



Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Biología

TESIS DOCTORAL

*Conexiones de los Microdominios de Tetraspaninas con
el citoesqueleto de actina y su función en los procesos de
Migración y Sinapsis Inmune*

Mónica Sala-Valdés

Madrid, 2010



Departamento de Biología
Facultad de Biología
Universidad Autónoma de Madrid

TESIS DOCTORAL

Conexiones de los Microdominios de Tetraspaninas con el citoesqueleto de actina y su función en los procesos de Migración y Sinapsis Inmune

Memoria presentada por la licenciada en Biología:

Mónica Sala-Valdés

para optar al grado de

Doctora en Ciencias Biológicas

Directores de tesis:

Dra. María Yáñez Mó

Investigadora contratada del Fondo de Investigación Sanitaria

Dr. Francisco Sánchez Madrid

Catedrático de Inmunología de la Universidad Autónoma de Madrid

Lugar de realización: **Hospital Universitario de la Princesa, Servicio de Inmunología**



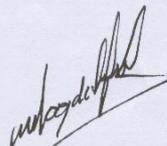
CERTIFICADO DEL TUTOR Y DE LOS DIRECTORES DE TESIS

Magdalena Cañete, profesora titular del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid, Francisco Sánchez Madrid, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Inmunología de la Universidad Autónoma de Madrid, y María Yáñez Mó, Doctora en Ciencias Químicas e Investigadora contratada del Fondo de Investigación Sanitaria,

CERTIFICAN: que Mónica Sala-Valdés, licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral con el título: Conexiones de los Microdominios de Testraspaninas con el citoesqueleto de actina y su función en la migración y en la Sinapsis Inmune.

Revisado este trabajo, los que suscriben consideran el trabajo realizado satisfactorio y autorizan su presentación para ser juzgado.

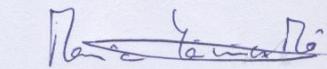
Y para que así conste y a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Madrid a 1 de Junio de 2010.



Magdalena Cañete



Francisco Sánchez-Madrid



María Yáñez-Mó

A mi Padre cuya fuerza de
voluntad y ganas de luchar
vivirán en mí para siempre.

A mi Madre y a mis
Hermanos.

Cuando se acaba un ciclo y empieza otro una vuelve la vista atrás y observa.

Yo veo a una niña que faranduleaba por el laboratorio con ganas de comerse el
mundo, inocente, risueña y con mucho que aprender.

Caer en el grupo de Francisco Sánchez-Madrid se lo debo a la Dra. Cecilia Muñoz. Y mi nueva etapa al Dr. Claude Boucheix. Gracias a los dos.

Caer con una directora de tesis que en todo momento me ha apoyado, ha confiado en mí, me ha dado fuerzas cuando las necesitaba, comprensión cuando me desesperaba, cariño en los malos momentos y por supuesto me ha enseñado todo lo que sé, se lo debo al Dr. Francisco Sánchez-Madrid. Gracias Paco, por eso y por haberte preocupado por mi situación personal de los últimos años. Para mí será un orgullo llevar tu nombre allá donde vaya, porque además de un gran científico (algo que todo el mundo sabe), también en lo personal eres un gran hombre, a pesar de nuestras diferencias.

Poder leer esta tesis, haber publicado artículos, irme de post-doc y saber todo lo que sé de fluorescencia, inmunoprecipitaciones, pull downs etc etc se lo debo a la Dra. María Yáñez-Mó. Gracias María por enseñarme. Por dedicarme tiempo. Por ponerte conmigo a trabajar desde el principio. Y gracias por confiar en mí, en mis manos, en mi cabeza y por exigirme, mucho sí, a veces demasiado y por hacerme mejor científica cada día. Ursa, esto también va por ti. Soraya, te deseo muchos años en la ciencia. Gracias también a mi tutora de tesis, Magdalena Cañete, por hacerme las cosas fáciles.

La amistad de tantos años en el laboratorio se la debo a Mónica Gordón, Manolo Gómez y Hort, que me han acompañado y que me han levantado, con los que me he reído, discutido, llorado, con los que he compartido alegrías y penas y con los que he vivido momentos realmente inolvidables. Os quiero mucho. Muchísimo. Gracias chicos. Gracias Mónica y Patri por ayudarme estos últimos días en los que no he dado más de mí. No puedo olvidarme tampoco de ese congreso y de ese viaje, Olga, y de la envidia, sana, que siempre me has dado con tu dedicación a la ciencia. Tampoco quiero dejarme a Manu, del que he aprendido que el trabajo es más eficiente cuando se ríe más.

Gracias Cristina, Giulia y Emilio por vuestro cariño y apoyo, que quiero y querré siempre. Gracias Almudena y Sales (pedazo de portada) por las horas compartidas en el Cnic que han sido más provechosas y amenas con vosotras. Me habéis hecho sentir muy útil. Y gracias en general a mis compañeros del CNIC: a Mittel, Gloria, Vera, Pilar, Fran, Marta, Arancha y Amalia. Y a mis compañeros de la princesa: Noa, Román, Ana U, Marta B, Esteban, Carlos, Raquel, Ángel, Mónica F, Silvia, Carmen y Javi (¿tendremos 2 títulos cuando lea ésto?) y por supuesto a la gente de rutina (Toñi y Ana sobretodo), a Mariano y Alicia y a los que se fueron, entre ellos claro, el Dr. Vicente-Manzanares. Vuestro cariño ha sido vital en estos años.

Gracias a mi amigos de la Fragua, que siempre se han interesado por mi trabajo y me han hecho sentir muy importante con lo que hacía, valorándome siempre y queriéndome más. Gracias Manu, Davi, Nacho, Soto, Pablo, Clara, Javi y María. Esto también va por vosotros.

Gracias a mi familia de Calpe. Por su apoyo incondicional. Por su ayuda. Por su cariño. Os quiero más de lo que nunca imaginé ni imaginasteis. Gracias también a mi familia de Asturias. Gracias a Ale, Elena y Eva por estar siempre ahí y por quererme como soy. Y a todos los que habéis compartido conmigo parte del camino. Y por último, gracias a mi hermano Pedro, a mi hermana Cristina y a mi madre Os quiero y sois lo mejor que tengo.
...y gracias por todo Papá.

RESUMEN

Las tetraspaninas se caracterizan por su capacidad de interaccionar unas con otras y con otras proteínas organizando en la membrana plasmática microdominios denominados “Microdominios ricos en Tetraspaninas” o “Red de Tetraspaninas”. EWI-2 y EWI-F son dos de estas proteínas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y que se asocian directamente a las tetraspaninas CD9 y CD81.

Este estudio revela la existencia de distintas asociaciones entre las proteínas EWI y CD81 con moléculas adaptadoras del citoesqueleto de actina, conectando los microdominios de tetraspaninas con el entramado de actina y sus moléculas señalizadoras asociadas. En primer lugar, hemos descrito la asociación directa de los dominios C-terminal de EWI-2, EWI-F y CD81 con el dominio N-terminal de las proteínas ERM Ezrina y Moesina y se ha demostrado el papel regulador negativo de EWI-2 en la migración y polarización de linfocitos T en los que la fosforilación de ERMs tiene un papel relevante. Respecto a la formación y dinámica de la Sinapsis Inmune, se ha descrito que EWI-2 se localiza en el anillo central de la Sinapsis, actúa como molécula coestimuladora e interviene en la secreción de IL-2.

EWI-2 y CD81 también interaccionan directamente con las proteínas entrecruzadoras de actina Filamina-A y α -Actinina, que también se encargan de reclutar proteínas de señalización relevantes en procesos como la migración, la adhesión y la formación de la Sinapsis Inmune. Filamina-A y α -Actinina también se localizan en el área de contacto entre la célula T y la célula CPA.

Por último, se ha estudiado el papel de la proteína adaptadora Sintenina-1, también incluida en los microdominios de tetraspaninas merced a su asociación directa con la tetraspanina CD63, en la quimiotaxis dirigida hacia la quimiocina SDF-1 α , activación de Rac y polimerización de actina, procesos en los que es crucial la fosforilación de sus residuos de tirosina tal y como demuestra la utilización de mutantes puntuales en dichos residuos.

SUMMARY

Tetraspanins are characterized by their ability to interact each other and with other proteins. This ability allows them to organize in the plasma membrane microdomains called “Tetraspanin Enriched Microdomains” or “Tetraspanin web”. EWI-2 and EWI-F are two of these tetraspanin partners. They are members of the Immunoglobulin superfamily and interact directly with tetraspanins CD9 and CD81.

This study reveals that EWI proteins and CD81 associate with actin adaptor molecules providing a link between cytoskeleton and their signalling proteins with the tetraspanin web. First of all, we described that cytoplasmic C-terminal domains of EWI-2, EWI-F and CD81 directly bind to N-terminal domain of ERM proteins Ezrin and Moesin. A negative role of EWI-2 in polarization and lymphocyte migration as well as in the phosphorylation of ERM proteins was demonstrated. Related to the formation and dynamics of the immune synapse, EWI-2 was localized at the central SMAC, and shown to act as a costimulatory molecule involved in the secretion of IL-2.

EWI-2 and CD81 also interact directly with the actin cross-linkers Filamin-A and α -Actinin which also reclute signalling proteins that have an important role in migration, adhesion and Immune Synapse formation processes. Filamin-A and α -Actinin are localized also at the contact area between T-APC cells.

Finally, the role of PDZ adaptor protein Syntenin-1, which is also included in the tetraspanin web by its interaction with tetraspanin CD63, was addressed. The presence of Syntenin-1 is crucial in SDF-1 α chemotaxis, Rac activation and actin polymerization. In these processes the phosphorylation of tyrosine residues of the N-terminal sequence of Syntenin-1 are important as we demonstrated using point mutants in these tyrosine residues.

