, IL2 e INF $\gamma$ , proteínas que dependen del factor de transcripción AP-1. Además, la expresión ectópica de DGK $\alpha$  evita la muerte celular desencadenada por la activación de las células T (AICD), mecanismo esencial para la homeostasis celular durante la respuesta inmune. De este modo, aquellas células T que durante la respuesta inmune reciban una respuesta incompleta y no reduzcan sus niveles de DGK $\alpha$  podrían dar lugar a un grupo de células T con menos capacidad de respuesta a la presentación antigénica. Además, dado que aquellas células que en presencia de un estímulo antigénico desencadenan una activación de NFAT en ausencia de AP-1 se vuelven anérgicas (Macian, Garcia-Cozar et al. 2002), una mala regulación de la actividad DGK $\alpha$  podría desencadenar el mismo fenotipo (Figura 46).



**FIGURA 46. LA DISMINUCIÓN EN LA EXPRESIÓN DE DGK $\alpha$  EN RESPUESTA AL TCR DEPENDE DE LA SEÑAL DE COESTIMULACIÓN DEL CD28**

La señal desencadenada por el TCR en ausencia de la señal de coestimulación ejercida por CD28 no es suficiente para disminuir la expresión de DGK $\alpha$  en respuesta a la presentación antigénica. La disminución de DGK $\alpha$  está relacionada con un aumento de la actividad de ERK y con la correcta activación de AP-1 que, junto con la de NFAT, desencadena una activación correcta de la célula T y el desarrollo de la respuesta inmune celular. La ausencia de la señal a partir de CD28 provoca que, en respuesta al TCR, la activación de ERK y de AP-1 sea mucho menor frente a una activación normal de NFAT, lo que da lugar a una activación insuficiente de la célula T y al establecimiento del estado de anergia en dichas células.

El estudio de la producción de DAG y su metabolismo en el establecimiento de la anergia de las células T revela que cuando las células se vuelven anérgicas disminuye la expresión de PLC $\gamma$  (Heissmeyer, Macian et al. 2004), a la vez que aumenta la expresión de DGK $\alpha$  (Macian, Garcia-Cozar et al. 2002; Zha, Marks et al. 2006). Ambas proteínas son esenciales para regular los niveles de DAG, sin embargo su contribución al establecimiento de anergia probablemente sea diferente puesto que la actividad PLC $\gamma$ , además de generar DAG, da lugar al incremento de los niveles de Ca<sup>2+</sup> esenciales para el mantenimiento de la misma. Estos niveles de Ca<sup>2+</sup>, junto con el aumento de la expresión de DGK $\alpha$ , contribuiría al mantenimiento del estado de anergia. Apoyando esta hipótesis, la proteína DGK $\alpha$  ha sido

descrita recientemente como una proteína implicada en el establecimiento del estado de anergia de las células T, lo que corrobora nuestro modelo en el cual, la atenuación de la expresión de DGK $\alpha$  no se produce ante una activación incompleta de la célula T, mecanismo relacionado con la inducción de anergia. En estos estudios, la expresión ectópica de DGK $\alpha$  en células T da lugar a una menor activación de la ruta RasGRP1/Ras/ERK1-2 (Zha, Marks et al. 2006) y a la inducción de anergia, mientras que la ausencia de DGK $\alpha$  en un modelo de ratón KO para la proteína provoca que las células T tengan perjudicada la inducción de la misma (Olenchock, Guo et al. 2006).

Sin embargo, estos estudios no explican el mecanismo por el cual DGK $\alpha$ , una proteína fundamentalmente citosólica, cuyo sustrato, el DAG, se encuentra en la membrana plasmática, es capaz de movilizarse a dicha membrana tanto en la activación de las células T como en el establecimiento y/o mantenimiento del estado de anergia.

#### *Papel de los dominios de DGK $\alpha$ en su localización en la membrana plasmática*

Existen evidencias que demuestran que el Ca<sup>2+</sup> y las tirosinas quinasas son esenciales para la estabilización de DGK $\alpha$  en la membrana plasmática. Se ha demostrado que la mimetización de la entrada de Ca<sup>2+</sup> y de la actividad tirosina quinasa consigue que la proteína se movilice desde el citosol a la membrana (Sanjuan, Jones et al. 2001). El Ca<sup>2+</sup> se une directamente a los dominios tipo manos de Ca<sup>2+</sup>, además, puesto que si se truncan estos dominios en DGK $\alpha$ , ésta aparece constitutivamente asociada a la membrana, se ha sugerido que esta unión elimina la restricción negativa que los dominios tipo manos de Ca<sup>2+</sup> ejercen sobre la localización de la proteína en la membrana plasmática (Sanjuan, Jones et al. 2001). La truncación de estos dominios, no sólo afecta a la localización de la proteína, sino también a la actividad de la misma, de forma que el mutante de DGK $\alpha$  con la truncación de los dominios tipo manos de Ca<sup>2+</sup> posee mayor actividad que la forma silvestre y además ésta pasa a ser independiente de la unión a Ca<sup>2+</sup> (Jiang, Qian et al. 2000). La actividad DGK $\alpha$  es importante para inducir la disociación de la proteína de la membrana plasmática como lo demuestra el hecho de que un mutante de DGK $\alpha$  catalíticamente inactivo se moviliza a la membrana manteniéndose allí de forma sostenida, en lugar de transitoria como ocurre con la enzima silvestre (Sanjuan, Jones et al. 2001). Se ha sugerido que este mecanismo de retroalimentación negativa se da a través de las manos de Ca<sup>2+</sup> puesto que el mutante que carece de ellas, a pesar de tener más actividad que la forma silvestre está constitutivamente asociado a la membrana plasmática (Sanjuan, Jones et al. 2001).

Con estos antecedentes se desarrolló, en el transcurso de esta tesis, un estudio que demuestra que el mutante constitutivamente activo de DGK $\alpha$ , que ha perdido la restricción negativa de las manos de Ca<sup>2+</sup>, depende de la actividad PI3K para asociarse de manera constitutiva a la membrana plasmática (Cipres, Carrasco et al. 2003). Por tanto, además del Ca<sup>2+</sup> y de las tirosinas quinasas, también la generación de los productos de la actividad

PI3K contribuyen a la estabilización de la proteína en la membrana plasmática. Tanto los antecedentes como los nuevos resultados llevaron a estudiar los dominios que contribuyen a la estabilización de DGK $\alpha$  en la membrana plasmática y cómo contribuyen éstos a la movilización de la proteína desde el citosol a la membrana.

Para este estudio, se generaron varios mutantes de truncación de DGK $\alpha$  que afectan tanto a su extremo carboxilo como a los dominios tipo manos de Ca<sup>2+</sup>. El estudio de los mutantes reveló que, al igual que ocurre para DGK $\beta$  (Caricasole, Bettini et al. 2002), el extremo carboxilo terminal de DGK $\alpha$  determina la estabilización de la proteína en la membrana plasmática independientemente del estímulo, por lo que, se puede concluir que este extremo está involucrado de manera general en la localización de la proteína. Analizando más en detalle el extremo carboxilo encontramos un conjunto de aminoácidos con cargas positivas presentes en la parte más terminal, junto con una posible zona de giro constituida por un conjunto de prolinas conservadas en todas las DGKs de tipo I. Las cargas positivas podrían constituir un dominio de unión a moléculas cargadas negativamente, como ocurre en el caso de la proteína Raf-1 donde la mutación en su secuencia de aminoácidos del residuo de lisina 399 por alanina reduce en un 50% la unión a PA de la proteína, y la combinación de esta mutación con la de la arginina 401 por alanina reduce la unión en un 80% (Ghosh, Moore et al. 2003). De esta manera, el aumento de PA por la acción de DGK $\alpha$ , y el consiguiente aumento de la carga negativa de la membrana plasmática podrían dar lugar a una forma de estabilización de la proteína en dicha membrana.

Esta observación está de acuerdo con el hecho de que una mutación en el residuo glicina 433 que da lugar a una forma de DGK $\alpha$  catalíticamente inactiva (Topham, Bunting et al. 1998; Sanjuan, Jones et al. 2001), resulta en la deslocalización de la membrana plasmática del mutante que no posee la restricción negativa impuesta por las manos de Ca<sup>2+</sup>. Esto sugiere que cuando desaparece esta restricción negativa, la actividad de la proteína es importante para su estabilización en la membrana. Sin embargo, se observó que la mutación en la glicina 433 de la forma de DGK $\alpha$  que no posee las manos de Ca<sup>2+</sup>, no impide su movilización a la membrana en respuesta al TCR. Esto sugiere que en respuesta al TCR existe un mecanismo adicional que contribuye a estabilizar a DGK $\alpha$  en la membrana plasmática, y que es independiente de la integridad del dominio catalítico y de la unión del Ca<sup>2+</sup> a los dominios tipo manos de Ca<sup>2+</sup>. Este mecanismo, como ya se ha sugerido anteriormente (Sanjuan, Jones et al. 2001), puede estar relacionados con la actividad de las tirosinas quinasas.

Los resultados obtenidos permiten contemplar un modelo de regulación en el que la unión del Ca<sup>2+</sup> a los dominios tipo manos de Ca<sup>2+</sup> junto con la actividad de las tirosinas quinasas favorece un cambio conformacional que induce la translocación de DGK $\alpha$  del citosol a la membrana plasmática. En esta localización DGK $\alpha$ , a partir de DAG, genera PA que, en presencia de Ca<sup>2+</sup>, contribuye a la estabilización de la proteína a la membrana plasmática. Sin embargo, cuando el flujo de Ca<sup>2+</sup> cesa, el PA contribuirá a la conformación cerrada/citosólica

de la proteína, garantizando que DGK $\alpha$  actúe de manera concreta en el metabolismo del DAG producido por una PLC en respuesta al TCR, pero no en el metabolismo del DAG procedente de otras fuentes. Esta hipótesis explica además, por qué la mutación en la glicina 433 favorece una translocación sostenida de DGK $\alpha$  ya que, este mutante, al no producir PA, no posee el mecanismo de disociación de la membrana mediado por el producto de la actividad DGK $\alpha$ .

### Regulación de DGK $\alpha$ por la fosforilación en tirosina de la proteína

La proteína DGK $\alpha$  participa, a través de diferentes receptores, en diversas funciones celulares, a veces antagonicas (Cutrupi, Baldanzi et al. 2000; Cipres, Carrasco et al. 2003; Baldanzi, Mitola et al. 2004; Bacchiocchi, Baldanzi et al. 2005; Fukunaga-Takenaka, Shirai et al. 2005). La mayoría de estas funciones poseen en común la activación de DGK $\alpha$  por tirosinas quinasa, generalmente tirosinas quinasa de la familia Src. De especial interés ha sido el trabajo que estudia la activación de DGK $\alpha$  a través del factor de crecimiento hepático (HGF), donde la fosforilación de DGK $\alpha$  en el residuo de tirosina 335 parece ser importante para la función de la proteína (Baldanzi, Cutrupi et al. 2002), aunque el mecanismo no ha sido claramente determinado.

El estudio por mutagénesis dirigida de dicho residuo en el mutante de DGK $\alpha$  que tiene truncadas las manos de Ca<sup>2+</sup> y que carece de actividad catalítica revela que esta tirosina es esencial para el mecanismo de activación de la proteína en respuesta al TCR, independientemente de la estabilidad en la membrana que la actividad catalítica proporciona a DGK $\alpha$ . Además demuestra que una vez que se pierde la restricción negativa de las manos de Ca<sup>2+</sup>, éstas no juegan un papel esencial en la localización de la proteína en respuesta al TCR, sino que su función es la de mantener a DGK $\alpha$  en el citosol.

Durante la respuesta desencadenada por el TCR es esencial la activación de la tirosina quinasa Lck (Weiss and Littman 1994; van Leeuwen and Samelson 1999). En dicha activación participan diferentes proteínas como la tirosina quinasa CSK (Latour and Veillette 2001), las tirosinas fosfatasas CD45 y SHP-1 (Thomas 1995; Chiang and Sefton 2001), las proteínas ERK1/2 (Schroder, Quehl et al. 2000; Stefanova, Hemmer et al. 2003) y la propia actividad Lck (Abraham and Veillette 1990; Yamaguchi and Hendrickson 1996), lo que constituye un fino sistema de regulación. Tras la estimulación del TCR, Lck contribuye a la activación de otras tirosinas quinasa como son ZAP70 e ITK (Nel 2002; Nel and Slaughter 2002; Wilcox and Berg 2003). La activación de estas proteínas conduce a la activación de PLC $\gamma$ , y con ello a la producción de DAG (Wilde and Watson 2001). Pero Lck, además de colaborar en la activación de la respuesta desencadenada por el TCR, contribuye al apagado de la misma regulando a proteínas como SHP-1 (Lorenz, Ravichandran et al. 1994; Stefanova, Hemmer et al. 2003) y SHIP (Lamkin, Walk et al. 1997), esta última una fosfatasa de lípidos específica de la posición 5 del anillo del fosfatidilinositol-1,3,5-trifosfato y del anillo de fosfatidilinositol-1,3,4,5-tetrafosfato (Damen, Liu et al. 1996). La fosforilación directa de DGK $\alpha$  por parte de

Lck permite incluirla entre las proteínas que regulan la señal negativa del TCR.

Los estudios llevados a cabo durante este trabajo demuestran que el residuo de tirosina 335 de DGK $\alpha$ , situado entre los dominios C1 y el dominio catalítico de la proteína, es accesible a la fosforilación por Lck. Puesto que la sustitución de esta tirosina por un residuo no fosforilable (fenilalanina) impide la movilización de la proteína completa desde el citosol a la membrana plasmática se demuestra que este residuo es esencial para el mecanismo de activación a través del TCR. Sin embargo, en este mutante de DGK $\alpha$ , en el que la tirosina 335 está sustituida, otras tirosinas aparecen fosforiladas, lo que sugiere que otros residuos de tirosina pueden contribuir a la función de la proteína. Dicha contribución podría depender del receptor por el que se activa DGK $\alpha$  y/o de mecanismos adicionales de activación.

La obtención de un anticuerpo que reconoce de manera específica la fosforilación en la tirosina 335 de DGK $\alpha$  (anti-pY335DGK $\alpha$ ) ha permitido demostrar que esta fosforilación depende de la actividad de proteínas de la familia Src quinasa, siendo Lck la principal responsable de la misma. El hecho de que en las células HEK293 la fosforilación en el residuo de tirosina 335 se produzca en ausencia de Lck, y que en respuesta al  $\alpha$ -D-tocoferol la tirosina 335, por un mecanismo que depende de la proteína Src, sea esencial para la movilización de DGK $\alpha$  a la membrana plasmática (Fukunaga-Takenaka, Shirai et al. 2005), pone de manifiesto que existe cierta promiscuidad hacia otros miembros de la familia Src responsables de la fosforilación de la tirosina.

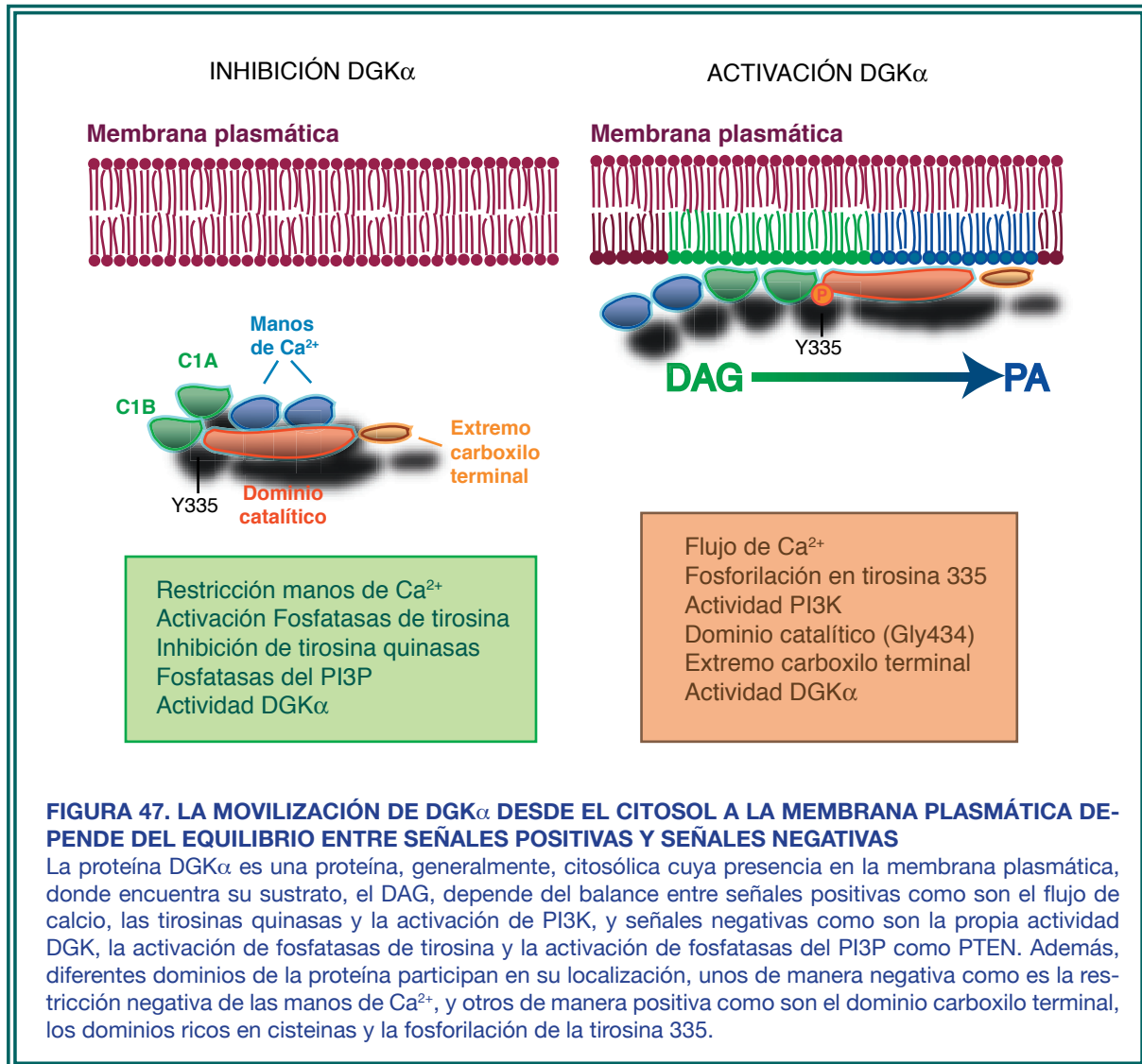
La fosforilación de DGK $\alpha$  por parte de Lck sugiere una interacción directa entre ambas proteínas. Los datos obtenidos en células HEK293 demuestran que cuando sobreexpresamos DGK $\alpha$  y Lck existe una interacción directa entre ambas. En células Jurkat la asociación de las proteínas endógenas Lck y DGK $\alpha$  es inducida en respuesta al TCR. Sin embargo, la forma de DGK $\alpha$  fosforilada en la tirosina 335 no se encuentra unida a Lck. Aunque no podemos descartar una baja resolución del anticuerpo anti-pY335DGK $\alpha$ , el resultado obtenido puede indicar que la fosforilación en tirosina 335 induce la asociación de DGK $\alpha$  con la membrana plasmática al mismo tiempo que su rápida disociación del complejo con Lck. El uso del anticuerpo anti-pY335DGK $\alpha$  demuestra que, aunque la mayor parte de DGK $\alpha$  es citosólica, la fracción de proteína asociada a la membrana está fosforilada, y que, en respuesta a la estimulación del TCR, se produce un aumento rápido y transitorio de la fosforilación en dicho residuo. Este aumento, aunque independiente de la señal de coestimulación procedente del receptor CD28, sí se ve aumentado en presencia de esta señal, demostrando, una vez más, la importancia de la señal procedente de CD28 para la modulación de la proteína.

Así, Lck garantiza que DGK $\alpha$  participa en la regulación de los niveles de DAG sin afectar otras funciones como es la regulación de la propia Lck, puesto que, entre otras funciones, el DAG es capaz de regular la función de Lck (Schroder, Quehl et al. 2000). Esta regulación, que consiste en la fosforilación de la serina 59 de Lck por un mecanismo que depende de la

actividad de ERK (Schroder, Quehl et al. 2000), induce un cambio conformacional que evita la unión del dominio SH2 de Lck a proteínas fosforiladas en tirosina como la fosfatasa de tirosinas SHP-1 (Joung, Kim et al. 1995; Stefanova, Hemmer et al. 2003), la cual, entre otras proteínas, defosforila a Lck en la tirosina 394, pasando esta a un estado menos activo (Chiang and Sefton 2001). Así, el DAG, haciendo inaccesible Lck a la fosfatasa SHP-1, garantiza la activación de una parte de Lck.

La actividad DGK $\alpha$  no sólo afecta a la estabilización de la proteína en la membrana plasmática, sino que además es importante para la regulación de su propia fosforilación, como lo demuestra el hecho de que la inhibición de la actividad DGK $\alpha$  aumenta el nivel de fosforilación en el residuo de tirosina 335. Así, en respuesta al TCR, DGK $\alpha$  actúa de una manera rápida y transitoria. El flujo de Ca<sup>2+</sup> y la fosforilación directa de la proteína por las tirosinas quinasas, junto con otras formas de regulación que influyen en la activación de DGK $\alpha$  como son el producto de la PI3K, la producción de PA y la composición lipídica de la membrana, dan lugar a un delicado mecanismo de activación de la enzima (Figura 47), donde el equilibrio de fuerzas entre las señales positivas y negativas determinará la correcta activación de DGK $\alpha$ , el nivel de la misma y el proceso o función biológica que desarrolla. Así, en condiciones en las que la activación de DGK $\alpha$  no se produzca correctamente, bien en su exceso o bien en su defecto, se producirán fenómenos de falta de respuesta o fenómenos de hiperactivación de las células T, respectivamente, ambos descritos previamente en el grupo (Jones, Sanjuan et al. 2002; Sanjuan, Pradet-Balade et al. 2003) y confirmados por los datos expuestos en esta tesis y recientemente por otros grupos (Olenchock, Guo et al. 2006).

La producción y el metabolismo del DAG en respuesta al TCR es un proceso en el que participan PLC $\gamma$  y DGK $\alpha$  de manera coordinada. En respuesta al TCR, la activación de PLC $\gamma$  no sólo garantiza la producción de DAG, sino que, a través del flujo de Ca<sup>2+</sup> que desencadena su otro producto, IP<sub>3</sub>, promueve la eliminación del DAG a través de la activación de DGK $\alpha$ . La proteína Lck, controlando ambos procesos, la producción y el metabolismo del DAG, puede considerarse como el eje central de la respuesta desencadenada por este segundo mensajero lipídico. En un futuro será interesante determinar, en condiciones en las que se produce la pérdida del balance entre la producción y el metabolismo del DAG, cómo DGK $\alpha$  participa en el mismo. Así mismo, en condiciones de anergia, donde la señal del Ca<sup>2+</sup> predomina frente a la de DAG, también será interesante determinar el estado de fosforilación de DGK $\alpha$ .