ABREVIATURAS

(Para las abreviaturas se ha utilizado la nomenclatura española en aquellos casos en los que existe, y la inglesa para el resto de casos. Muchos acrónimos corresponden a palabras en inglés).

aa: Aminoácido	PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica
AcM: Anticuerpo monoclonal	PDZ: Tipo de dominio proteico; las siglas provienen de las iniciales de las tres proteínas que se describieron inicialmente con este dominio (PSD-85; Discs large; Zonula occludens-1)
BCR: Receptor de la célula B	PE: Ficoeritrina
CPA: Célula Presentadora de Antígeno	PI4K: Fosfatidilinositol 4-quinasa
DIC: Contraste diferencial de interferencia	PIP₂: Fosfoinositol 4,5 difosfato
DRM: Membranas Resistentes a Detergentes	PKC: Proteína quinasa C
ERKs: Quinasas reguladas por señales extracelulares	PLCγ: Fosfolipasa C γ
ERMs: Familia de proteínas Ezrina-Radixina-Moesina	SD: Desviación estándar
FN: Fibronectina	SDF-1α: Factor derivado de células estromales-1
GAM: Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón	SEE: Superantígeno E
GAR: Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo	SEL: Bucle extracelular corto
GEF: Factor intercambiador de GDP por GTP	SI: Sinapsis Inmunológica
GFP: Proteína fluorescente verde	SMAC: Complejo supramolecular de activación
GMCSF: Factor estimulante de colonias y de granulocito/macrófago	cSMAC: Complejo supramolecular de activación central
GPI: Glicosil-fosfatidil-inositol	pSMAC: Complejo supramolecular de activación periférico
GST: Glutation-S-transferasa	TEMs: Microdominios Enriquecidos en Tetraspaninas
HUVEC: Células endoteliales provenientes de venas de cordones umbilicales	Th1: Linfocito T colaborador de tipo 1
ICAM-1/2/3: Molécula de adhesión intercelular 1/2/3	Th2: Linfocito T colaborador de tipo 2
IP: inmunoprecipitación	TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa
ITAM: Dominio de activación basado en tirosinas	TM4: Tetraspaninas
ITIM: Dominio de inhibición basado en tirosinas	VHC: Virus de la Hepatitis C
LFA-1: Antígeno asociado a la función linfocitaria-1	WB: Western Blot
LEL: Bucle extracelular largo	ZAP-70: Quinasa asociada a la cadena Z de 70kDa
MHC: Complejo principal de histocompatibilidad	
MTOC: Centro organizador de microtúbulos	
PAK-2: Quinasa 2 activada por p21 (Rac/Cdc42)	
PBLs: Linfocitos de sangre periférica	

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	25
1.1 LA MEMBRANA PLASMÁTICA	25
1.2 LAS TETRASPANINAS Y LOS MICRODOMINIOS RICOS EN TETRASPANINAS	26
1.2.1 Tetraspaninas y Estructura	26
1.2.2 Microdominios de Tetraspaninas	28
1.2.2.1 Composición	28
1.2.2.2 Estructura	31
1.2.2.3 Conexiones intracelulares con los microdominios de Tetraspaninas	32
1.2.2.4 Funciones de los microdominios de Tetraspaninas	34
1.3 LAS PROTEÍNAS EWI	37
1.4 EL CITOESQUELETO DE CELULAR	38
1.4.1 Migración, polaridad celular y quimiotaxis	39
1.4.2 La Sinapsis Inmune	40
1.4.3 Proteínas que participan en la regulación del Citoesqueleto de actina:	42
1.4.3.1 Proteínas ERM	42
1.4.3.2 Filamina-A	43
1.4.3.3 α -Actinina	44
1.4.3.4 Sintenina-1	45
2. MATERIALES Y METODOS	49
2.1 Células y cultivos celulares	49
2.2 Reactivos	50
2.3 Transfección de ADN y ARN	57
2.4 Formación de conjugados T-CPA	57
2.5 Inmunofluorescencia y citometría de flujo	58
2.6 Ensayos de videomicroscopía confocal	59
2.7 Ensayos de Pull-down	59
2.8 Unión proteína-proteína <i>in vitro</i>	60
2.9 Inmunoprecipitación	60
2.10 Fraccionamiento celular	61
2.11 <i>Western Blotting</i>	61
2.12 Análisis proteómico por espectrometría de masas	61
2.13 Polimerización de actina	62
2.14 Ensayos de migración	62
2.15 Medida de la actividad de Rac	63
2.16 Análisis de citoquinas	63
2.17 Análisis estadístico de los datos	63
3. OBJETIVOS	67
4. RESULTADOS	71
4.1 Asociación de las proteínas EWI y las tetraspaninas con las moléculas adaptadoras ERM	71

4.1.1	EWI-2 y EWIF se localizan en estructuras celulares enriquecidas en ERMs	71
4.1.2	EWI-2 y EWIF se asocian <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> con las proteínas ERM	75
4.1.3	Las proteínas ERM son necesarias para la correcta localización de EWIF en el urópodo celular	78
4.1.4	La tetraspanina CD81 se asocia directamente a ERMs	79
4.2	Papel de EWIF en la polarización, migración linfocitaria y formación de la Sinapsis Inmune	82
4.2.2	EWI-2 está implicado en la fosforilación de ERMs, regulando negativamente la migración linfocitaria	82
4.2.3	EWI-2 colocaliza con CD81 en el anillo central de la Sinapsis Inmune	85
4.2.4	EWI-2 actúa como molécula coestimuladora	86
4.3	Caracterización de otras asociaciones entre tetraspaninas y EWIF con el citoesqueleto celular:	89
4.3.2	Estudio de Filamina-A y α -Actinina en la Sinapsis Inmune	89
4.3.2.1	EWI-2 interactúa con las proteínas del citoesqueleto Filamina-A y α -Actinina	89
4.3.2.2	Filamina-A y α -Actinina se localizan en el anillo periférico de la Sinapsis Inmune	91
4.3.3	Estudio de la proteína Sintenina-1 en la migración Linfocitaria	93
4.3.3.1	Sintenina-1 presenta una distribución polarizada en linfocitos T	93
4.3.3.2	Sintenina-1 es un factor limitante en la polimerización de actina y la quimiotaxis de los linfocitos T	95
4.3.3.3	Sintenina-1 regula la translocación de Rac a la membrana plasmática	97
4.3.3.4	Sintenina-1 es sustrato de la familia de quinasas Src	99
4.3.3.5	Sintenina-1 media la activación de Rac dependiente de Src	100
4.3.3.6	El motivo ITIM de la secuencia N-terminal de Sintenina-1 es necesario para la asociación inducible con la proteína M-RIP	102
5	DISCUSIÓN	107
6	CONCLUSIONES	119
7	BIBLIOGRAFÍA	123
8	LEYENDAS DE LOS VIDEOS	141
9	ANEXOS	145

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Para llevar a cabo las reacciones químicas necesarias en el mantenimiento de la vida, la célula necesita mantener un medio interno apropiado. Esto es posible gracias a que las células se encuentran separadas del exterior por una membrana limitante, la membrana plasmática. La membrana plasmática es una barrera semipermeable que se encarga de aislar selectivamente el contenido de la célula del ambiente externo, regular el intercambio de sustancias entre el interior y exterior celular y permitir la comunicación intercelular. Además, provee sitios de anclaje para el citoesqueleto o los componentes de la matriz extracelular lo que, entre otras cosas, permite el mantenimiento de la forma celular y le confiere un papel relevante en la regulación de la direccionalidad y polaridad de la célula (Alberts B., 1996).

El actual modelo de la estructura de la membrana plasmática (**Figura 1**) es el resultado de la evolución de distintos modelos como el Modelo de la Capa Lipídica (W.Deamer et al., 1999), el Modelo de la Bicapa Lipídica (Danielli and Davson, 1935) y, por supuesto, el Modelo del Mosaico Fluido (Singer and Nicolson, 1972), según el cual la membrana plasmática consiste en una bicapa lipídica en la que las proteínas integrales se insertan de forma que sus grupos iónicos y polares se localizan en la fase acuosa y los grupos no polares en la parte hidrofóbica de la bicapa. El término fluido denota que tanto los lípidos como las proteínas difunden libremente en la membrana.

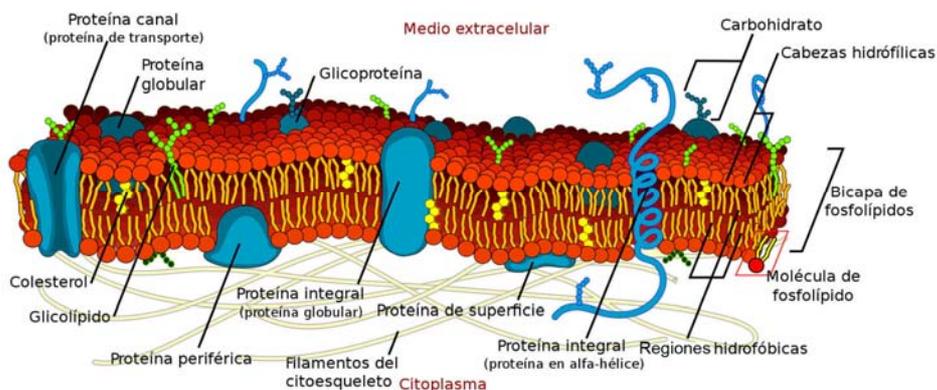


Figura 1: Estructura de la membrana celular. La membrana celular es una bicapa lipídica que contiene principalmente proteínas y lípidos. Adaptado de la Universidad New South Wales, Sydney, Australia. <http://cellbiology.med.unsw.edu.au/units/science/lecture0803.htm>.

Sin embargo, el modelo del mosaico fluido presenta varias limitaciones: minimiza el papel estructural de las proteínas de membrana incluidas en la bicapa y depende de un equilibrio químico que no tiene en cuenta los continuos procesos tanto de endocitosis como de exocitosis que se dan de continuo en la célula (Yanez-Mo et al., 2009). Simons y van Meer sugieren la existencia de microdominios en la membrana (Balsas lipídicas, *lipid rafts*) enriquecidos en determinados tipos de lípidos como colesterol, glicolípidos y esfingolípidos (Simons and Ikonen, 1997) y cuyo descubrimiento se inicia en el estudio del transporte de colesterol desde la Red Transgolgi hacia la membrana plasmática. En paralelo a la definición de balsas lipídicas surge la descripción de la red de Tetraspaninas o Microdominios Ricos en Tetraspaninas (TEM) (Rubinstein et al., 1996).

1.2. LAS TETRASPANINAS Y LOS MICRODOMINIOS RICOS EN TETRASPANINAS

1.2.1. Tetraspaninas y estructura

Las tetraspaninas son una superfamilia de proteínas que cuentan con 33 miembros en humanos (**Tabla I**). Son proteínas de bajo peso molecular que presentan cuatro regiones transmembrana (TM1, TM2, TM3 y TM4). Los dominios TM1 y TM2 flanquean la región SEL o EC1 (bucle corto extracelular, 20-28 aminoácidos) y las regiones TM3 y TM4 flanquean el LEL o EC2 (bucle largo extracelular, 76-131 aa). Además de estos cuatro dominios transmembrana, las tetraspaninas presentan un dominio intracelular (IL) y dos dominios citoplásmicos N- y C-terminal que no suelen contener más de 19 aa. La mayoría de las tetraspaninas son susceptibles de N-glicosilación en el bucle EC2, a excepción de CD9 (que se glicosila en el bucle EC1) y CD81 y Net-2, que no se glicosilan (Boucheix and Rubinstein, 2001) (**Figura 2**).

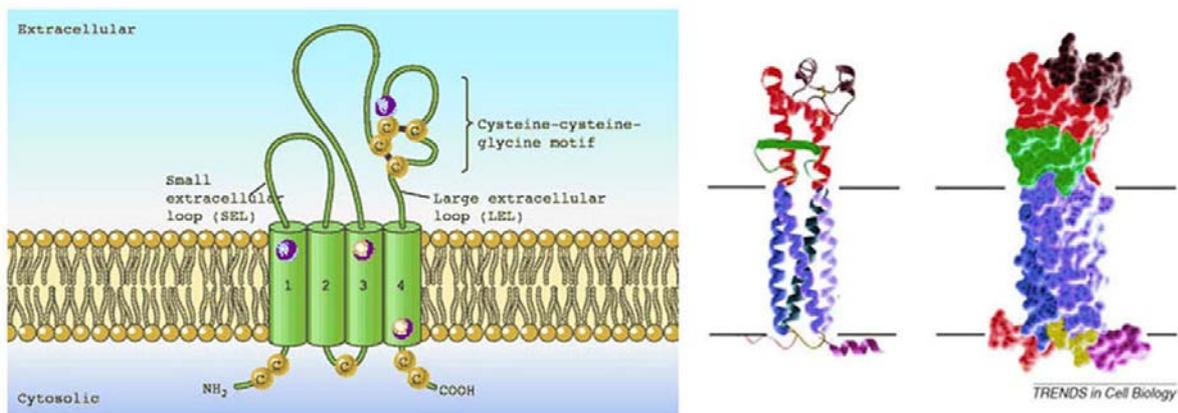


Figura 2: Las tetraspaninas. A) Características estructurales de las tetraspaninas: Las tetraspaninas se componen de 4 dominios transmembrana (TM) que en la figura corresponden a los cilindros verdes y que contienen residuos altamente conservados. Los dominios TM1 y TM2 flanquean la región SEL (bucle corto extracelular) y los dominios TM3 y TM4 flanquean el dominio LEL (bucle largo extracelular). Asimismo en la figura se representan algunos de los motivos más conservados como el motivo CCG, incluido en el LEL, que forma puentes disulfuro (líneas negras) con otras cisteínas conservadas (círculos amarillos). Las cisteínas presentes en los dominios citoplásmicos N- y C-terminal son susceptibles de palmitoilación. (Figura obtenida de (Levy and Shoham, 2005)). B) Figura adaptada de Seigneuret et al., 1996 donde se puede observar la estructura obtenida del cristal de CD81. El bucle largo extracelular está dividido por colores en la región conservada (rojo) y la región hipervariable (marrón) (Yanez-Mo et al., 2009).