El estudio de la fosforilación de DGK $\alpha$  en el residuo tirosina 335 a lo largo de la activación de las células T humanas demuestra que esta fosforilación disminuye a lo largo de la misma y aumenta durante la proliferación celular. Si se incorporan estos resultados en el contexto de las funciones descritas para DGK $\alpha$  se puede proponer un modelo en el cual durante el comienzo de la activación de la célula T DGK $\alpha$  se fosforila de manera rápida y transitoria en el residuo tirosina 335, adquiriendo un estado activo, que metaboliza el DAG para evitar un exceso de este que diera lugar a una fuerte señal Ras/ERK/AP-1. Después, durante la activación tardía, la proteína se defosforila para permitir la expresión de proteínas que dependen de esta ruta. Entre estas proteínas se encuentran la cadena alfa del receptor IL2 de alta afinidad y la propia IL2, cuya expresión da paso a la proliferación celular a través de este receptor. En este punto, la proteína DGK $\alpha$  se vuelve a fosforilar para generar ácido fosfatídico y colaborar en dicha proliferación (Figura 48). De esta forma, la fosforilación en el residuo tirosina 335 de DGK $\alpha$  y su consiguiente activación, contribuyen a la proliferación celular de las células T de dos maneras: por un lado, reduciendo la expresión de IL2 y de



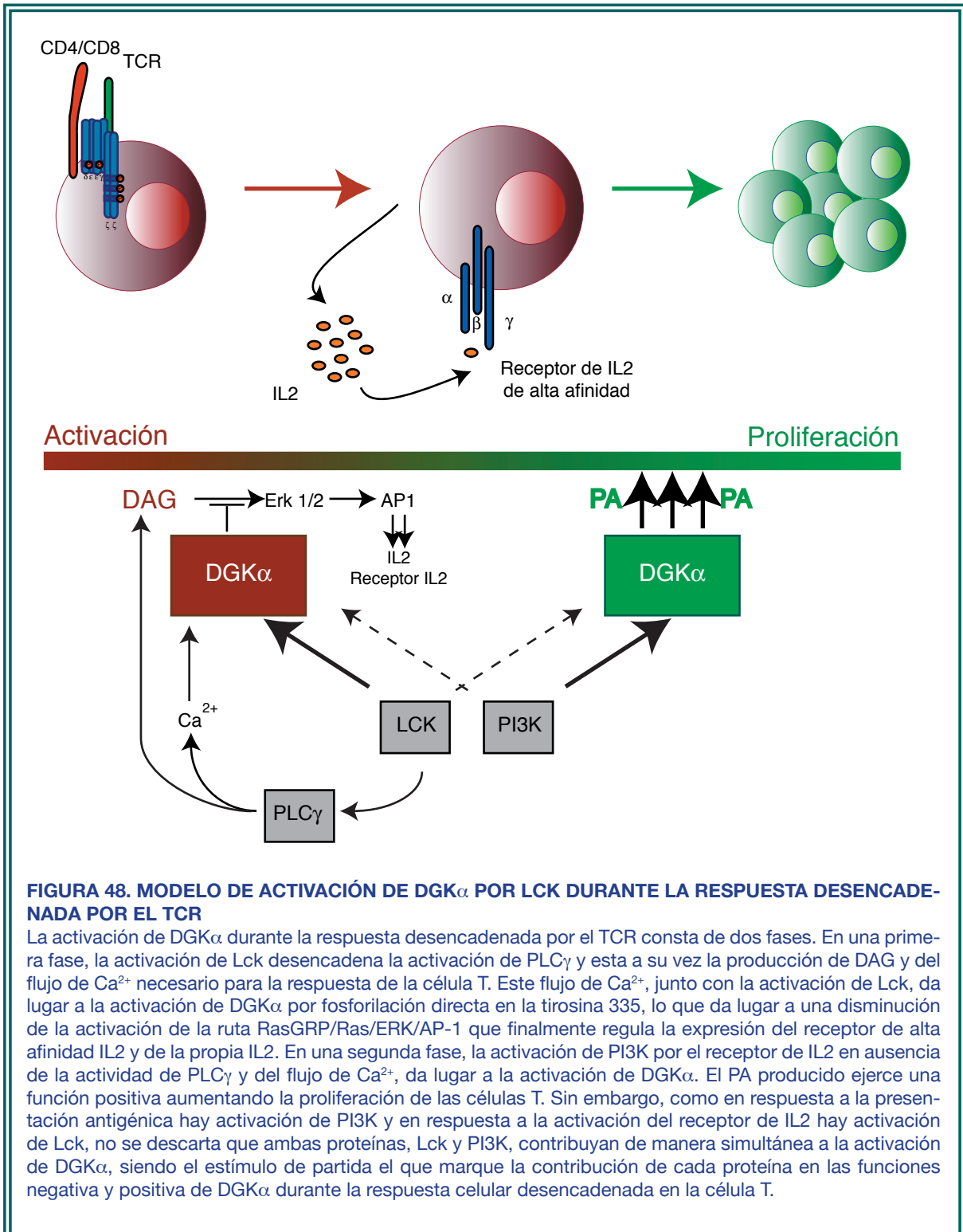
su receptor de alta afinidad en el comienzo de la activación, y por otro, generando el PA que promueve la propia proliferación celular. Sin embargo, en estudios anteriores llevados a cabo en el laboratorio, no se detectó ninguna fosforilación de DGK $\alpha$  en tirosina en respuesta al receptor de IL2, donde sí se describió que la actividad PI3K era fundamental para la activación en respuesta a IL2 (Cipres, Carrasco et al. 2003). La razón que explicaría esta diferencia podría estar en la diferente contribución que hacen Lck y PI3K en la activación de DGK $\alpha$  dependiendo del estímulo. Así, en respuesta a la presentación antigénica, donde Lck ejerce un papel principal en la respuesta desencadenada y se produce la activación de PLC $\gamma$  y por tanto un incremento de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático, PI3K se activa contribuyendo en menor medida a la activación de DGK $\alpha$ . Sin embargo, en respuesta a IL2, donde no hay activación de PLC $\gamma$ , la actividad PI3K sería el principal mecanismo de activación de DGK $\alpha$ , y la actividad Lck contribuiría, entonces, en menor medida. Aun así, esto no explica por qué la fosforilación de la proteína, aunque parece ser independiente del receptor de IL2, aumenta a lo largo de la proliferación. La diferencia podría consistir en que a diferencia de los estudios llevados a cabo en líneas celulares (Flores, Casaseca et al. 1996; Flores, Jones et al. 1999), en un sistema más fisiológico, como es la activación de células T primarias, IL2 provoca la fosforilación de DGK $\alpha$  aportando mayor complejidad al mecanismo de regulación de la proteína.

El estudio de la fosforilación de DGK $\alpha$  también ha revelado que en células T humanas, a diferencia del modelo de ratón (Sanjuan, Pradet-Balade et al. 2003), no se produce una regulación de los niveles de DGK $\alpha$  durante la activación desencadenada por el TCR. Aunque no han sido mostrados en esta tesis, los estudios realizados acerca de la fosforilación de la tirosina 335 durante la activación de las células T de ratón demuestran que dicha fosforilación también disminuye durante la activación. Comparando ambos modelos se puede afirmar que, mientras que en la activación de las células T de ratón la fosforilación de DGK $\alpha$  en el residuo de tirosina 335 y la expresión de la proteína disminuyen, en la activación de células humanas sólo disminuye la fosforilación de la proteína. El sentido biológico de esta diferencia de regulación queda aún por determinar. El hecho de que los humanos y los ratones sigan evoluciones diferentes desde hace 65 millones de años, y que en humanos haya desaparecido la regulación de los niveles de expresión durante la activación de las células T podría estar indicando que la regulación de los niveles de fosforilación de DGK $\alpha$  ha terminado por sustituir a la regulación de los niveles de expresión de la proteína durante la activación de la célula T.

### *Papel de DGK $\alpha$ en la proliferación celular*

La fosforilación de DGK $\alpha$  y su consiguiente activación durante la proliferación de las células T demuestra que la actividad DGK $\alpha$ , además de regular la activación de dichas células, es importante para los procesos proliferativos. Los trabajos realizados hasta ahora no exponen claramente la importancia de las tirosinas quinasas en la activación de la proteína durante los procesos proliferativos. En el caso del receptor de IL2 la enzima se activa por un mecanismo que depende de PI3K (Cipres, Carrasco et al. 2003), y en respuesta al VEGF

(Baldanzi, Mitola et al. 2004), donde si parece importante la actividad Src, no se observa fosforilación directa de la proteína. En los linfomas anaplásicos de célula grande (ALCL), concretamente en la línea tumoral Karpas 299, se ha descrito que la actividad  $DGK\alpha$  es esencial para la proliferación celular (Bacchiocchi, Baldanzi et al. 2005), y que la actividad Src es importante para la activación de la proteína (Bacchiocchi, Baldanzi et al. 2005).



**FIGURA 48. MODELO DE ACTIVACIÓN DE  $DGK\alpha$  POR LCK DURANTE LA RESPUESTA DESENCADENADA POR EL TCR**

La activación de  $DGK\alpha$  durante la respuesta desencadenada por el TCR consta de dos fases. En una primera fase, la activación de Lck desencadena la activación de PLC $\gamma$  y esta a su vez la producción de DAG y del flujo de  $Ca^{2+}$  necesario para la respuesta de la célula T. Este flujo de  $Ca^{2+}$ , junto con la activación de Lck, da lugar a la activación de  $DGK\alpha$  por fosforilación directa en la tirosina 335, lo que da lugar a una disminución de la activación de la ruta RasGRP/Ras/ERK/AP-1 que finalmente regula la expresión del receptor de alta afinidad IL2 y de la propia IL2. En una segunda fase, la activación de PI3K por el receptor de IL2 en ausencia de la actividad de PLC $\gamma$  y del flujo de  $Ca^{2+}$ , da lugar a la activación de  $DGK\alpha$ . El PA producido ejerce una función positiva aumentando la proliferación de las células T. Sin embargo, como en respuesta a la presentación antigénica hay activación de PI3K y en respuesta a la activación del receptor de IL2 hay activación de Lck, no se descarta que ambas proteínas, Lck y PI3K, contribuyan de manera simultánea a la activación de  $DGK\alpha$ , siendo el estímulo de partida el que marque la contribución de cada proteína en las funciones negativa y positiva de  $DGK\alpha$  durante la respuesta celular desencadenada en la célula T.

Los resultados presentados en esta tesis confirman la importancia de la actividad DGK $\alpha$  en la proliferación, no sólo en la línea tumoral Karpas 299, sino, además, en la línea tumoral SU-DHL1, otro linfoma ALCL. Ambos linfomas se caracterizan por la expresión de la tirosina quinasa NPM-ALK que da lugar a una fosforilación constitutiva en un gran número de proteínas (Morris, Kirstein et al. 1994; Kuefer, Look et al. 1997). El análisis de la fosforilación de DGK $\alpha$  en el residuo tirosina 335 en estas líneas revela que dicha fosforilación se produce incluso en ausencia de Lck. La razón que podría explicar este resultado es que, aunque no presentan expresión de Lck, si que hay expresión de Src, miembro de la familia que da nombre a la misma, que podría ser la responsable de la fosforilación de DGK $\alpha$ . Esta actividad Src es importante para la proliferación celular en estos tumores como reflejan los resultados obtenidos en este trabajo y los descritos (Bacchiocchi, Baldanzi et al. 2005). Sin embargo, la inhibición específica de la actividad Src apenas hace disminuir la fosforilación de DGK $\alpha$  en la tirosina 335, la cual si disminuye con la inhibición de la actividad de la tirosina quinasa NPM-ALK. Esto sugiere que en estos linfomas, NPM-ALK contribuye de dos maneras a la activación de DGK $\alpha$ , por un lado activando Src, y por otro lado fosforilando a DGK $\alpha$  de una manera directa o indirecta por otra tirosina quinasa regulada por NPM-ALK. Además, estos linfomas, a través de la actividad de NPM-ALK, presentan una activación constitutiva de las proteínas PI3K y PLC $\gamma$  (Bai, Dieter et al. 1998; Bai, Ouyang et al. 2000) cuyos productos respectivos, los fosfatidilinositoles trifosfato y el inositol trifosfato, podrían contribuir, junto con la fosforilación en la tirosina 335, a la activación de DGK $\alpha$ .

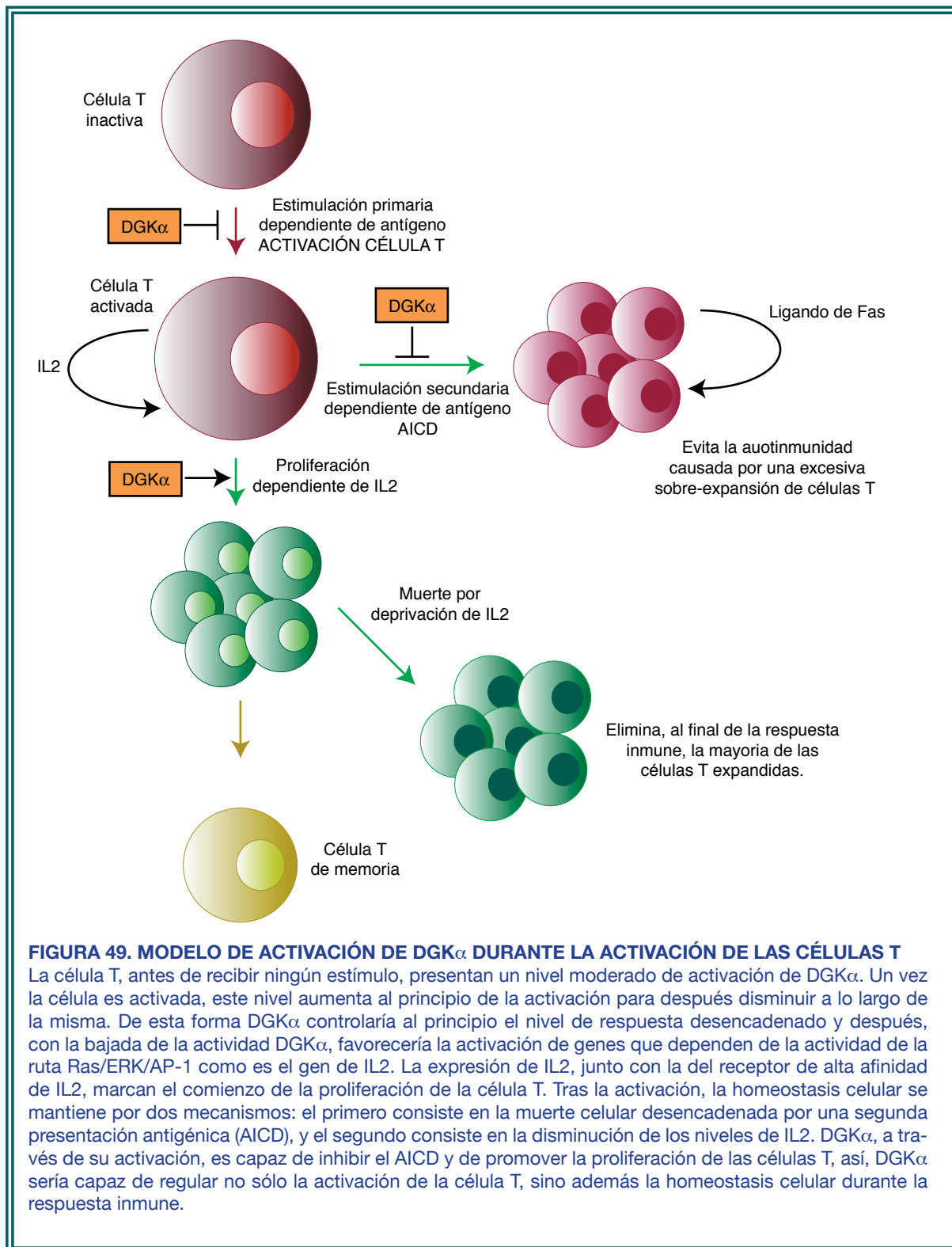
La actividad tirosina quinasa de la proteína NPM-ALK da lugar a la activación del factor de transcripción STAT3, que, a su vez promueve la expresión de IL-10, TGF- $\beta$  y FoxP3 (Kasprzycka, Marzec et al. 2006), proporcionando a estos linfomas un fenotipo de célula T reguladora (Treg) (Kasprzycka, Marzec et al. 2006). Las células Treg se caracterizan fenotípicamente por ser células T que expresan la molécula coreceptora CD4 y la cadena  $\alpha$  del receptor de IL2 de alta afinidad (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) (von Boehmer 2005). Estas células, durante la respuesta inmune mediada por el TCR, se activan de la misma manera y en los mismos sitios que las células T efectoras, y su activación conduce a la expresión de TGF- $\beta$  e IL-10, citoquinas necesarias para la función inmunosupresora que las células Treg ejercen sobre las células T efectoras (von Boehmer 2005). El estudio en las líneas tumorales Karpas 299 y SU-DHL1 de la influencia de DGK $\alpha$  en la activación de la proteína STAT3 como desencadenante del fenotipo Treg, revela que DGK $\alpha$  no afecta a su activación, por lo que se puede afirmar que la ruta o rutas afectadas por la actividad DGK $\alpha$  durante la proliferación celular de estos linfomas son independientes de la activación de STAT3, y, seguramente, de su fenotipo de célula Treg. Desde el punto de vista fisiológico, IL2 es necesaria para el mantenimiento de la población de células Treg (Malek 2003; Thornton, Donovan et al. 2004). y puesto que esta citoquina activa a DGK $\alpha$  es posible pensar que haya una relación entre la señal desencadenada por IL2, la posterior activación de DGK $\alpha$  y su papel en la proliferación y en el mantenimiento de la población de Treg, pero no en su fenotipo.

Aunque en esta tesis describimos la importancia de la actividad DGK $\alpha$  en la proliferación de los linfomas Karpas 299 y SU-DHL1, dicha actividad no afecta de igual manera a ambas líneas. En el caso de Karpas 299 apenas se produce muerte celular tras la inhibición de DGK $\alpha$ , sino más bien una ligera acumulación de las células en la fase G2/M del ciclo celular. Sin embargo, las células SU-DHL1 sufren un mayor grado de muerte celular con la misma dosis de inhibidor de DGK $\alpha$ . Esto supone un hecho diferencial entre ambas líneas celulares que podría venir determinado por las rutas desencadenadas en cada tipo celular. En las células de la línea SU-DHL1 la activación de ERK1/2 es más fuerte que en el caso de Karpas 299. Además, esta activación aumenta al inhibir DGK $\alpha$ , mientras que permanece invariable en el caso de las células Karpas 299. Puesto que la actividad de ERK1/2 está relacionada con la muerte celular (Yu, Levin et al. 2004), esto explicaría por qué DGK $\alpha$  afecta de manera diferente a ambos sistemas celulares, y pone de manifiesto que DGK $\alpha$  puede actuar de manera diferente a partir de las rutas desencadenadas, el nivel de las mismas y el peso específico dentro del conjunto de señales. Desde un punto de vista fisiológico, el fenotipo de las células de la línea Karpas 299 se asemeja más a una célula T proliferando, y el fenotipo de SU-DHL1 a una célula T al comienzo de la activación por el TCR. La inhibición de la actividad DGK $\alpha$  provoca una disminución de la proliferación en el primer caso, y apoptosis e inhibición de ERK en el segundo. Por otro lado, la fosforilación de DGK $\alpha$  en respuesta al TCR es alta al comienzo de la activación, disminuye durante la transición entre activación/proliferación y vuelve a aumentar durante la proliferación. Todos estos datos nos permiten proponer un modelo en el cual la fosforilación de DGK $\alpha$  en los tumores cumple tres funciones distintas: al principio de la activación regula ERK, a continuación regula la homeostasis celular, propiciando que ante una segunda activación del TCR las células mueran por apoptosis, y al final colabora en la proliferación de las células T (figura 49).

#### *Papel de DGK $\alpha$ en la regulación de la activación y proliferación linfocitaria.*

Los estudios desarrollados a lo largo de esta tesis demuestran que la actividad DGK $\alpha$  está regulada durante la activación de las células T y sugieren que esta regulación está basada en la expresión de la proteína y en la localización subcelular de la misma. La actividad DGK $\alpha$  es esencial para modular la cantidad y la cualidad de la señal procedente de la presentación antigénica, lo que determinará el desarrollo de una cadena de señalización que tiene como resultado la activación, diferenciación y proliferación de la célula T, o el establecimiento del estado de anergia. Experimentos recientes de otros laboratorios han demostrado que DGK $\alpha$  participa en la activación y en el establecimiento de anergia (Zha, Marks et al. 2006) (Olenchok, Guo et al. 2006). Sin embargo, en ninguno de estos casos se ha demostrado la influencia de la señal desencadenada por la presentación antigénica del TCR en la activación de la proteína. En esta tesis hemos llegado a determinar que la señal de coestimulación del CD28 es necesaria para disminuir la expresión de DGK $\alpha$  en respuesta al TCR y que la proliferación celular mantiene estos niveles bajos. Además, hemos caracterizado a la tirosina 335 como un residuo de DGK $\alpha$  esencial para la localización de la proteína en la membrana

plasmática, cuya fosforilación se regula por los niveles de  $Ca^{2+}$ . Dicha fosforilación permite modular el nivel de enzima activa presente en la membrana, cuya función es importante en la regulación de la respuesta antigénica y durante la proliferación de las células T.



**FIGURA 49. MODELO DE ACTIVACIÓN DE DGK $\alpha$  DURANTE LA ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS T**

La célula T, antes de recibir ningún estímulo, presentan un nivel moderado de activación de DGK $\alpha$ . Un vez la célula es activada, este nivel aumenta al principio de la activación para después disminuir a lo largo de la misma. De esta forma DGK $\alpha$  controlaría al principio el nivel de respuesta desencadenado y después, con la bajada de la actividad DGK $\alpha$ , favorecería la activación de genes que dependen de la actividad de la ruta Ras/ERK/AP-1 como es el gen de IL2. La expresión de IL2, junto con la del receptor de alta afinidad de IL2, marcan el comienzo de la proliferación de la célula T. Tras la activación, la homeostasis celular se mantiene por dos mecanismos: el primero consiste en la muerte celular desencadenada por una segunda presentación antigénica (AICD), y el segundo consiste en la disminución de los niveles de IL2. DGK $\alpha$ , a través de su activación, es capaz de inhibir el AICD y de promover la proliferación de las células T, así, DGK $\alpha$  sería capaz de regular no sólo la activación de la célula T, sino además la homeostasis celular durante la respuesta inmune.