TABLA 1: Tetraspaninas en humanos

Proteína	Otros nombres		Proteína	Otros nombres
TSPAN1			TSPAN18	
TSPAN2			TSPAN19	
TSPAN3			TSPAN20	UP1b,UPK1B
TSPAN4	NAG-2		TSPAN21	UP1a, UPK1A
TSPAN5			TSPAN22	RDS, PRPH2
TSPAN6			TSPAN23	ROM1

TSPAN7	CD231, TALLA-1, A15, TM4SF2		TSPAN24	CD151, PETA-3
TSPAN8	CO-029/D6.1A		TSPAN25	CD53
TSPAN9	NET-5		TSPAN26	CD37
TSPAN10	OCULOSPANIN		TSPAN27	CD82, R2/IA4
TSPAN11	CD151-like		TSPAN28	CD81, TAPA-1
TSPAN12	NET-2		TSPAN29	CD9
TSPAN13	NET-6		TSPAN30	CD63, ME491
TSPAN14			TSPAN31	SAS
TSPAN15	NET-7		TSPAN32	TSSC6
TSPAN16	TM4-B		TSPAN33	MGC50844, Penumbra
TSPAN17	FBX23			

Las tetraspaninas presentan además otras características como la presencia en el dominio EC2 de 4-6 cisteínas (entre las que se incluye el motivo CCG totalmente conservado) a través de las cuales se forman 2-3 puentes disulfuro que estabilizan la estructura secundaria de dicho bucle y residuos polares altamente conservados en la región transmembrana (Stipp et al., 2003). Las tetraspaninas presentan también cisteínas en las regiones citoplasmáticas, que son susceptibles de palmitoilación (Charrin et al., 2002; Yang et al., 2004).

1.2.2 Microdominios de tetraspaninas

1.2.2.1 COMPOSICIÓN

Los dominios ricos en tetraspaninas, también denominados red de tetraspaninas o TEMs, se forman gracias a la propiedad de estas proteínas para interactuar simultáneamente entre ellas y con una gran variedad de moléculas como proteínas de la

superfamilia de las inmunoglobulinas, proteoglicanos, integrinas, factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento y lípidos de membrana, entre otros (Boucheix and Rubinstein, 2001) (**Tabla II**) (**Figura 3**). De esta manera se organizan en compartimentos definidos pero dinámicos en la membrana plasmática. La composición de estos microdominios, así como otras características específicas, los hacen diferentes de las balsas lipídicas (Le Naour et al., 2006) y pueden variar en función del tipo celular. Por tanto:

- Las tetraspaninas se asocian entre sí formando homo y heterodímeros (Kovalenko et al., 2005; Stipp et al., 2003).
- Son proteínas altamente palmitoiladas que pueden interactuar con lípidos como colesterol o gangliósidos (Charrin et al., 2003; Hakomori, 2002; Yang et al., 2004).
- Se asocian también a proteínas transmembrana principalmente a través de su segundo bucle extracelular (**Tabla II**).

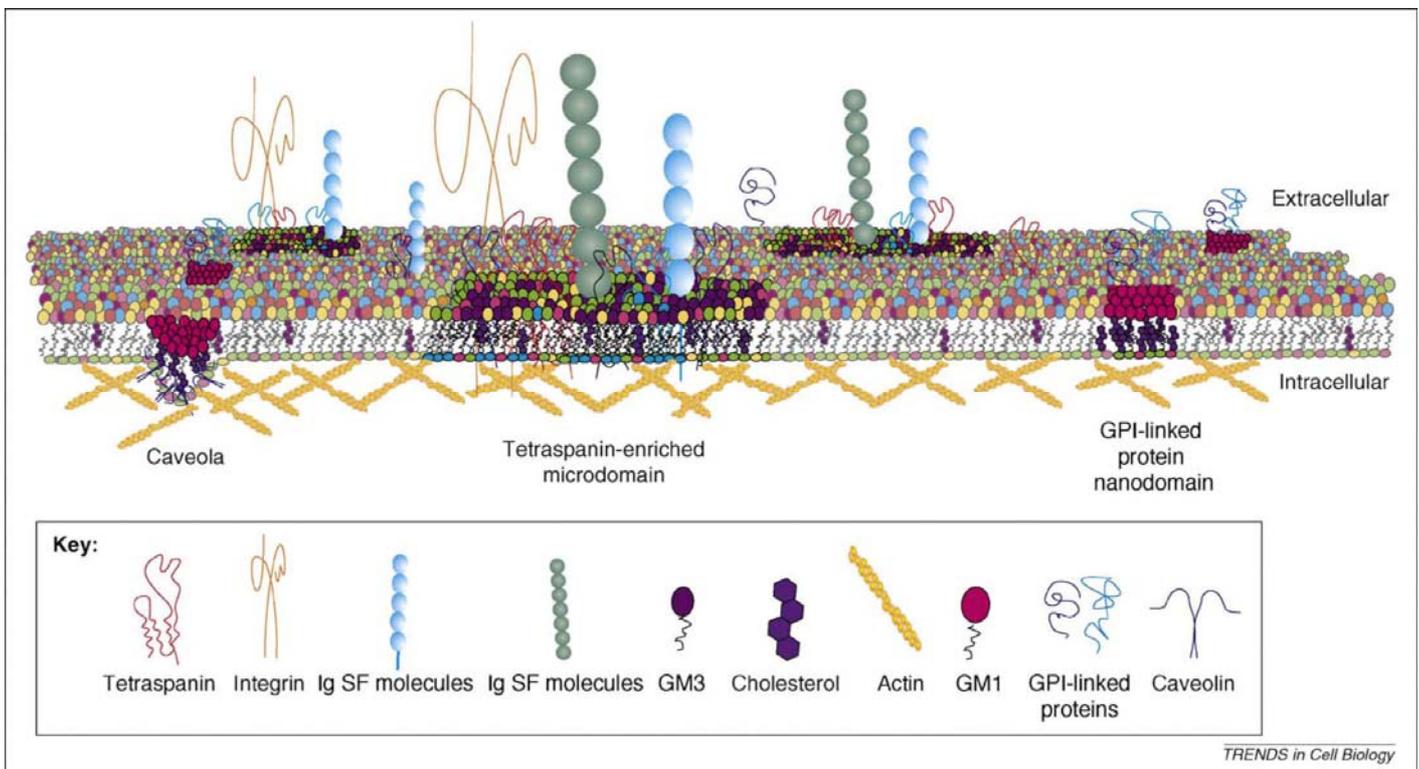


Figura 3: Microdominios de Tetraspaninas y principales moléculas asociadas (Yanez-Mo et al., 2009): Representación esquemática de los principales dominios descritos en la membrana plasmática: caveolas, microdominios ricos en tetraspaninas (TEM) y nanodominios GPI con sus respectivos integrantes específicos.

Tabla II: Principales proteínas transmembrana asociadas a tetraspaninas

PROTEÍNA	ASOCIADA A	PROTEÍNA	ASOCIADA A
EWI-2/PGRL	CD9/CD81/CD82	Leu 13	CD81
EWI-F/CD9P-1/FPRP	CD9/CD81	BCR/IgM	CD9, CD81
$\alpha 3\beta 1$	CD151, CD9	CD224/ γ -glutamyl-transferasa 1	CD9,CD37,CD81,CD53,CD82
$\alpha 7\beta 1$	CD151, CD9	ICAM-1/CD54	CD9
$\alpha 6\beta 1$	CD151, CD9	VCAM-1/CD106	CD151
$\alpha 6\beta 4$	CD151	HLA-DM y CD86	
$\alpha M\beta 2$	CD63	MHC-I	CD82,CD81, CD53
$\alpha 4\beta 1$	CD81	MHC-II	CD53,CD81, CD82,CD37
$\alpha L\beta 2$	CD82, CD63	EP-CAM/GA733-2	CD9, D6.1A/CO-029/Tspan8
$\alpha 1\beta 1$	CD9	Lu/B-CAM/CD239	CD9
$\alpha 2\beta 1$	CD9, CD151	GA733-1/ TACSTD2	CD9
$\alpha 5\beta 1$	CD9,CD151	Claudina-1	CD9
$\alpha v\beta 5$	CD81	Claudina-7	D6.1A/CO-029/Tspan8
gpIIb-IIIa	CD9, CD151	E-cadherina	CD151
CD41/gpIIb	CD9	L6	CD151
CD42/gpIb	CD9	H,K-ATPasa	CD63
GPVI	Tspan9, CD151	Dectina-1	CD63, CD37
Sindecano	CD9	EGFR	CD82
CD2	CD9,CD53	GPCR56	CD9, CD81
CD3	CD9,CD81,CD82	BAI2	CD9
CD4	CD81,CD82	cKit/CD117	CD9,CD63,CD81
CD5	CD9	Pro-TGF- α	CD9
CD8	CD81,CD82	Pro-HB-EGF	CD9
CD19	CD81	ADAM10/CD156c	CD9
CD20	CD53,CD81,CD82	MT1-MMP	CD151,CD63,CD9,CD81,Tspan12
CD21	CD81	TADG-15, matriptasa	CD9
CD26/dipeptidil peptidasa IV	CD9	UroplakinaII	UPIa
CD36	CD9	UroplakinaIII	UPIb
CD38	CD9	CTL1/CD92	CD9
		CTL2	CD9
CD44	CD9, D6.1A/CO-029/Tspan8	CDCP1/CD318	CD9
CD46	CD9	Hem-1	CD9
CD47	CD9	Sintaxinas 3 y 4A	CD9

Sin embargo, se han encontrado muy pocos ligandos específicos en *trans*. Así, CD9 es el receptor de PSG17 en ratones y en humanos (Waterhouse et al., 2002). CD9 también actúa como receptor de IL-16 (Qi et al., 2006; Waterhouse et al., 2002) y CD63

es receptor del inhibidor de metaloproteinasas en tejidos, TIMP-1 (Jung et al., 2006). Sin embargo, el papel funcional de las tetraspaninas ocurre fundamentalmente a través de la regulación de los receptores asociados en *cis* dentro de los TEM (Hemler, 2001).