**Conclusiones**





1. En respuesta al TCR, la proteína DGK $\alpha$  se fosforila en tirosina y se asocia a Lck. La tirosina 335, situada entre los dominios C1 y el dominio catalítico, se fosforila por un mecanismo que depende del flujo de Ca<sup>2+</sup> y de la actividad tirosina quinasa de Lck. Esta fosforilación es esencial para la movilización de DGK $\alpha$  desde el citosol a la membrana plasmática donde la proteína ejerce su función.
2. El estudio de los diferentes dominios de DGK $\alpha$  determina que una vez perdida la restricción negativa que suponen los dominios tipo manos de Ca<sup>2+</sup>, además de la tirosina 335, la actividad DGK $\alpha$  y el extremo C-terminal de la proteína pueden participar en la localización de DGK $\alpha$  en la membrana plasmática.
3. Durante la respuesta desencadenada por el TCR, la actividad PLC $\gamma$  y la actividad DGK $\alpha$  se encuentran coordinadas a través de la activación de Lck, por tanto, esta tirosina quinasa, como desencadenadora de la producción y el metabolismo del DAG, garantiza el correcto nivel de este segundo mensajero lipídico.
4. En el modelo de ratón, a diferencia del humano, durante la activación de las células T, además de por la localización subcelular de la proteína, la actividad de DGK $\alpha$  se encuentra regulada por la disminución de los niveles de expresión de la proteína. Esta regulación es esencial para modular la cantidad y la cualidad de la señal procedente de la presentación antigénica, lo que determinará el desarrollo de una cadena de señalización que tiene como resultado final la activación, diferenciación y proliferación de la célula T, o el establecimiento del estado de anergia.
5. La actividad DGK $\alpha$  aumenta la proliferación y la viabilidad celular de los linfomas anaplásicos de célula grande (ALCL), Karpas 299 y SU-DHL1, sin afectar la activación de STAT3 ni, por tanto, el fenotipo de célula T reguladora que presentan estas células. Estos linfomas expresan una proteína de fusión, NPM-ALK, que es un tirosina quinasa constitutivamente activa capaz de desencadenar la fosforilación de DGK $\alpha$  en el residuo de tirosina 335.
6. La fosforilación en tirosina 335 de DGK $\alpha$  aumenta durante la proliferación celular desencadenada por el TCR. Dado que esta fracción se corresponde con la fracción de proteína activa, es probable que DGK $\alpha$ , a través de la producción de PA, participe en la proliferación celular desencadenada por el TCR, lo que confirmaría la hipótesis de que DGK $\alpha$  es una enzima dual: durante la activación de la célula T ejerce un papel negativo disminuyendo los niveles de DAG generados, mientras que durante la proliferación contribuye positivamente a la misma.



# Bibliografía



- Abbas, A., Lichtman, AH, Pober, JS (2000). Cellular and Molecular Immunology.
- Abbas, A. K. and C. A. Janeway, Jr. (2000). "Immunology: improving on nature in the twenty-first century." *Cell* 100(1): 129-38.
- Abe, T., X. Lu, et al. (2003). "Site-directed mutagenesis of the active site of diacylglycerol kinase alpha: calcium and phosphatidylserine stimulate enzyme activity via distinct mechanisms." *Biochem J* 375(Pt 3): 673-80.
- Abraham, N. and A. Veillette (1990). "Activation of p56lck through mutation of a regulatory carboxy-terminal tyrosine residue requires intact sites of autophosphorylation and myristylation." *Mol Cell Biol* 10(10): 5197-206.
- Alonso, R., C. Mazzeo, et al. (2006). "A new role of diacylglycerol kinase alpha on the secretion of lethal exosomes bearing Fas ligand during activation-induced cell death of T lymphocytes." *Biochimie*.
- Alonso, R., M. C. Rodriguez, et al. (2005). "Diacylglycerol kinase alpha regulates the secretion of lethal exosomes bearing Fas ligand during activation-induced cell death of T lymphocytes." *J Biol Chem* 280(31): 28439-50.
- Asaoka, Y., S. Nakamura, et al. (1992). "Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation." *Trends Biochem Sci* 17(10): 414-7.
- Bacchiocchi, R., G. Baldanzi, et al. (2005). "Activation of alpha-diacylglycerol kinase is critical for the mitogenic properties of anaplastic lymphoma kinase." *Blood* 106(6): 2175-82.
- Bai, R. Y., P. Dieter, et al. (1998). "Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of large-cell anaplastic lymphoma is a constitutively active tyrosine kinase that utilizes phospholipase C-gamma to mediate its mitogenicity." *Mol Cell Biol* 18(12): 6951-61.
- Bai, R. Y., T. Ouyang, et al. (2000). "Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase associated with anaplastic large-cell lymphoma activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic signaling pathway." *Blood* 96(13): 4319-27.
- Baldanzi, G., S. Cutrupi, et al. (2002). alpha-diacylglycerol kinase is activated by Src and growth factors through tyrosine phosphorylation. *Keystone Symposia. Regulation of Cellular Responses by Lipid Mediators. Poster session*.
- Baldanzi, G., S. Mitola, et al. (2004). "Activation of diacylglycerol kinase alpha is required for VEGF-induced angiogenic signaling in vitro." *Oncogene* 23(28): 4828-38.
- Berridge, M. J. (1997). "Lymphocyte activation in health and disease." *Crit Rev Immunol* 17(2): 155-78.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et al. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 11-21.
- Bi, K., Y. Tanaka, et al. (2001). "Antigen-induced translocation of PKC-theta to membrane rafts is required for T cell activation." *Nat Immunol* 2(6): 556-63.
- Boussiotis, V. A., G. J. Freeman, et al. (1997). "Maintenance of human T cell energy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1." *Science* 278(5335): 124-8.
- Bowtell, D., P. Fu, et al. (1992). "Identification of murine homologues of the Drosophila son of sevenless gene: potential activators of ras." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(14): 6511-5.
- Brockdorff, J., S. Williams, et al. (1999). "Dephosphorylation of ZAP-70 and inhibition of T cell activation by activated SHP1." *Eur J Immunol* 29(8): 2539-50.
- Buday, L., S. E. Egan, et al. (1994). "A complex of Grb2 adaptor protein, Sos exchange factor, and a 36-kDa membrane-bound tyrosine phosphoprotein is implicated in ras activation in T cells." *J Biol Chem* 269(12): 9019-23.

- Bunting, M., W. Tang, et al. (1996). "Molecular cloning and characterization of a novel human diacylglycerol kinase zeta." *J Biol Chem* **271**(17): 10230-6.
- Cao, Y., E. M. Janssen, et al. (2002). "Pleiotropic defects in TCR signaling in a Vav-1-null Jurkat T-cell line." *Embo J* **21**(18): 4809-19.
- Caricasole, A., E. Bettini, et al. (2002). "Molecular cloning and characterization of the human diacylglycerol kinase beta (DGKbeta) gene: alternative splicing generates DGKbeta isoforms with different properties." *J Biol Chem* **277**(7): 4790-6.
- Carrasco, S. and I. Merida (2004). "Diacylglycerol-dependent binding recruits PKCtheta and RasGRP1 C1 domains to specific subcellular localizations in living T lymphocytes." *Mol Biol Cell* **15**(6): 2932-42.
- Carrasco, S. and I. Merida (2007). "Diacylglycerol, when simplicity becomes complex." *Trends Biochem Sci* **32**(1): 27-36.
- Castellanos, M. C., C. Munoz, et al. (1997). "Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1." *J Immunol* **159**(11): 5463-73.
- Chan, I. T., A. Limmer, et al. (1993). "Thymic selection of cytotoxic T cells independent of CD8 alpha-Lck association." *Science* **261**(5128): 1581-4.
- Chan, W. Y., Q. R. Liu, et al. (1989). "Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth." *Biochemistry* **28**(3): 1033-9.
- Chang, J. S., D. Y. Noh, et al. (1997). "Overexpression of phospholipase C-gamma1 in rat 3Y1 fibroblast cells leads to malignant transformation." *Cancer Res* **57**(24): 5465-8.
- Chiang, G. G. and B. M. Sefton (2001). "Specific dephosphorylation of the Lck tyrosine protein kinase at Tyr-394 by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase." *J Biol Chem* **276**(25): 23173-8.
- Cipres, A., S. Carrasco, et al. (2003). "Regulation of diacylglycerol kinase alpha by phosphoinositide 3-kinase lipid products." *J Biol Chem* **278**(37): 35629-35.
- Clark, G. J., J. K. Drugan, et al. (1997). "14-3-3 zeta negatively regulates raf-1 activity by interactions with the Raf-1 cysteine-rich domain." *J Biol Chem* **272**(34): 20990-3.
- Clements, J. L., B. Yang, et al. (1998). "Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development." *Science* **281**(5375): 416-9.
- Clyde-Smith, J., G. Silins, et al. (2000). "Characterization of RasGRP2, a plasma membrane-targeted, dual specificity Ras/Rap exchange factor." *J Biol Chem* **275**(41): 32260-7.
- Coudronniere, N., M. Villalba, et al. (2000). "NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3394-9.
- Coughlin, J. J., S. L. Stang, et al. (2005). "RasGRP1 and RasGRP3 regulate B cell proliferation by facilitating B cell receptor-Ras signaling." *J Immunol* **175**(11): 7179-84.
- Crabtree, G. R. (1999). "Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT." *Cell* **96**(5): 611-4.
- Crittenden, J. R., W. Bergmeier, et al. (2004). "CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation." *Nat Med* **10**(9): 982-6.
- Crotty, T., J. Cai, et al. (2006). "Diacylglycerol kinase delta regulates protein kinase C and epidermal growth factor receptor signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(42): 15485-90.
- Cussac, D., C. Greenland, et al. (2004). "Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase of

- anaplastic large-cell lymphoma recruits, activates, and uses pp60c-src to mediate its mitogenicity." *Blood* **103**(4): 1464-71.
- Cutrupi, S., G. Baldanzi, et al. (2000). "Src-mediated activation of alpha-diacylglycerol kinase is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility." *Embo J* **19**(17): 4614-22.
- D'Ambrosio, D., D. A. Cantrell, et al. (1994). "Involvement of p21ras activation in T cell CD69 expression." *Eur J Immunol* **24**(3): 616-20.
- Damen, J. E., L. Liu, et al. (1996). "The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4): 1689-93.
- de Chaffoy de Courcelles, D., P. Roevens, et al. (1989). "The role of endogenously formed diacylglycerol in the propagation and termination of platelet activation. A biochemical and functional analysis using the novel diacylglycerol kinase inhibitor, R 59 949." *J Biol Chem* **264**(6): 3274-85.
- de Chaffoy de Courcelles, D. C., P. Roevens, et al. (1985). "R 59 022, a diacylglycerol kinase inhibitor. Its effect on diacylglycerol and thrombin-induced C kinase activation in the intact platelet." *J Biol Chem* **260**(29): 15762-70.
- Dequiedt, F., J. Van Lint, et al. (2005). "Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis." *J Exp Med* **201**(5): 793-804.
- Diaz-Flores, E., M. Siliceo, et al. (2003). "Membrane translocation of protein kinase C $\theta$  during T lymphocyte activation requires phospholipase C-gamma-generated diacylglycerol." *J Biol Chem* **278**(31): 29208-15.
- Diehn, M., A. A. Alizadeh, et al. (2002). "Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18): 11796-801.
- Ding, L., T. M. McIntyre, et al. (1998). "The cloning and developmental regulation of murine diacylglycerol kinase zeta." *FEBS Lett* **429**(1): 109-14.
- Dong, C., D. D. Yang, et al. (1998). "Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1." *Science* **282**(5396): 2092-5.
- Dong, S., B. Corre, et al. (2006). "T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2." *J Exp Med* **203**(11): 2509-18.
- Dower, N. A., S. L. Stang, et al. (2000). "RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling." *Nat Immunol* **1**(4): 317-21.
- Ebinu, J. O., D. A. Bottorff, et al. (1998). "RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs." *Science* **280**(5366): 1082-6.
- Ebinu, J. O., S. L. Stang, et al. (2000). "RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras." *Blood* **95**(10): 3199-203.
- Ehrhardt, A., G. R. Ehrhardt, et al. (2002). "Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together." *Exp Hematol* **30**(10): 1089-106.
- Fanani, M. L., M. K. Topham, et al. (2004). "Lipid modulation of the activity of diacylglycerol kinase alpha- and zeta-isoforms: activation by phosphatidylethanolamine and cholesterol." *Biochemistry* **43**(46): 14767-77.
- Feske, S., J. Giltzane, et al. (2001). "Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes." *Nat Immunol* **2**(4): 316-24.
- Fields, P. E., T. F. Gajewski, et al. (1996). "Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells."