1.2.2.2 ESTRUCTURA

Los estudios bioquímicos y estructurales han apoyado la existencia de los microdominios ricos en tetraspaninas. Estos microdominios desempeñan una labor como organizadores de complejos moleculares en la membrana plasmática, integrando receptores de membrana y moléculas intracelulares de señalización (Hemler., 2005; Min et al., 2006; Nydegger et al., 2006; Yáñez-Mó et al., 2009). La utilización -en ensayos de inmunoprecipitación- de distintos detergentes, ha contribuido a conocer la organización de la red de tetraspaninas (**Figura 4**) que se basa en múltiples niveles de interacción. El primer nivel incluye interacciones primarias entre tetraspaninas específicas y otras proteínas. Estas interacciones son directas, formando complejos que resisten a la lisis en detergentes como Tritón X-100 o NP40 1%. El segundo nivel de interacción está mediado por la asociación entre distintas tetraspaninas y, aunque también directa, es sensible a los detergentes anteriores y se observan en detergentes como Brij96 o Digitonina. En el último nivel de interacción los complejos se mantienen cuando las células se lisan en Brij 58, Brij56, Brij 99 o CHAPS (Hemler, 2001; Tarrant et al., 2003).

Cabe destacar que ya no sólo los estudios de inmunoprecipitación con distintos detergentes, sino también las nuevas técnicas emergentes basadas en el análisis microscópico (como FRET, FRAP y FCS) de células *in vivo*, están sirviendo de ayuda para describir aspectos desconocidos de los microdominios de tetraspaninas, como su tamaño (Barreiro et al., 2008), dinámica, etc.

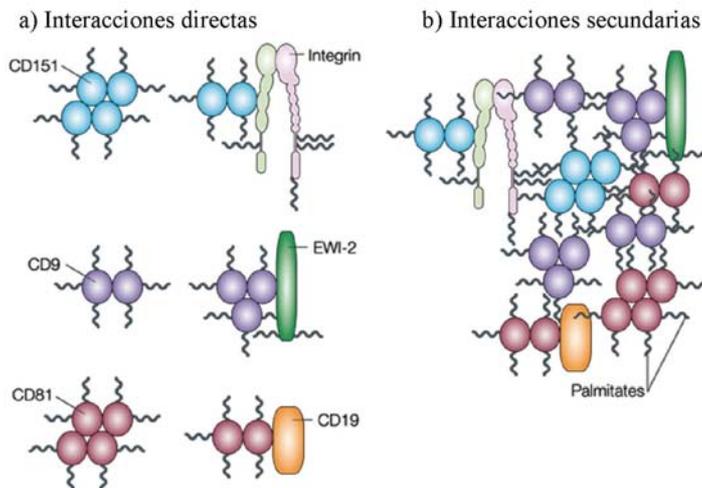


Figura 4: Interacciones Moleculares de las tetraspaninas: A) Nivel 1: Interacciones directas que incluyen homodímeros y homotetrámeros de tetraspaninas y heteroasociaciones con proteínas transmembrana como algunas integrinas, CD19 y las proteínas EWI. B) Nivel II: Interacciones secundarias. (Hemler, 2005).

1.2.2.3 CONEXIONES INTRACELULARES CON LOS MICRODOMINIOS DE TETRASPANINAS

Se han descrito asociaciones entre los microdominios de tetraspaninas y moléculas señalizadoras como por ejemplo la fosfatidilinositol-4-kinasa (PI4K), una enzima importante en la síntesis de fosfatidilinositol. Al menos cinco tetraspaninas diferentes se asocian con PI4K: CD9, CD63, CD81, CD151 y A5/TALLA1 (Yauch and Hemler, 2000). El reclutamiento por parte de estas tetraspaninas de PI4K conlleva la conversión de los PtdIns en PtdIns4P susceptibles entonces de nueva conversión a PtdIns (3,4)P₂ por la enzima PI3K o a PtdIns (4,5)P₂ por la PI4P5K.

La proteína quinasa C (PKC) también se asocia a las tetraspaninas CD9, CD53, CD81, CD82 y CD151. La inclusión de esta enzima en los microdominios de tetraspaninas parece ser necesaria para la fosforilación de la integrina $\alpha 3$ y la señalización hacia FAK, p130cas y paxilina en el contexto de adhesión y migración (Zhang et al., 2001). En el caso de CD82, su capacidad de asociarse con PKC requiere la presencia de Caveolina-1 (Wang et al., 2007). Respecto a la quinasa FAK se ha descrito que anticuerpos anti-tetraspaninas afectan a su fosforilación tanto positiva como negativamente, según las condiciones experimentales (Berditchevski and Odintsova, 1999). En células que carecen de la tetraspanina CD151 las moléculas señalizadoras FAK, Src (aunque para esta quinasa algunos trabajos lo contradicen (Takeda et al., 2007)), Akt, eNos y las GTPasas Rac y Cdc42 presentan disminuida su

actividad (Takeda et al., 2007). La sobreexpresión de CD151, sin embargo, activa a JNK, PI3K, PKB y eNOS en procesos de neovascularización (Zheng and Liu, 2006; Zuo et al., 2009). Sin embargo, otros autores han descrito que CD151 afecta negativamente la vía de señalización a través de Ras/ERK/MAPK1-2, sin cambios aparentes en la actividad de FAK (Sawada et al., 2003). La tetraspanina CD9 también se ha relacionado con la fosforilación de FAK (Scherberich et al., 2002), RhoA y Rac (Imhof et al., 2008) en procesos de migración celular. CD151 además induce la activación de Rac y Cdc42 dependiente de PKC pero no la de Rho (Shigeta et al., 2003), mientras que la depleción de CD151 produce una excesiva activación de RhoA (Johnson et al., 2009). Anticuerpos anti-CD82, en combinación con un anticuerpo anti-CD3, producen cambios en la morfología, adhesión y activación de los linfocitos T (Lagaudriere-Gesbert et al., 1998), dependientes de la GTPasa Rho (Delaguillaumie et al., 2002), p56Lck (Takahashi et al., 2007), ZAP70 y LAT (Delaguillaumie et al., 2002).

Por último, las tirosina-quinazas de la familia Src, Lyn y Hck se asocian a los complejos CD63-integrinas $\beta 2$ (Skubitz et al., 1996), mientras que otra tirosina-quinasa Fgr, junto con Hck, se asocia a la tetraspanina CD9 (Zilber et al., 2005) (**Figura 5**).

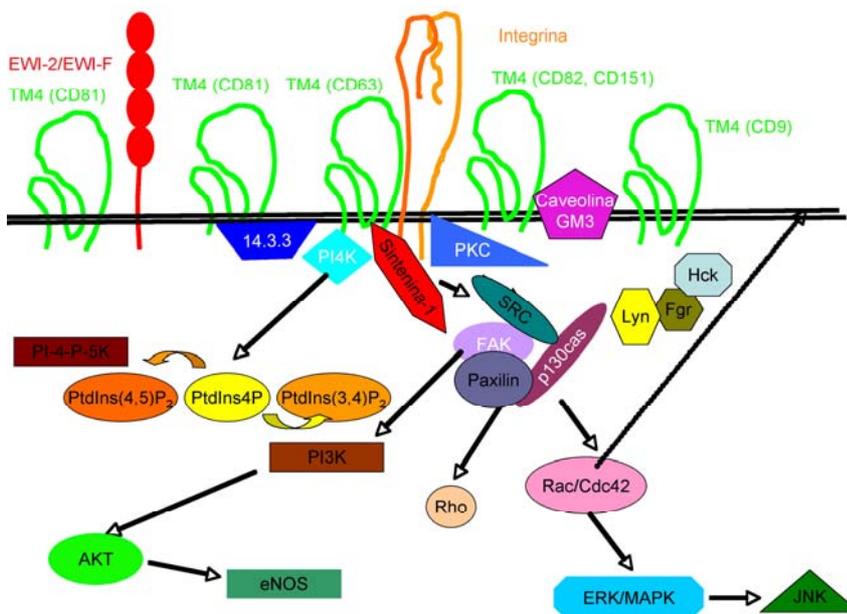


Figura 5: Principales vías de señalización de los microdominios de tetraspaninas. Cascadas de señalización descritas dentro de los microdominios de las tetraspaninas.

1.2.2.4 FUNCIONES DE LOS MICRODOMINIOS DE TETRASPANINAS

Las tetraspaninas, gracias a su capacidad de organizar la membrana plasmática en microdominios, intervienen en muchos procesos en los que, gracias a la delección génica, el silenciamiento o la sobreexpresión proteica y los experimentos de mutagénesis se han revelado su papel. Estos procesos son, fundamentalmente, la regulación de la adhesión intercelular, la adhesión a la matriz extracelular, la fusión de membranas o la regulación del tráfico intracelular de receptores, entre otros (Berditchevski, 2001; Hemler, 2003; Levy and Shoham, 2005; Yanez-Mo et al., 2009; Yanez-Mo et al., 2001) (**Figura 6**) (**Tabla III**).

Tabla III: Principales funciones de las tetraspaninas y bibliografía correspondiente (debido a la gran cantidad de estudios, en la mayoría hemos acotado para los últimos 10 años)

FUNCIÓN GENERAL	FUNCIÓN ESPECÍFICA	REFERENCIAS
FUSIÓN DE MEMBRANAS	Fusión óvulo-espermatozoide	(Glazar and Evans, 2009; Kaji et al., 2002; Komorowski et al., 2006; Le Naour et al., 2000; Mahbub Hasan et al., 2007; Miller et al., 2000; Rubinstein et al., 2006; Takahashi et al., 2001; Tanigawa et al., 2008; Ziyat et al., 2006)
	Infección por el virus HIV, formación de células gigantes multinucleadas o sincitios por HIV y otros virus	(Deneka et al., 2007; Garcia et al., 2008; Garcia et al., 2005; Gordon-Alonso et al., 2006; Grigorov et al., 2009; Ho et al., 2006; Jolly and Sattentau, 2007; Kremensov et al., 2009; Mazurov et al., 2006; Mazurov et al., 2007; Nydegger et al., 2006; Ruiz-Mateos et al., 2008;

		Sato et al., 2008; Thali, 2009; Weng et al., 2009; Yoshida et al., 2008)
ADHESIÓN INTERCELULAR	Presentación antigénica	(Douglass and Vale, 2005; Kropshofer et al., 2002; Mittelbrunn et al., 2009; Mittelbrunn et al., 2002; Munoz et al., 2008; Poloso et al., 2006; Sheng et al., 2009; Unternaehrer et al., 2007; VanCompernelle et al., 2001; Vogt et al., 2002; Wright et al., 2004)
	Unión del virus HCV	(Evans et al., 2007; Harris et al., 2008; Kapadia et al., 2007; Masciopinto et al., 2001; Meuleman et al., 2008; Rocha-Perugini et al., 2009; Rocha-Perugini et al., 2008; VanCompernelle et al., 2003)
	Infección por <i>Plasmodium</i> (Paludismo) y <i>Listeria</i>	(Charrin et al., 2009; Silvie et al., 2006a; Silvie et al., 2006b; Silvie et al., 2003; Tham et al., 2010; Yalaoui et al., 2008a; Yalaoui et al., 2008b)
	Extravasación leucocitaria	(Barreiro et al., 2005; Barreiro et al., 2002; Barreiro et al., 2008; Feigelson et al., 2003; Kramer et al., 2009)
ADHESIÓN A MATRIZ	Formación de Hemidesmosomas	(Kovalenko et al., 2007; Ladwein et al., 2005; Le Naour