- Science* **271**(5253): 1276-8.
- Flores, I., T. Casaseca, et al. (1996). "Phosphatidic acid generation through interleukin 2 (IL-2)-induced alpha-diacylglycerol kinase activation is an essential step in IL-2-mediated lymphocyte proliferation." *J Biol Chem* **271**(17): 10334-40.
- Flores, I., D. R. Jones, et al. (1999). "Diacylglycerol kinase inhibition prevents IL-2-induced G1 to S transition through a phosphatidylinositol-3 kinase-independent mechanism." *J Immunol* **163**(2): 708-14.
- Frank, C., H. Keilhack, et al. (1999). "Binding of phosphatidic acid to the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 as a basis for activity modulation." *Biochemistry* **38**(37): 11993-2002.
- Fukunaga-Takenaka, R., Y. Shirai, et al. (2005). "Importance of chroman ring and tyrosine phosphorylation in the subtype-specific translocation and activation of diacylglycerol kinase alpha by D-alpha-tocopherol." *Genes Cells* **10**(4): 311-9.
- Genot, E. and D. A. Cantrell (2000). "Ras regulation and function in lymphocytes." *Curr Opin Immunol* **12**(3): 289-94.
- Ghosh, S., S. Moore, et al. (2003). "Functional analysis of a phosphatidic acid binding domain in human Raf-1 kinase: mutations in the phosphatidate binding domain lead to tail and trunk abnormalities in developing zebrafish embryos." *J Biol Chem* **278**(46): 45690-6.
- Ghosh, S., J. C. Strum, et al. (1996). "Raf-1 kinase possesses distinct binding domains for phosphatidylserine and phosphatidic acid. Phosphatidic acid regulates the translocation of Raf-1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-stimulated Madin-Darby canine kidney cells." *J Biol Chem* **271**(14): 8472-80.
- Giannini, A. and M. J. Bijlmakers (2004). "Regulation of the Src family kinase Lck by Hsp90 and ubiquitination." *Mol Cell Biol* **24**(13): 5667-76.
- Glaichenhaus, N., N. Shastri, et al. (1991). "Requirement for association of p56lck with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells." *Cell* **64**(3): 511-20.
- Gong, Q., A. M. Cheng, et al. (2001). "Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency." *Nat Immunol* **2**(1): 29-36.
- Goto, K. and H. Kondo (1996). "A 104-kDa diacylglycerol kinase containing ankyrin-like repeats localizes in the cell nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 11196-201.
- Goto, K. and H. Kondo (1999). "Diacylglycerol kinase in the central nervous system--molecular heterogeneity and gene expression." *Chem Phys Lipids* **98**(1-2): 109-17.
- Grossman, Z. and A. Singer (1996). "Tuning of activation thresholds explains flexibility in the selection and development of T cells in the thymus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14747-52.
- Hancock, J. F. (2003). "Ras proteins: different signals from different locations." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(5): 373-84.
- Harden, N., S. F. Yap, et al. (1993). "A Drosophila gene encoding a protein with similarity to diacylglycerol kinase is expressed in specific neurons." *Biochem J* **289** (Pt 2): 439-44.
- Heissmeyer, V., F. Macian, et al. (2004). "Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins." *Nat Immunol* **5**(3): 255-65.
- Hoeverler, A. and B. Malissen (1993). "The cysteine residues in the cytoplasmic tail of CD8 alpha are required for its coreceptor function." *Mol Immunol* **30**(8): 755-64.
- Hofmann, T., A. G. Obukhov, et al. (1999). "Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol." *Nature* **397**(6716): 259-63.
- Honda, A., M. Nogami, et al. (1999). "Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation." *Cell*



- 99(5): 521-32.
- Housey, G. M., M. D. Johnson, et al. (1988). "Overproduction of protein kinase C causes disordered growth control in rat fibroblasts." Cell **52**(3): 343-54.
- Houssa, B., J. de Widt, et al. (1999). "Diacylglycerol kinase theta binds to and is negatively regulated by active RhoA." J Biol Chem **274**(11): 6820-2.
- Houssa, B., D. Schaap, et al. (1997). "Cloning of a novel human diacylglycerol kinase (DGKtheta) containing three cysteine-rich domains, a proline-rich region, and a pleckstrin homology domain with an overlapping Ras-associating domain." J Biol Chem **272**(16): 10422-8.
- Houtman, J. C., R. A. Houghtling, et al. (2005). "Early phosphorylation kinetics of proteins involved in proximal TCR-mediated signaling pathways." J Immunol **175**(4): 2449-58.
- Hurley, J. H., A. C. Newton, et al. (1997). "Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains." Protein Sci **6**(2): 477-80.
- Imai, S. I., M. Kai, et al. (2005). "Identification and characterization of a novel human type II diacylglycerol kinase, DGKkappa." J Biol Chem.
- Isakov, N. and A. Altman (2002). "Protein kinase C(theta) in T cell activation." Annu Rev Immunol **20**: 761-94.
- Iwahara, T., J. Fujimoto, et al. (1997). "Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system." Oncogene **14**(4): 439-49.
- Jiang, Y., W. Qian, et al. (2000). "A domain with homology to neuronal calcium sensors is required for calcium-dependent activation of diacylglycerol kinase alpha." J Biol Chem **275**(44): 34092-9.
- Jiang, Y., F. Sakane, et al. (2000). "Selectivity of the diacylglycerol kinase inhibitor 3-[2-(4-[bis-(4-fluorophenyl)methylene]-1-piperidinyl)ethyl]-2, 3-dihydro-2-thioxo-4(1H)quinazolinone (R59949) among diacylglycerol kinase subtypes." Biochem Pharmacol **59**(7): 763-72.
- Jones, D. R., M. A. Sanjuan, et al. (2002). "Expression of a catalytically inactive form of diacylglycerol kinase alpha induces sustained signaling through RasGRP." Faseb J **16**(6): 595-7.
- Jones, G. A. and G. Carpenter (1993). "The regulation of phospholipase C-gamma 1 by phosphatidic acid. Assessment of kinetic parameters." J Biol Chem **268**(28): 20845-50.
- Joung, I., T. Kim, et al. (1995). "Modification of Ser59 in the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck regulates specificity of its Src homology 2 domain." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(13): 5778-82.
- Kabouridis, P. S., A. I. Magee, et al. (1997). "S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes." Embo J **16**(16): 4983-98.
- Kanoh, H., K. Yamada, et al. (1990). "Diacylglycerol kinase: a key modulator of signal transduction?" Trends Biochem Sci **15**(2): 47-50.
- Kasprzycka, M., M. Marzec, et al. (2006). "Nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase (NPM/ALK) oncoprotein induces the T regulatory cell phenotype by activating STAT3." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(26): 9964-9.
- Katagiri, T., T. Mizoguchi, et al. (1996). "Molecular cloning of a cDNA encoding diacylglycerol kinase (DGK) in Arabidopsis thaliana." Plant Mol Biol **30**(3): 647-53.
- Kato, H., S. Kawai, et al. (1988). "Disappearance of diacylglycerol kinase translocation in ras-transformed cells." Biochem Biophys Res Commun **154**(3): 959-66.

- Kato, M., S. Kawai, et al. (1987). "Altered signal transduction in erbB-transformed cells. Implication of enhanced inositol phospholipid metabolism in erbB-induced transformation." *J Biol Chem* **262**(12): 5696-704.
- Kawasaki, H., G. M. Springett, et al. (1998). "A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(22): 13278-83.
- Kazanietz, M. G. (2000). "Eyes wide shut: protein kinase C isozymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters." *Mol Carcinog* **28**(1): 5-11.
- Killeen, N. and D. R. Littman (1993). "Helper T-cell development in the absence of CD4-p56lck association." *Nature* **364**(6439): 729-32.
- Kitayama, H., Y. Sugimoto, et al. (1989). "A ras-related gene with transformation suppressor activity." *Cell* **56**(1): 77-84.
- Koegl, M., P. Zlatkine, et al. (1994). "Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif." *Biochem J* **303** (Pt 3): 749-53.
- Kon-Kozlowski, M., G. Pani, et al. (1996). "The tyrosine phosphatase PTP1C associates with Vav, Grb2, and mSos1 in hematopoietic cells." *J Biol Chem* **271**(7): 3856-62.
- Kuefer, M. U., A. T. Look, et al. (1997). "Retrovirus-mediated gene transfer of NPM-ALK causes lymphoid malignancy in mice." *Blood* **90**(8): 2901-10.
- Kurosaki, T. and S. Tsukada (2000). "BLNK: connecting Syk and Btk to calcium signals." *Immunity* **12**(1): 1-5.
- Lamkin, T. D., S. F. Walk, et al. (1997). "Shc interaction with Src homology 2 domain containing inositol phosphatase (SHIP) in vivo requires the Shc-phosphotyrosine binding domain and two specific phosphotyrosines on SHIP." *J Biol Chem* **272**(16): 10396-401.
- Latour, S. and A. Veillette (2001). "Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling." *Curr Opin Immunol* **13**(3): 299-306.
- Layer, K., G. Lin, et al. (2003). "Autoimmunity as the consequence of a spontaneous mutation in Rasgrp1." *Immunity* **19**(2): 243-55.
- Lenardo, M. J. (1997). "The molecular regulation of lymphocyte apoptosis." *Semin Immunol* **9**(1): 1-5.
- Li, L., Y. Yang, et al. (2002). "Cloning of rat Ras guanine nucleotide releasing protein 4, and evaluation of its expression in rat mast cells and their bone marrow progenitors." *Mol Immunol* **38**(16-18): 1283-8.
- Li, W., C. D. Whaley, et al. (1996). "Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4+ T cells." *Science* **271**(5253): 1272-6.
- Lightner, V. A., R. M. Bell, et al. (1983). "The DNA sequences encoding plsB and dgk loci of Escherichia coli." *J Biol Chem* **258**(18): 10856-61.
- Limatola, C., D. Schaap, et al. (1994). "Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isotypes and other acidic lipids." *Biochem J* **304** (Pt 3): 1001-8.
- Liu, K. Q., S. C. Bunnell, et al. (1998). "T cell receptor-initiated calcium release is uncoupled from capacitative calcium entry in Itk-deficient T cells." *J Exp Med* **187**(10): 1721-7.
- Liu, Y., M. Zhu, et al. (2006). "An essential role for RasGRP1 in mast cell function and IgE-mediated allergic response." *J Exp Med*.
- Lorenz, U., K. S. Ravichandran, et al. (1994). "Lck-dependent tyrosyl phosphorylation of the phosphotyrosine phosphatase SH-PTP1 in murine T cells." *Mol Cell Biol* **14**(3): 1824-34.
- Lukiw, W. J., J. G. Cui, et al. (2005). "Epileptogenesis in diacylglycerol kinase epsilon