EXTRACELULAR Y MIGRACIÓN		and Zoller, 2008)
	Migración, Invasión, Metástasis	(Kuhn et al., 2007; Le Naour et al., 2006; Lekishvili et al., 2008; Liu and Zhang, 2006; Ovalle et al., 2007; Sugiura and Berditchevski, 1999; Zoller, 2009)
	Angiogénesis	(Gesierich et al., 2006; Longo et al., 2001; Silverstein and Febbraio, 2009; Zhang et al., 2009)
	Regulación de metaloproteinasas	(Arduise et al., 2008; Lafleur et al., 2009; Shi et al., 2000; Sugiura and Berditchevski, 1999; Takino et al., 2003; Yanez-Mo et al., 2008)
REGULACIÓN DEL TRÁFICO INTRACELULAR	Infección por Papilomavirus	(Spoden et al., 2008)
	Exosomas	(Izquierdo-Useros et al., 2009; Morelli et al., 2004; Nazarenko et al.)
	Tráfico intracelular de integrinas y receptores de crecimiento	(Latysheva et al., 2006; Liu et al., 2007; Odintsova et al., 2000; Rous et al., 2002; Shi et al., 2000)

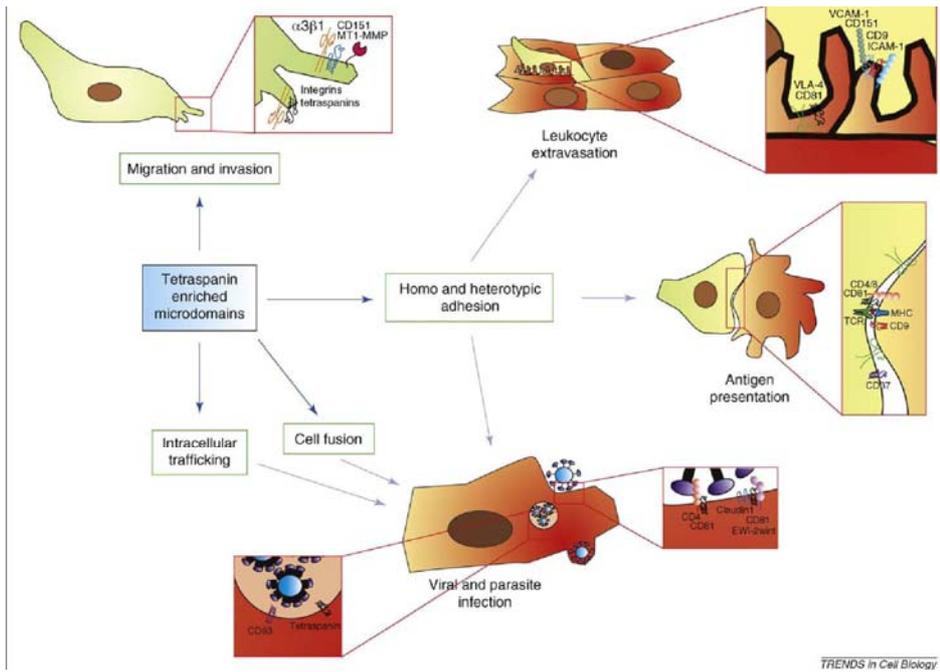


Figura 6: Principales funciones de las tetraspaninas: Los microdominios ricos en tetraspaninas, merced a su capacidad de reclutar receptores de adhesión y moléculas de señalización intracelular intervienen en una gran variedad de procesos tales como migración, invasión, adhesión intercelular, fusión de membranas y tráfico intracelular, entre otros (Yanez-Mo et al., 2009).

1.3. LAS PROTEÍNAS EWI

En 2001 se caracterizó una nueva subfamilia de proteínas Ig formada por cuatro miembros, EWI-2, EWI-F, EWI-3 y EWI-101 (**Figura 7**) caracterizadas por presentar los aminoácidos glutámico, triptófano e isoleucina (motivo EWI) en uno de sus dominios extracelulares tipo inmunoglobulina.

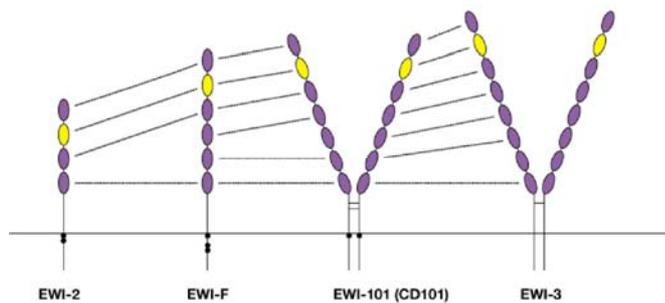


Figura 7: Miembros de la nueva familia EWI de inmunoglobulinas: Formada hasta el momento por 4 miembros, EWI-2, EWI-F, EWI-101 y EWI-3. Todos ellos presentan un 37-57% de homología en los dos primeros dominios (señalados en amarillo) (adaptado de Martin E. Hemler, Harvard University, Boston, USA).

Tanto EWI-2 como EWI-F se asocian por su región extracelular a las tetraspaninas CD9 y CD81 (Charrin et al., 2003; Stipp et al., 2001). Esta unión es

directa, específica y estable. También se unen a otras tetraspaninas, como CD151, pero de forma indirecta, posiblemente a través de las tetraspaninas nombradas anteriormente (Stipp et al., 2001). Son, por tanto, componentes de la red de tetraspaninas y esto sugiere que puedan tener un papel en los procesos en los que estos dominios están implicados. De hecho, EWI-2 interacciona con las integrinas asociadas a tetraspaninas $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha 4\beta 1$ y regula sus funciones de adhesión a la matriz extracelular (Kolesnikova et al., 2004; Stipp et al., 2003). EWI-2 también ha sido implicado como regulador negativo en la migración de células de cáncer de próstata (Zhang HA et al., 2003) y participa en los procesos de fusión óvulo-espermatozoide (Glazar et al., 2009; Yang et al., 2006) y como inhibidor en la entrada del virus HCV (Schuster et al., 2009; Rocha-Perugini et al., 2008). Un estudio en células dendríticas revela que EWI-2 es receptor de la proteína “heat shock protein” HspA8. La interacción entre estas dos proteínas tiene consecuencias en el posterior comportamiento de las células dendríticas, regulando la transición entre la respuesta inmune innata y específica (Kettner et al., MCB). Por su parte, EWI-F está implicado como regulador negativo en la infección de hepatocitos por la especie de *Plasmodium* causante de la malaria *P. Yoelii* (Charrin et al., 2009).

Tanto EWI-2 como EWI-F constan de una parte extracelular compuesta por 2 ó 4 dominios tipo inmunoglobulina, una región transmembrana y una región citoplásmica de 10 y 27 aminoácidos respectivamente para EWI-2 y EWI-F, entre los que se incluyen residuos de arginina y lisina que les confieren una carga neta positiva (Stipp et al., 2001; Charrin et al., 2001).

1.4. EL CITOESQUELETO CELULAR

El citoesqueleto es un entramado tridimensional de proteínas que provee soporte interno a las células e interviene en los fenómenos de movimiento, transporte y división, entre otros (Pollard, 2003). Es, además, una estructura dinámica que se desmantela y se reconstruye sin cesar (Sechi and Wehland, 2000). En células, se forma a partir de tres tipos principales de filamentos proteicos: microtúbulos, filamentos de actina y filamentos intermedios, unidos entre sí y a otras estructuras celulares mediante proteínas adaptadoras. En nuestro estudio hemos centrado la atención en el citoesqueleto de actina, cuyas principales funciones fisiológicas están relacionadas con la motilidad celular y los cambios morfológicos de la célula: Participa en la organización del citoplasma para generar fuerzas mecánicas en respuesta a diversas señales

extracelulares, es esencial para algunas actividades contráctiles y controla las interacciones celulares, la adhesión molecular, y el transporte intracelular (Schmidt and Hall, 1998; Small et al., 1999).

Nos hemos centrado en dos contextos en los que el citoesqueleto de actina está finamente regulado: La migración celular y la Sinapsis Inmune.

1.4.1 Migración, polaridad celular y quimiotaxis

La migración celular juega un papel clave en una gran variedad de procesos biológicos que tienen lugar tanto durante la embriogénesis como en el organismo adulto. El avance en el conocimiento de los mecanismos que regulan la migración celular es pues esencial para entender tanto patologías humanas como la metástasis, como procesos fisiológicos normales, como la migración de fibroblastos durante la cicatrización. En este trabajo de tesis, nos hemos centrado en el contexto de la migración de los leucocitos (en concreto de los linfocitos) hacia estímulos quimiotácticos o quimiotaxis. Los linfocitos, durante la migración, adoptan una morfología polarizada en la que se diferencian el urópodo (en la parte trasera) y el frente de avance (Figura 8).

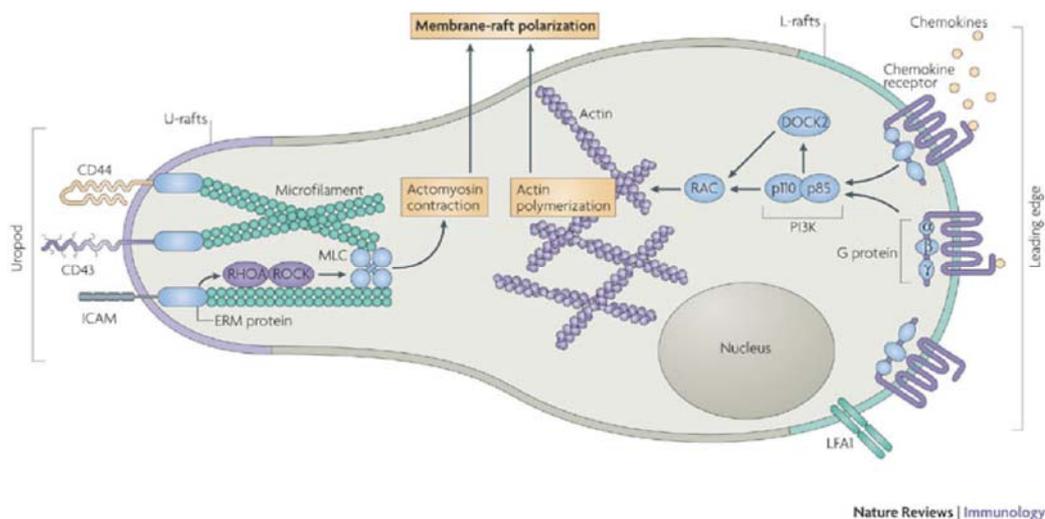


Figura 8: Los linfocitos adoptan una morfología polarizada ante estímulos quimioatrayentes. Se pueden distinguir en esta morfología el urópodo, donde se sitúan las proteínas adaptadoras ERM, CD43, CD44 e ICAMs, y el frente de avance, donde se localizan la integrina LFA-1 y los receptores de quimiocinas, entre otros (Viola and Gupta, 2007).

Mediante este cambio morfológico el linfocito puede realizar el proceso de migración transendotelial y acudir a la zona del foco inflamatorio guiado por moléculas quimioatrayentes entre las que se encuentran las quimiocinas. Tanto los receptores de

las quimiocinas, las integrinas y otras moléculas de adhesión, como las proteínas del citoesqueleto y otras proteínas reguladoras, se redistribuyen en la célula al polarizarse (Sanchez-Madrid and del Pozo, 1999). Así, como vemos en la figura 7, las proteínas ERM y algunos receptores de adhesión como CD44 e ICAMs se localizan en el urópodo celular, mientras que las integrinas y los receptores de quimiocinas se localizan en el frente de avance de la célula.

1.4.2 La Sinapsis Inmune

La respuesta inmune adaptativa se inicia con la interacción entre el linfocito T y la célula presentadora de antígeno (CPA) portadora de complejos péptido-MHC, que conduce a la activación del linfocito T. Entre ambas células se forma una estructura exquisitamente organizada que se conoce como Sinapsis Inmunológica. Los receptores implicados en el reconocimiento antigénico, así como los receptores de adhesión, se agrupan de forma regulada tanto espacial como temporalmente, dando lugar, pocos minutos después de la interacción T-CPA, a dos estructuras concéntricas que se han denominado complejos supramoleculares de activación (SMAC). Así, en la zona central de la sinapsis, denominada cSMAC (complejo supramolecular de activación central) se localiza el receptor de células T (TCR) y el complejo péptido-MHC de la célula presentadora. El cSMAC está rodeado de un anillo periférico de adhesión donde se concentran el par LFA-1/ICAM-1, denominado pSMAC (complejo supramolecular de activación periférico) (Monks et al., 1998), que está anclado al citoesqueleto de actina a través de la talina. Otras moléculas son activamente excluidas de la SI, como la fosfatasa CD45 y la mucina CD43. La exclusión de CD45 y CD43 de la zona de contacto entre la célula T y la CPA es esencial, ya que ambas moléculas son de gran tamaño (45 nm desde la membrana plasmática) y podrían impedir la interacción de moléculas más pequeñas como el TCR y las moléculas MHC-II (7-8 nm desde la membrana).

Tras el reconocimiento antigénico se produce la estabilización del conjugado célula T-CPA y comienza la redistribución molecular en la zona de contacto. A continuación, la maquinaria de secreción, el aparato Golgi y el centro organizador de microtúbulos (MTOC) del linfocito T son rápidamente relocalizados y reorientados a la zona de contacto (Montoya *et al.*, 2002b). A este estadio de la sinapsis inmunológica se le denomina sinapsis madura. La separación del linfocito T y la CPA ocurre entre 24 y 48 horas después (Ingulli *et al.*, 1997) (**Figura 9**).

ETAPAS DE LA FORMACION DE LA SINAPSIS INMUNE



Figura 9: Etapas en la formación de la sinapsis inmune. El linfocito T contacta transitoriamente con la célula presentadora de antígeno, explorando su superficie en busca de complejos MHC-péptido específicos (Fase 1). Tras el reconocimiento antigénico se produce la estabilización del conjugado y la reorganización supramolecular, agrupándose los receptores TCR/MHC-péptido en la zona central de la sinapsis (cSMAC) y los receptores de adhesión LFA-1/ICAM-1 en la periferia (pSMAC, Fase 2).

A continuación, la maquinaria de secreción, el aparato Golgi y el centro organizador de microtúbulos (MTOC) del linfocito T son rápidamente reorientados a la zona de contacto (Fase 3). La separación del linfocito T y la célula presentadora de antígeno ocurre entre 24-48 horas después (Fase 4). Adaptado de Dr. Vicente-Manzanares. Universidad de Virginia.

De la correcta formación de la sinapsis inmunológica entre las dos células dependen el resto de acontecimientos necesarios para la posterior eliminación de los agentes patógenos. En nuestro laboratorio se ha descrito la presencia de la tetraspanina CD81 en la zona central de la Sinapsis Inmunológica (Mittelbrunn et al., 2002). Esta proteína se une físicamente a los correceptores CD4 y CD8 (Imai et al., 1995), actuando como molécula coestimuladora (Maecker, 2003; Witherden et al., 2000) para los linfocitos T y promoviendo el reconocimiento T-B vía LFA-1 (VanCompernelle et al., 2001). En linfocitos B, forma parte del correceptor de estas células junto con CD19 y CD21 (Fearon, 1993). Asimismo, también se asocia al MHC de las células APC (Szollosi et al., 1996).

1.4.3 Proteínas que participan en la regulación del citoesqueleto de actina

1.4.3.1 Proteínas ERM

Las ERM (Ezrina/Radixina/Moesina) son proteínas que, a través de su extremo N-terminal, se unen a proteínas de la membrana plasmática y, a través de su extremo C-terminal, conectan con actina filamentosa (F-actina). De este modo hacen de puente entre el citoesqueleto de actina y la membrana plasmática (Yonemura et al., 1998).

Cuando las ERMs se encuentran inactivas en el citoplasma presentan una conformación plegada debido a la interacción molecular de sus extremos N- y C-terminal (**Figura 10**). En presencia de ciertos estímulos, como la fosforilación del aminoácido treonina de su dominio C-terminal por las quinasas PKC y ROCK o la unión de PIP₂ al dominio N-terminal (Tsukita and Yonemura, 1999), las ERMs se activan, desplegándose la molécula y uniéndose a actina y a la membrana (Tsukita and Yonemura, 1999). En este estado activo son capaces de reclutar proteínas reguladoras como Syk (a través de sus dominios ITAM), ZAP-70 o Cdc42, interviniendo de este modo en procesos de señalización intracelular (Nakamura et al., 2000; Takahashi et al., 1997; Urzainqui et al., 2002).

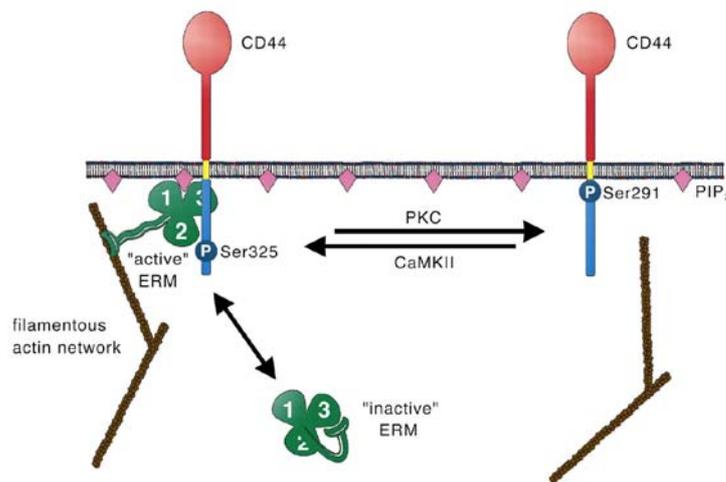


Figura 10: Moléculas asociadas al citoesqueleto I. Proteínas ERM (actina, radixina, moesina): Las proteínas ERM se encuentran inactivas en el citoplasma. Frente a determinados estímulos se activan, abriendo su configuración y uniéndose tanto a proteínas de la membrana como a actina. De este modo conectan el citoesqueleto de actina con la membrana plasmática (Thorne et al., 2004).

Se han descrito varias proteínas de membrana que, a través de las ERM, se anclan al citoesqueleto de actina. Algunas de estas proteínas son CD44, CD43, ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3 (Barreiro et al., 2002; Nakamura and Ozawa, 1996; Serrador et al., 1997; Serrador et al., 1998; Urzainqui et al., 2002). La mayoría tienen en común la presencia en sus regiones citoplásmicas de residuos básicos de arginina/lisina/alanina que les confieren una carga neta positiva que favorece la unión a las ERM (Tsukita and Yonemura, 1999).

1.4.3.2 Filamina-A

Las Filaminas (A,B,C) (**Figura 11**) son proteínas de unión a actina que estabilizan los filamentos de actina organizándolos en redes de estructura tridimensional (Tseng et al., 2004). Los modelos de animales deficientes en Filamina han demostrado su papel en el desarrollo embrionario (la deficiencia de filamina provoca heterotopia povertricular) y la progresión de enfermedades como la enfermedad ligada al cromosoma X (Feng and Walsh, 2004; McGrath, 2006). Se ha descrito la unión de Filaminas y en concreto, de Filamina-A (la única isoforma que se expresa en linfocitos T (Calderwood et al., 2001)), a receptores de membrana y a proteínas de señalización. Por ejemplo, Filamina-A se une a PKC- α (Tigges et al., 2003), a las integrinas $\beta 1$ y $\beta 7$ (Kiema et al., 2006; Travis et al., 2004), a caveolina-1 (Stahlhut and van Deurs, 2000), a Rac y Rho (Bellanger et al., 2000; Mammoto et al., 2007; Ohta et al., 2006) y a ROCK (Ueda et al., 2003). Por tanto, la Filamina-A posee funciones adaptadoras al conectar y coordinar procesos en los que la regulación de la actina presenta una función principal (Feng and Walsh, 2004).

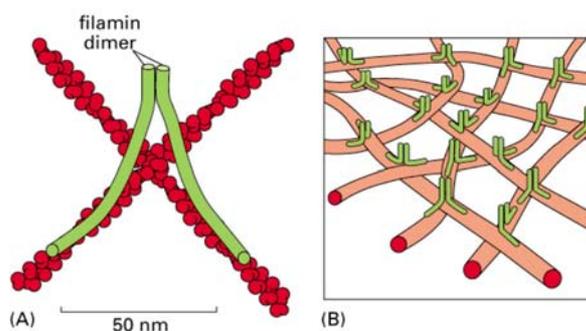


Figura 11: Moléculas asociadas al citoesqueleto II. Filamina: La filamina une microfilamentos de actina formando redes (Alberts B., 1996).

Por otra parte, se ha descrito la interacción de Filamina-A con la proteína coestimuladora CD28, siendo necesaria para la reorganización del citoesqueleto de actina que permite el reclutamiento de microdominios lipídicos y proteínas señalizadoras necesarias para la formación y maduración de la sinapsis inmune (Tavano et al., 2006). En este contexto de activación, la Filamina-A colocaliza con PKC- θ , y es necesaria para la correcta producción de IL-2 (Hayashi and Altman, 2006). Por otra parte, Filamina-A, mediante su interacción con los receptores y correceptores del virus VIH CD4 y CXCR4 participa en la reorganización del citoesqueleto de actina mediada

por el virus a través de la cascada de señalización Rho-ROCK (Jimenez-Baranda et al., 2007).

1.4.3.3 α -Actinina

α -Actinina (**Figura 12**) es una proteína de unión a F-Actina que pertenece a la superfamilia de la espectrina. Esta proteína funciona como un dímero anti-paralelo, dejando un dominio de unión a Actina en cada extremo del dímero (Sjoblom et al., 2008). Además, α -Actinina interacciona con distintos fosfoinositoles que regulan negativamente su actividad entrecruzadora de filamentos de actina (Fraley et al., 2003). Además de esta función entrecruzadora, α -Actinina, al igual que las ERMs, conecta el citoesqueleto con diferentes proteínas de membrana, sirviendo de proteína adaptadora con diversas cascadas de señalización (Otey et al., 2004).

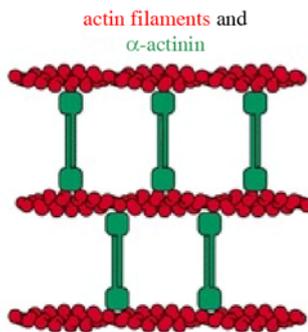


Figura 12: Moléculas asociadas al citoesqueleto III: α -Actinina. α -Actinina une microfilamentos de actina formando haces (Alberts B., 1996).