- deficiency up-regulates COX-2 and tyrosine hydroxylase in hippocampus.” Biochem Biophys Res Commun **338**(1): 77-81.
- Luo, B., S. M. Prescott, et al. (2003). “Association of diacylglycerol kinase zeta with protein kinase C alpha: spatial regulation of diacylglycerol signaling.” J Cell Biol **160**(6): 929-37.
- Luo, B., S. M. Prescott, et al. (2003). “Protein kinase C alpha phosphorylates and negatively regulates diacylglycerol kinase zeta.” J Biol Chem **278**(41): 39542-7.
- Macian, F., F. Garcia-Cozar, et al. (2002). “Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance.” Cell **109**(6): 719-31.
- Malek, T. R. (2003). “The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells.” J Leukoc Biol **74**(6): 961-5.
- Martin-Cofreces, N. B., D. Sancho, et al. (2006). “Role of Fyn in the rearrangement of tubulin cytoskeleton induced through TCR.” J Immunol **176**(7): 4201-7.
- Marzec, M., M. Kasprzycka, et al. (2005). “Inhibition of ALK enzymatic activity in T-cell lymphoma cells induces apoptosis and suppresses proliferation and STAT3 phosphorylation independently of Jak3.” Lab Invest **85**(12): 1544-54.
- Masai, I., T. Hosoya, et al. (1992). “Molecular cloning of a Drosophila diacylglycerol kinase gene that is expressed in the nervous system and muscle.” Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 6030-4.
- Masai, I., A. Okazaki, et al. (1993). “Drosophila retinal degeneration A gene encodes an eye-specific diacylglycerol kinase with cysteine-rich zinc-finger motifs and ankyrin repeats.” Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 11157-61.
- Matthews, S. A. and D. A. Cantrell (2006). “The role of serine/threonine kinases in T-cell activation.” Curr Opin Immunol **18**(3): 314-20.
- Medeiros, R. B., D. M. Dickey, et al. (2005). “Protein kinase D1 and the beta 1 integrin cytoplasmic domain control beta 1 integrin function via regulation of Rap1 activation.” Immunity **23**(2): 213-26.
- Monks, C. R., H. Kupfer, et al. (1997). “Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation.” Nature **385**(6611): 83-6.
- Moritz, A., P. N. De Graan, et al. (1992). “Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase.” J Biol Chem **267**(11): 7207-10.
- Morris, S. W., M. N. KIRSTEIN, et al. (1994). “Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin’s lymphoma.” Science **263**(5151): 1281-4.
- Nel, A. E. (2002). “T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse.” J Allergy Clin Immunol **109**(5): 758-70.
- Nel, A. E. and N. Slaughter (2002). “T-cell activation through the antigen receptor. Part 2: role of signaling cascades in T-cell differentiation, anergy, immune senescence, and development of immunotherapy.” J Allergy Clin Immunol **109**(6): 901-15.
- Newton, A. C. (1995). “Protein kinase C: structure, function, and regulation.” J Biol Chem **270**(48): 28495-8.
- Nimmual, A. S., B. A. Yatsula, et al. (1998). “Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos.” Science **279**(5350): 560-3.
- Ohba, Y., N. Mochizuki, et al. (2000). “Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3.” J Biol Chem **275**(26): 20020-6.
- Olenchock, B. A., R. Guo, et al. (2006). “Disruption of diacylglycerol metabolism impairs the induction of T cell anergy.” Nat Immunol.

- Olenchock, B. A., R. Guo, et al. (2006). "Impaired degranulation but enhanced cytokine production after Fc epsilonRI stimulation of diacylglycerol kinase zeta-deficient mast cells." *J Exp Med* **203**(6): 1471-80.
- Pitson, S. M., P. A. Moretti, et al. (2002). "The nucleotide-binding site of human sphingosine kinase 1." *J Biol Chem* **277**(51): 49545-53.
- Plas, D. R., R. Johnson, et al. (1996). "Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling." *Science* **272**(5265): 1173-6.
- Preiss, J., C. R. Loomis, et al. (1986). "Quantitative measurement of sn-1,2-diacylglycerols present in platelets, hepatocytes, and ras- and sis-transformed normal rat kidney cells." *J Biol Chem* **261**(19): 8597-600.
- Priatel, J. J., S. J. Teh, et al. (2002). "RasGRP1 transduces low-grade TCR signals which are critical for T cell development, homeostasis, and differentiation." *Immunity* **17**(5): 617-27.
- Putney, J. W., Jr. (1997). "Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and capacitative calcium entry." *Cell Calcium* **21**(3): 257-61.
- Quest, A. F., E. S. Bardes, et al. (1994). "A phorbol ester binding domain of protein kinase C gamma. Deletion analysis of the Cys2 domain defines a minimal 43-amino acid peptide." *J Biol Chem* **269**(4): 2961-70.
- Quest, A. F., E. S. Bardes, et al. (1994). "A phorbol ester binding domain of protein kinase C gamma. High affinity binding to a glutathione-S-transferase/Cys2 fusion protein." *J Biol Chem* **269**(4): 2953-60.
- Rao, A., C. Luo, et al. (1997). "Transcription factors of the NFAT family: regulation and function." *Annu Rev Immunol* **15**: 707-47.
- Rebhun, J. F., A. F. Castro, et al. (2000). "Identification of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for the Rap1 GTPase. Regulation of MR-GEF by M-Ras-GTP interaction." *J Biol Chem* **275**(45): 34901-8.
- Regier, D. S., J. Higbee, et al. (2005). "Diacylglycerol kinase iota regulates Ras guanyl-releasing protein 3 and inhibits Rap1 signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(21): 7595-600.
- Rincon, M., A. Whitmarsh, et al. (1998). "The JNK pathway regulates the In vivo deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes." *J Exp Med* **188**(10): 1817-30.
- Rodriguez de Turco, E. B., W. Tang, et al. (2001). "Diacylglycerol kinase epsilon regulates seizure susceptibility and long-term potentiation through arachidonoyl- inositol lipid signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8): 4740-5.
- Ron, D. and M. G. Kazanietz (1999). "New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors." *Faseb J* **13**(13): 1658-76.
- Sakane, F. and H. Kanoh (1997). "Molecules in focus: diacylglycerol kinase." *Int J Biochem Cell Biol* **29**(10): 1139-43.
- Sakane, F., K. Yamada, et al. (1991). "Porcine 80-kDa diacylglycerol kinase is a calcium-binding and calcium/phospholipid-dependent enzyme and undergoes calcium-dependent translocation." *J Biol Chem* **266**(11): 7096-100.
- Sanjuan, M. A., D. R. Jones, et al. (2001). "Role of diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signaling." *J Cell Biol* **153**(1): 207-20.
- Sanjuan, M. A., B. Pradet-Balade, et al. (2003). "T cell activation in vivo targets diacylglycerol kinase alpha to the membrane: a novel mechanism for Ras attenuation." *J Immunol* **170**(6): 2877-83.
- Santos, T., S. Carrasco, et al. (2002). "Dynamics of diacylglycerol kinase zeta translocation

- in living T-cells. Study of the structural domain requirements for translocation and activity." *J Biol Chem* **277**(33): 30300-9.
- Schroder, A. J., P. Quehl, et al. (2000). "Conversion of p56(lck) to p60(lck) in human peripheral blood T lymphocytes is dependent on co-stimulation through accessory receptors: involvement of phospholipase C, protein kinase C and MAP-kinases in vivo." *Eur J Immunol* **30**(2): 635-43.
- Schwartz, R. H. (2003). "T cell anergy." *Annu Rev Immunol* **21**: 305-34.
- Sebzda, E., S. Mariathasan, et al. (1999). "Selection of the T cell repertoire." *Annu Rev Immunol* **17**: 829-74.
- Sekiya, F., B. Poulin, et al. (2004). "Mechanism of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1. Tyrosine 783 phosphorylation is not sufficient for lipase activation." *J Biol Chem* **279**(31): 32181-90.
- Shaw, A. S., J. Chalupny, et al. (1990). "Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56lck tyrosine protein kinase." *Mol Cell Biol* **10**(5): 1853-62.
- Shaw, G. (1996). "The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module." *Bioessays* **18**(1): 35-46.
- Shenoy-Scaria, A. M., L. K. Gauen, et al. (1993). "Palmitoylation of an amino-terminal cysteine motif of protein tyrosine kinases p56lck and p59fyn mediates interaction with glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins." *Mol Cell Biol* **13**(10): 6385-92.
- Shindo, M., K. Irie, et al. (2003). "Synthesis and phorbol ester binding of the cysteine-rich domains of diacylglycerol kinase (DGK) isozymes. DGKgamma and DGKbeta are new targets of tumor-promoting phorbol esters." *J Biol Chem* **278**(20): 18448-54.
- Sieh, M., A. Batzer, et al. (1994). "GRB2 and phospholipase C-gamma 1 associate with a 36- to 38-kilodalton phosphotyrosine protein after T-cell receptor stimulation." *Mol Cell Biol* **14**(7): 4435-42.
- Siliceo, M., D. Garcia-Bernal, et al. (2006). "Beta2-chimaerin provides a diacylglycerol-dependent mechanism for regulation of adhesion and chemotaxis of T cells." *J Cell Sci* **119**(Pt 1): 141-52.
- Smalla, M., P. Schmieder, et al. (1999). "Solution structure of the receptor tyrosine kinase EphB2 SAM domain and identification of two distinct homotypic interaction sites." *Protein Sci* **8**(10): 1954-61.
- Spitaler, M. and D. A. Cantrell (2004). "Protein kinase C and beyond." *Nat Immunol* **5**(8): 785-90.
- Spitaler, M., E. Emslie, et al. (2006). "Diacylglycerol and protein kinase D localization during T lymphocyte activation." *Immunity* **24**(5): 535-46.
- Sprong, H., P. van der Sluijs, et al. (2001). "How proteins move lipids and lipids move proteins." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(7): 504-13.
- Stefanova, I., B. Hemmer, et al. (2003). "TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways." *Nat Immunol* **4**(3): 248-54.
- Straus, D. B. and A. Weiss (1992). "Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor." *Cell* **70**(4): 585-93.
- Sugawara, T., T. Moriguchi, et al. (1998). "Differential roles of ERK and p38 MAP kinase pathways in positive and negative selection of T lymphocytes." *Immunity* **9**(4): 565-74.
- Sun, Z., C. W. Arendt, et al. (2000). "PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes." *Nature* **404**(6776): 402-7.