α -Actinina está implicada en procesos de migración celular al interactuar con moléculas de adhesión como las integrinas β_1 , β_2 , (Otey et al., 1990; Pavalko and LaRoche, 1993) ICAM-1,2 (Carpen et al., 1992; Heiska et al., 1996) y conectarlas con el citoesqueleto cortical de actina (Pavalko et al., 1991) y con fosfoinositoles, quinasas (PI3K y MEKK1, FAK) y señales inductoras de Ca^{2+} . Existen varias isoformas de esta proteína, las más relevantes parecen ser la 1 y la 4 en linfocitos T (Celli et al., 2003). Además la isoforma 4 es más abundante en células motiles y está implicada en metástasis, donde presentan un papel supresor de tumores (Nikolopoulos et al., 2000), regula procesos de hipoxia en macrófagos (Daniliuc et al., 2003) y es indispensable para la correcta morfología de los podocitos renales (Kos et al., 2003).

1.4.3.4. Sintenina-1

Sintenina-1 (**Figura 13**) es una proteína adaptadora que posee dos dominios PDZ (derivado de *Postsynaptic density, Discs large and Zonula occludens*) por los que se une a Sindecano (Grootjans et al., 2000), a PIP₂ (fosfoinositol-4,5-bisfosfato) (Zimmermann et al., 2002) y a la tetraspanina CD63 (Latysheva et al., 2006). El sitio de unión de PIP₂ precisa de ambos dominios PDZ y se superpone con el sitio de unión a otras proteínas por lo que se ha propuesto que PIP₂ actúa como un posible regulador de la función adaptadora de Sintenina-1 (Latysheva et al., 2006).



Figura 13: Moléculas asociadas al citoesqueleto IV. Sintenina-1: Sintenina-1 comprende un dominio N-terminal y dos dominios PDZ (Latysheva et al., 2006).

Esta proteína se ha implicado recientemente en procesos de metástasis, función neuronal, y tráfico vesicular (Beekman et al., 2008), por lo que su implicación en procesos de regulación de la migración a través de actina es más que probable.

En cuanto a su función en el sistema inmune, se ha descrito que Sintenina-1 interacciona con CD6 en los linfocitos T (Gimferrer et al., JI). Por otra parte, se ha demostrado que otras proteínas con dominios PDZ se polarizan durante la formación de la Sinapsis inmune (Ludford-Menting et al, Immunity).

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 CÉLULAS Y CULTIVOS CELULARES:

Las líneas celulares y cultivos primarios usados en este trabajo son, por orden alfabético:

LÍNEAS T:

CEM 1.3, línea humana de linfoblastos T $\gamma\delta$ polarizada. Se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS y antibióticos.

CH7C17, clon derivado de células Jurkat que poseen un TCR específico (V β 3) para el péptido HA. Se cultivaron en medio RPMI completo suplementado con 4 μ g/ml puromicina y 0.4 mg/ml de higromicina B.

HSB-2 línea de linfocitos humanos T constitutivamente polarizados cultivados en RPMI suplementado con 10% de FBS y antibióticos.

Jurkat J77, clon derivado de la línea Jurkat que posee el TCR V β 8 capaz de reconocer al superantígeno E presentado en el contexto del MHC-II. Se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS y antibióticos.

S3085B (S3), clon de linfocitos CD4 obtenido tras incubación con células presentadoras LG2 irradiadas y monocitos de sangre periférica en medio RPMI suplementado con 0.5 μ g/ml de SEB y 50 U/ml de la citoquina IL-2. El clon fue generado por dilución límite.

LÍNEAS B:

HOM-2, línea linfoblástica B cultivada en RPMI completo con antibióticos que presentan un MHC activado con el péptido HA

Raji, línea linfoblástica B MHC-II+. Se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos.

CÉLULAS PRIMARIAS:

Células Dendríticas humanas, obtenidas de PBLs cultivados en presencia de IL-4 (10 ng/ml) y GMSF (200 ng/ml). La maduración de estas células se obtuvo por estimulación durante 24 horas con LPS (10 ng/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Células endoteliales HUVEC, obtenidas de cordones umbilicales según el protocolo descrito en Yanez-Mo et al., 1998.

Linfoblastos primarios humanos. Se obtuvieron a partir de linfocitos de sangre periférica (PBL, *Peripheral Blood Lymphocytes*) de donantes voluntarios sanos por

centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque ($\rho=1.077$ g/ml). Se separaron los anillos de células mononucleares (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), se lavaron cuatro veces con suero salino y se resuspendieron en medio RPMI-1640 con 10% FBS. Los monocitos se retiraron por adhesión a plástico a 37°C durante media hora. Los PBLs resultantes se activaron durante dos días en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS y antibióticos en presencia de PHA (5 μ g/ml).

Tras 48 h, se retiró la PHA y los linfoblastos se mantuvieron con 50 U/ml de IL-2 humana recombinante (obtenida del *National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program*) durante 5-10 días más hasta su utilización en los experimentos.

OTRAS:

Células HeLa, cultivadas en DMEM o RPMI suplementadas con suero al 10% y antibióticos.

NS-1, células de mieloma de ratón, constitutivamente polarizadas y cultivadas en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal y antibióticos.

2.2 REACTIVOS:

2.2.1 Sondas fluorescentes intracelulares: Las células se marcaron con sondas intracelulares fluorescentes de Molecular Probes (Invitrogen) para los ensayos de citometría de flujo e inmunofluorescencia. Estas sondas poseen cadenas alifáticas que posibilitan que entren en la célula atravesando la membrana plasmática. Una vez en el citosol, las esterasas celulares hidrolizan dichas cadenas alifáticas de forma que la sonda no puede atravesar de nuevo la membrana y salir de la célula. El marcaje se realizó en ausencia de suero (ya que éste contiene esterasas) durante 15 min a 37°C. La sonda no internalizada se eliminó lavando las células marcadas dos veces con medio salino y una vez con medio completo. Las sondas utilizadas son:

- Cell Tracker Orange 5-((and-6)-(4-chloromethyl-benzoyl-amino) tetramethylrhodamine)-mixed isomers (CMTMR), que emite en rojo ($\lambda_{emisión}=565$ nm).
- Cell Tracker Blue 7-amino-4-chloromethylcoumarin (CMAC), cuya fluorescencia es azul ($\lambda_{emisión}=466$ nm).

2.2.2 Faloidina: acoplada a Alexa 488/568/647 (Invitrogen). Toxina capaz de unirse a F-Actina con alta afinidad. Se utilizó diluida 1:200 para ver el patrón de F-Actina por

inmunofluorescencia.

2.2.3 Quimiocinas: SDF-1 α (CCL12) and MIP 3 β (CCL19) se obtuvieron de la casa comercial Peprtech (Londres, UK).

2.2.4 Inhibidores: Los inhibidores de la familia de quinasas Src, PP2 y PP3 se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

2.2.5 Anticuerpos: Se presentan en la siguiente tabla (Tabla IV):

Tabla IV. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Generado en	Técnicas **	Antígeno	Observaciones y comentarios
ANTICUERPOS CEDIDOS				
8A12	Ratón	IF (1/100), FACS (1/100), IP, activación	EWI-2	Dr. Eric Rubinstein (Villejuif, France)
IF11	Ratón	IF (1/100), FACS (1/100), IP	EWI-F	Dr. Eric Rubinstein (Villejuif, France)
Hu5/3	Ratón	IP, FACS, IF	ICAM-1	Dr. F. W. Luscinskas (Harvard Medical School, Boston)
90/3	Conejo	WB (1/2000)	ERM	Dr. Heinz Furthmayr (Stanford University, Stanford, CA)
5A6	Ratón	IF(1:1000), WB(1:1000) Activación	CD81	Dra. Shoshana Levy, Stanford, USA)
488	Conejo	IF	CD3	Dr. Balbino Alarcón (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, España)
4G10	Ratón	WB	P-Tyr	Dr. Balbino Alarcón (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, España)

I33.22	Ratón (ascitis)	IF(1:1000) FACS(1:1000)	CD81	Dr. R. Vilella (Hospital Clinic, Barcelona, España).
Anti-CD28	Ratón	Activación		Dr. Daniel Olive (Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France).
ANTICUERPOS GENERADOS EN NUESTRO LABORATORIO				
TP1/25	Ratón	IF, FACS	ICAM-3	
HP2/9	Ratón	IF, FACS, IP	CD44	
VJ1/12	Ratón	IF, FACS, WB, IP	CD59	
VJ1/20	Ratón	IF, FS, FACS, IP	CD9	
VJ1/10 *	Ratón	IP	CD9	
Lia 1/1.1*	Ratón	IF, IP	CD151	
VJ1/9*	Ratón	IF, IP	CD147	
T3b*	Ratón	IF	CD3	
D3/9*	Ratón	IP	CD45	
TS2/16	Ratón	FACS, IF, IP	β1	
Lia 3/2	Ratón	FACS, IF, IP	CD18	
X63*	Ratón	FACS		Usado como control negativo de tinción
ANTICUERPOS COMERCIALES				
p-ERM	Cabra	WB	ERMs fosforiladas	Fosfoezrina (Thr567)/radixina (Thr564)/moesina

				(Thr558)) Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA).
RR.1	Ratón	Activación	ICAM-1	Santa Cruz(Santa Cruz, CA)
Py-72	Ratón	WB	Fosfo-tirosina	Santa Cruz (Santa Cruz, CA)
Anti-filamina	Ratón	IF, WB	Filamina A	Santa cruz (Santa Cruz, CA) y Abcam (Cambridge, MA)
Anti-RacGTP	Ratón	FACS	Rac-GTP	Millipore (Billerica, MA)
Anti-Rac	Ratón	WB, IF	Rac-1	BD Transduction Laboratories (San Jose, CA)
OKT3	Ratón	Activación	CD3	eBioscience (San Diego, CA)
Anti-Sintenina-1	Conejo	IF(1:100), WB(1:100), IP	Sintenina-1	Synaptic Systems (Göttingen, Germany)
Anti- α -Actinina	Conejo	IF(1:1000) WB(1:1000)	α -Actinina	Reconoce todas las isoformas. Santa Cruz (Santa Cruz, CA)
Anti-Tubulina	Ratón	WB(1:1000) IF (1:1000)	Tubulina	Sigma-Aldrich (San Louis, MO)
Anti-Vimentina	Ratón	WB(1:1000)	Vimentina	Sigma-Aldrich (San Louis, MO)
M2-anti-FLAG	Ratón	IF	FLAG	Sigma-Aldrich (San Louis, MO)
Anti-M-RIP	Conejo	IP, WB	M-RIP	Sigma-Aldrich (San Louis, MO)
Anti-GFP	Conejo Ratón	IP, WB(1:1000)	GFP	Clontech (Mountain View, CA)
ANTICUERPOS SECUNDARIOS				
GAM-488/568	Cabra	IF (1:100)	Ig de ratón	
GAR-488/568	Cabra	IF (1:1000)	Ig de conejo	

GAM-HRP	Cabra	WB (1:2000)	Ig de ratón	
GAR-HRP	Cabra	WB (1:10000)	Ig de conejo	
Estreptavidina-488/PE		FACS (1:500)	Biotina	

* Anticuerpos del laboratorio obtenidos como sobrenadantes del cultivo de hibridomas. Se usaron sin diluir para FACS e IF, y purificados por cromatografía de afinidad a 1-10 µg/ml en los ensayos de inmunoprecipitación y activación celular.

** Técnicas: FACS (citometría de flujo), IF (Inmunofluorescencia), WB (*Western-blot*) e IP (inmunoprecipitación)

La procedencia de los anticuerpos se indica entre paréntesis en el apartado de Observaciones.