- Takeuchi, H., T. Kanematsu, et al. (1997). "Distinct specificity in the binding of inositol phosphates by pleckstrin homology domains of pleckstrin, RAC-protein kinase, diacylglycerol kinase and a new 130 kDa protein." *Biochim Biophys Acta* **1359**(3): 275-85.
- Tang, W., M. Bunting, et al. (1996). "Molecular cloning of a novel human diacylglycerol kinase highly selective for arachidonate-containing substrates." *J Biol Chem* **271**(17): 10237-41.
- Teague, T. K., D. Hildeman, et al. (1999). "Activation changes the spectrum but not the diversity of genes expressed by T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22): 12691-6.
- Terada, N., J. J. Lucas, et al. (1993). "Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle." *J Cell Physiol* **154**(1): 7-15.
- Thomas, M. L. (1995). "Positive and negative regulation of leukocyte activation by protein tyrosine phosphatases." *Semin Immunol* **7**(4): 279-88.
- Thornton, A. M., E. E. Donovan, et al. (2004). "Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function." *J Immunol* **172**(11): 6519-23.
- Timson Gauen, L. K., M. E. Linder, et al. (1996). "Multiple features of the p59fyn src homology 4 domain define a motif for immune-receptor tyrosine-based activation motif (ITAM) binding and for plasma membrane localization." *J Cell Biol* **133**(5): 1007-15.
- Tognon, C. E., H. E. Kirk, et al. (1998). "Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain." *Mol Cell Biol* **18**(12): 6995-7008.
- Topham, M. K., M. Bunting, et al. (1998). "Protein kinase C regulates the nuclear localization of diacylglycerol kinase-zeta." *Nature* **394**(6694): 697-700.
- Topham, M. K. and S. M. Prescott (1999). "Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions." *J Biol Chem* **274**(17): 11447-50.
- Topham, M. K. and S. M. Prescott (2001). "Diacylglycerol kinase zeta regulates Ras activation by a novel mechanism." *J Cell Biol* **152**(6): 1135-43.
- Trobridge, P. A., K. A. Forbush, et al. (2001). "Positive and negative selection of thymocytes depends on Lck interaction with the CD4 and CD8 coreceptors." *J Immunol* **166**(2): 809-18.
- Tsushima, S., M. Kai, et al. (2004). "Diacylglycerol kinase gamma serves as an upstream suppressor of Rac1 and lamellipodium formation." *J Biol Chem* **279**(27): 28603-13.
- Turner, J. M., M. H. Brodsky, et al. (1990). "Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs." *Cell* **60**(5): 755-65.
- van Baal, J., J. de Widt, et al. (2005). "Translocation of diacylglycerol kinase theta from cytosol to plasma membrane in response to activation of G protein-coupled receptors and protein kinase C." *J Biol Chem* **280**(11): 9870-8.
- van Blitterswijk, W. J. and B. Houssa (1999). "Diacylglycerol kinases in signal transduction." *Chem Phys Lipids* **98**(1-2): 95-108.
- van Blitterswijk, W. J. and B. Houssa (2000). "Properties and functions of diacylglycerol kinases." *Cell Signal* **12**(9-10): 595-605.
- van Leeuwen, J. E. and L. E. Samelson (1999). "T cell antigen-receptor signal transduction." *Curr Opin Immunol* **11**(3): 242-8.
- Villalba, M., K. Bi, et al. (2002). "Translocation of PKC[theta] in T cells is mediated by a

- nonconventional, PI3-K- and Vav-dependent pathway, but does not absolutely require phospholipase C." *J Cell Biol* **157**(2): 253-63.
- von Boehmer, H. (2005). "Mechanisms of suppression by suppressor T cells." *Nat Immunol* **6**(4): 338-44.
- Vratsanos, G. S., S. Jung, et al. (2001). "CD4(+) T cells from lupus-prone mice are hyperresponsive to T cell receptor engagement with low and high affinity peptide antigens: a model to explain spontaneous T cell activation in lupus." *J Exp Med* **193**(3): 329-37.
- Walsh, J. P., R. Suen, et al. (1995). "Arachidonoyl-diacylglycerol kinase. Specific in vitro inhibition by polyphosphoinositides suggests a mechanism for regulation of phosphatidylinositol biosynthesis." *J Biol Chem* **270**(48): 28647-53.
- Wang, D., R. Matsumoto, et al. (2004). "CD3/CD28 costimulation-induced NF-kappaB activation is mediated by recruitment of protein kinase C-theta, Bcl10, and IkappaB kinase beta to the immunological synapse through CARMA1." *Mol Cell Biol* **24**(1): 164-71.
- Wange, R. L. (2000). "LAT, the linker for activation of T cells: a bridge between T cell-specific and general signaling pathways." *Sci STKE* **2000**(63): RE1.
- Weiss, A., J. Imboden, et al. (1986). "The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation." *Annu Rev Immunol* **4**: 593-619.
- Weiss, A. and D. R. Littman (1994). "Signal transduction by lymphocyte antigen receptors." *Cell* **76**(2): 263-74.
- Wilcox, H. M. and L. J. Berg (2003). "Itk phosphorylation sites are required for functional activity in primary T cells." *J Biol Chem* **278**(39): 37112-21.
- Wilde, J. I. and S. P. Watson (2001). "Regulation of phospholipase C gamma isoforms in haematopoietic cells: why one, not the other?" *Cell Signal* **13**(10): 691-701.
- Williams, J. G., J. K. Drugan, et al. (2000). "Elucidation of binding determinants and functional consequences of Ras/Raf-cysteine-rich domain interactions." *J Biol Chem* **275**(29): 22172-9.
- Winkler, D. G., R. E. Cutler, Jr., et al. (1998). "Identification of residues in the cysteine-rich domain of Raf-1 that control Ras binding and Raf-1 activity." *J Biol Chem* **273**(34): 21578-84.
- Wolfman, A., T. G. Wingrove, et al. (1987). "Down-regulation of protein kinase C and of an endogenous 80-kDa substrate in transformed fibroblasts." *J Biol Chem* **262**(34): 16546-52.
- Wolven, A., H. Okamura, et al. (1997). "Palmitoylation of p59fyn is reversible and sufficient for plasma membrane association." *Mol Biol Cell* **8**(6): 1159-73.
- Yamada, K., F. Sakane, et al. (2003). "Regulatory role of diacylglycerol kinase gamma in macrophage differentiation of leukemia cells." *Biochem Biophys Res Commun* **305**(1): 101-7.
- Yamada, K., F. Sakane, et al. (1997). "EF-hand motifs of alpha, beta and gamma isoforms of diacylglycerol kinase bind calcium with different affinities and conformational changes." *Biochem J* **321** (Pt 1): 59-64.
- Yamaguchi, H. and W. A. Hendrickson (1996). "Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation." *Nature* **384**(6608): 484-9.
- Yamaguchi, Y., Y. Shirai, et al. (2006). "Phosphorylation and up-regulation of diacylglycerol kinase gamma via its interaction with protein kinase C gamma." *J Biol Chem* **281**(42): 31627-37.

- Yamashita, S., N. Mochizuki, et al. (2000). "CalDAG-GEFIII activation of Ras, R-ras, and Rap1." *J Biol Chem* **275**(33): 25488-93.
- Yu, X. Z., S. D. Levin, et al. (2004). "Lck is required for activation-induced T cell death after TCR ligation with partial agonists." *J Immunol* **172**(3): 1437-43.
- Zaru, R., C. P. Berrie, et al. (2001). "CD28 co-stimulates TCR/CD3-induced phosphoinositide turnover in human T lymphocytes." *Eur J Immunol* **31**(8): 2438-47.
- Zha, Y., R. Marks, et al. (2006). "T cell anergy is reversed by active Ras and is regulated by diacylglycerol kinase-alpha." *Nat Immunol*.
- Zhang, G., M. G. Kazanietz, et al. (1995). "Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester." *Cell* **81**(6): 917-24.
- Zhao, Z., S. H. Shen, et al. (1993). "Stimulation by phospholipids of a protein-tyrosine-phosphatase containing two src homology 2 domains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(9): 4251-5.
- Zhong, X. P., E. A. Hainey, et al. (2003). "Enhanced T cell responses due to diacylglycerol kinase zeta deficiency." *Nat Immunol* **4**(9): 882-90.
- Zhong, X. P., E. A. Hainey, et al. (2002). "Regulation of T cell receptor-induced activation of the Ras-ERK pathway by diacylglycerol kinase zeta." *J Biol Chem* **277**(34): 31089-98.



**Agradacimientos**



En primer lugar, a Isabel Mérida por darme la oportunidad de saber que es esto de la ciencia, por ayudarme a entender el mundo de la DGK, por mirar siempre un paso por delante y por mantener este maravilloso “tinglao”. También al resto del grupo que mantienen el “tinglao”; María Almena por su espíritu decidido y su tenacidad; M<sup>a</sup> Angeles por su desparpajo, su carácter abierto y ese aire que tenemos los del sur de mañana será un día mejor; Esther por su sonrisa y su afán de superación diaria; Teresa, Job y Toñi, nuestra vertiente más exótica y estimulante, especialmente a ti, Toñi, la otra cara de DGK $\alpha$ , con tu apoyo ha sido mucho más fácil. También a María Siliceo, un pequeño faro del mundo que nos guía de la realidad a los sueños. Finalmente, a Silvia, por su amistad, su sentido crítico y sobre todo por enseñarme, como a un ciego más, a ver la luz dentro de la caverna, no te rindas jamás, necesitamos gente como tú a “puñaos”. No quiero dejar de olvidar a algunos miembros lejanos del “tinglao” como Ángel, mi primer mentor; Ernesto, cuyas ocurrencias nunca dejarán de sorprenderme e Ignacio por su sinceridad de perogrullo.

A todos los miembros del DIO que, en mayor o menor medida, han colaborado en la realización de esta tesis. Entre esta gente no puedo olvidar a Quim, André y Cristina, que sí mujer, que sí mereció la pena el esfuerzo, mira qué si no nos conocemos, ¿qué?. A Santos Mañes y a su gente: Alicia, Manu, Rosana, Emilia, Rosa y Conchi, vaya tía, que si el niño, que si la tesis y que si disgustos y, mírala, ahí está con una sonrisa cada día. A Miriam, Zaira, Domingo, Amit, Jesús, Carmen, Isabel e Isabela del 413, y por supuesto a Astrid, Alberto y a Clara, la dulce Clara. También a la gente de Pharmacia... o de Pfizer..., o de DIO S.L., o lo que diablos seáis ahora, no me quiero olvidar de toda la gente que hace posible, día a día, que el trabajo se realice, en todo momento, de manera correcta como Antonio Teheran alias “bramido”, Cathy, Coral, María, Marisol, Meyos, Carolina, M<sup>a</sup> Carmen, Sara, Ana, Celia, Reme y, en definitiva, a todo el DIO. No quiero tampoco olvidar a Carlos Martínez, “el catalizador” de la reacción.

A mis compis de comida, la sonriente Mireia, la incansable Eva y sobre todo la alegre Elisa que además de comida ha compartido montañas y alguna que otra charla, nadie mejor que tú comprende mis despistes y mi genio, sabes que no hay arista que el viento, el agua y la temperatura, con el tiempo, no erosionen.

También a mis amigos, Jose, Raúl, Alfredo, Charlie, Irra, Pablo, Esther, Chelo, Braulio, David, Nora, Alex, Fe, Saúl, Jorge, Sierra, Charo y alguno más que seguro me olvido pero estoy seguro sabrá perdonarme. También gracias a la gente de mis “pueblos” Carabanchel y Cabezamesada, por enseñarme a hacer la compra en zapatillas de felpa y saber qué soy y qué no soy. Tampoco quiero olvidarme de mis maestros, todo esto se inició allá por los años noventa en un instituto de Madrid, donde la vida es sueño y los sueños, sueños son. Gracias Consuelo por empezar a forjar el sueño que ha sido esta tesis, tras de ti han venido muchos más, pero tus enseñanzas, quizá por ser las primeras, son las que mejor recuerdo.

A toda mi familia, especialmente a mis padres, Rafael y M<sup>a</sup> Paz, su lucha por un mundo más justo perdurará muchas generaciones. A mis hermanos, Rafa y Paz, quién dice que compartir no es agradable. A mis “cuñaos”, Luis y Paloma, y a mis sobrinas Celia, Irene, Cristina y Carlota, la saga continua, y no tiene pinta de ser peor que la anterior, hasta la victoria, siempre. Tampoco quiero olvidarme de abuelos y abuelas, aunque algunos ya abandonaron el barco, nunca he dejado de sentir cercano su recuerdo. Y, por supuesto, a ti, Sonia, en el tránsito de la vida es bueno contar con buenas velas que el viento empuje suavemente para seguir nuestro camino, la tuya no es ni grande ni pequeña, simplemente es la que me guía.

Gracias a todos por enseñarme, como Saramago afirma, que somos gente sin nombre, levantando del suelo, dentro de un caverna, una mitad ciegos y la otra casi, y que merece la pena dejar en este mundo una obra que perdure, por insignificante que ésta sea.

**Anexo**