GAM: Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón

GAR: Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo

HRP: Peroxidasa de rábano picante

2.2.6 Construcciones de ADN: Las construcciones de ADN de los fragmentos N-terminal de Ezrina y Moesina insertos en el plásmido pCR3 y las versiones de los mismos acopladas a GFP junto con la construcción salvaje de Moesina-GFP fueron cedidas por el Dr. Heinz Furthmayr (Stanford University, Stanford, CA)

Los dominios C-terminal de las proteínas EWI-2, EWI-F, CD81 y CD9 acopladas a la proteína GST se generaron en el laboratorio por amplificación por PCR y posterior clonación usando las dianas EcoR1-Xho1 en el vector pGEX4T2 (GE Healthcare) utilizando los siguientes oligos (Tabla V):

Tabla V: Oligos utilizados para las construcciones acopladas a GST

Construcción	Secuencias 5' - 3'	Vector
EWI-2 C-terminal-GST	GAATTCTTTGCTGCTTCACGAAGAGGCTTCG CTCGAGTTCACCGTTTTTCGAAGGCTCTTC	pGEX4T2
EWI-F C-terminal-GST	GAATTCTGTGCAGCTCCCACTGGTG CTCGAGTCTAGTCCATCTCCATCGAC	pGEX4T2
CD81 C-terminal-GST	GAATTCTTTGCTGTGGCATCCGGAACAGCTC CTCGAGTTCAGTACACGGAGCTGTTCCGG	pGEX4T2

Se muestra en azul las secuencias consenso de las enzimas de restricción usadas (Xho-I y Hind-III)

Los ADN que codifican para las proteínas EWI-2 y EWI-F insertados en pcDNA3 y sus correspondientes versiones que incluyen el epítipo FLAG fueron cedidas por los Dres Eric Rubinstein (Villejuif, Paris, Francia) y Martin E. Hemler (Harvard, Boston, USA). Este último también nos cedió la construcción de EWI-2 que carecía del dominio C-

terminal y que también presentaba el epítipo FLAG extracelular.

Los dominios C-terminal WT y R345Stop (1-11) de la proteína PSGL-1 acoplados a GST se generaron en el laboratorio por el Dr. Juan M Serrador y la Dra. Ana Urzaínqui (Serrador et al., 2002).

El plásmido CD81-GFP fue construido también en el laboratorio por la Dra. María Mittelbrunn a partir de los ADNc de esta tetraspanina en el vector pGFP-N1 (Mittelbrunn et al., 202). Para obtener las versiones truncadas en la región citoplasmática C-terminal de CD81 y EWI-2 se amplificaron los insertos por PCR a partir de los vectores originales usando oligos diseñados para retirar la secuencia correspondiente (ver Tabla II). Los productos amplificados se insertaron en el vector TopoTA (Invitrogen) y después, se subclonaron en el pAcGFP-N1 (Invitrogen). La construcción EWI-2-GFP se realizó del mismo modo utilizando oligos que reconocían la secuencia inicial y final del ADNc original sin el codón stop (ver Tabla VI).

Tabla VI. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de los distintos plásmidos acoplados a GFP.

Construcción	Secuencias 5' - 3'	Vector
CD81 Δ Cyt-GFP	CTCGAGATGGGAGTGGAGGGCTGC AAGCTTACAGCACAGCACCATGCT	pAcGFP-N1
EWI-2-GFP	CGAGATCTCATGGGCGCCCTCAGGC CGAAGCTTCCGTTTTTCGAAGCCTC	pAcGFP-N1
EWI Δ Cyt -GFP	CGAGATCTCATGGGCGCCCTCAGGC CGAAGCTTGCAGCAAGTGATGGTACCAAG	pAcGFP-N1

Se muestra en azul las secuencias consenso de las enzimas de restricción usadas (Xho-I y Hind-III) y en rojo el codón de inicio.

Las construcciones de α -Actinina-GFP y ActininaABD-GFP fueron donadas por los Dres. Jonathan Jones (Northwestern University, Chicago) y Maki Murata-Hori (National University of Singapore, Singapur), respectivamente.

Sintenina-1 acoplada a GST fue cedida por el Dr. Francisco Lozano (IDIBAPS, Barcelona). También la construcción HAGFP y Psr α -HAGFP-Sintenina-1 que se generó clonando el ADNc de Sintenina-1 obtenido por corte de *EcoRI/EcoRI* del plásmido PMT2-HA-Sintenina-1 (Gimferrer et al., 2005) e introduciéndolo en el

correspondiente plásmido Psr α - HAGFP. Los mutantes de Sintenina-1 GFPHA se generaron a partir de la construcción salvaje usando un kit de mutagénesis (Quickchange Multi-Site Directed Mutagenesis Kit from Stratagene (La Jolla, CA)). Las secuencias empleadas fueron las siguientes (Tabla VII):

Tabla VII: Secuencias empleadas para la obtención de los distintos mutantes de la Sintenina-1

Construcción	Secuencias 5' - 3'
Y3	GATGGAAATCTGTTTCCTAAACTGTTTCCA GAGCTCTCTCAATTCATGGGACTGTC
Y1	GGAATTCATGTCTCTTTTT CCATCTCTTGAAGATTGAAGGTAGAC
Y4	AMBOS OLIGOS

2.2.7 Oligonucleótidos específicos para el silenciamiento de la expresión de proteínas:

El silenciamiento de las diversas proteínas se llevó a cabo transfectando las células diana con dúplex de ARN interferentes de pequeño tamaño (*siRNA*) específicos para cada molécula (Tabla VIII). Las células usadas en este trabajo se transfectaron mediante electroporación o nucleofección (ver apartado correspondiente TRANSFECCIÓN DE ADN Y ARN). Como control negativo se utilizó un dúplex de ARN diseñado por Eurogentec que no aparea con ningún ARNm eucariota.

Tabla VIII. Oligonucleótidos de interferencia utilizados.

	Secuencia 5' - 3'	Máx. interferencia (Tipo celular)
Sintenina-1	J-008270-08 Dharmacon J-008270-06 Dharmacon	48h (CEM 1.3) 48h (J77)
EWI-2	1627 Dharmacon GUUCUCCUAUGCUGUCUU (Eurogentec) GGCUUCGAAAACGGUGAUC (Ambion)	48h (CEM 1.3) 48h (J77)

La reducción de la expresión de las proteínas interferidas se cuantificó a distintos tiempos mediante citometría de flujo, para aquellas proteínas que se expresaban en la

membrana celular y/o por western blot de lisados totales. De este modo se estableció el tiempo de máxima interferencia para cada molécula, oligonucleótido y tipo celular (ver TablaVIII).

2.3 TRANSFECCIÓN DE ADN Y ARN:

La transfección transitoria de las células CEM o J77 se realizó bien por electroporación o por nucleofección. Para la electroporación las células ($1-2 \times 10^7$) se lavaron 2 veces con PBS frío y se transfectaron en medio OPTIMEM (Invitrogen) con 20 μ g de los plásmidos o 2 μ M de los oligos de siRNA correspondientes y se sometieron a 250-280 V (250 para las CEM 1.3 y 280 para las J77) y 1200 μ F (Gene Pulser II, Bio-Rad) en cubetas de 0.4 μ . Para la nucleofección se empleó el kit Nucleofector V (programa T-14) (Amaxa GmbH, Cologne, Germany).

2.4 FORMACIÓN DE CONJUGADOS T-CPA:

Para la activación antígeno específica se utilizaron como células presentadoras las células Hom-2 (5×10^6), cargadas con la sonda azul CMAC. Estas células se incubaron a 37°C durante 3 horas con el péptido HA 307–319 (200 μ g/ml), y posteriormente se añadieron las células T HA específicas CH7C17, en un ratio de 1:3.

Para la activación con superantígeno las presentadoras utilizadas fueron las células B RAJI cargadas con la misma sonda CMAC (1nM) e incubadas durante 20 minutos con 1 μ g/ml de superantígeno E (SEE, obtenido de Toxin Technology). Después las Raji se pusieron en contacto con células T J77 mediante un pulso de 30 segundos a 800 rpm y se incubaron a los tiempos indicados a 37°C. Para las cinéticas de fosforilación, dado que lo que nos interesaba era la fosforilación de la célula T, se utilizó una relación de CPA:T de 1:6. Para el resto de ensayos se utilizó una relación de CPA:T de 1:1. Las células dendríticas se obtuvieron de monocitos tal y como se ha descrito anteriormente, se cargaron con 1 μ g/ml de SEE, se marcaron con la sonda intracelular CMAC (1nM) y se conjugaron con las células T J77 mediante un pulso de 30 segundos a 800 rpm y se incubaron a los tiempos indicados a 37°C.

2.5 INMUNOFUORESCENCIA Y CITOMETRÍA DE FLUJO

Para analizar por fluorescencia los conjugados T-B las células se sembraron sobre cristales previamente recubiertos con poli-L-Lisina durante 30 min a 37°C y se fijaron con PBS 3% para-formaldehído durante 5 min. Para las células CEM, HSB-2, NS1 y los PBLs los cristales se cubrieron con FN a 20 y 50 (en el caso de los PBLs) µg/ml. (Mittelbrunn et al., 2002; Sala-Valdes et al., 2006). Las células HeLa se adhirieron directamente a los cristales y las células HUVEC se adhirieron a gelatina al 1%.

Después de un lavado con TBS, se permeabilizaron (0.1% Tritón X-100 en TBS, 5-10 min) en los casos necesarios, se bloquearon con TBS 1% BSA (1 h a 37°C), y se incubaron con los anticuerpos primarios convenientes (ver Tabla I) durante 30 min a 37°C. Los cristales se lavaron de nuevo con TBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios apropiados durante 30 min a 37°C (ver Tabla IV). En los casos de dobles tinciones con posible reacción cruzada entre anticuerpos secundarios (secundario anti-ratón seguido de un primario de ratón biotinilado), se realizó una incubación previa a la segunda tinción de 1 h a 37°C con suero de ratón (diluido 1:100). Las preparaciones se lavaron finalmente con TBS y se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje (mowiol). Para las células CEM y los PBL's los cristales se cubrieron con Fibronectina (FN) a 20 y 50 µg/ml respectivamente. (Mittelbrunn et al., 2002; Sala-Valdes et al., 2006)

Las muestras se visualizaron posteriormente usando un microscopio de fluorescencia Leica DMR con un objetivo de aceite de inmersión HCX PL APO 63/1.32-0.6 (Leica) y acoplado a una cámara COHU 4912-5010. Las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron con un microscopio de láser confocal Leica TCS-SP5 con un objetivo de aceite de inmersión HCX PL APO lambda blue 63/1.4 y se analizaron mediante un software de Leica.

Las imágenes con código de color para la intensidad de fluorescencia se obtuvieron usando el software de Leica LAS-AF.

Para los ensayos de citometría de flujo las células se tiñeron con anticuerpos específicos, añadiéndose el anticuerpo secundario marcado en los casos en los que los anticuerpos primarios no estaban marcados directamente. Después, las muestras se analizaron en el citofluorímetro FACScan® (Becton Dickinson, San José, CA) usando el programa informático Cell Quest (Becton Dickinson).

2.6 ENSAYOS DE VIDEO-MICROSCOPIA CONFOCAL:

Para realizar los ensayos de videomicroscopía a tiempo retardado de este trabajo de tesis, las células se sembraron en cristales recubiertos con poli-L-Lisina o FN y posteriormente se insertaron en cámaras que se introdujeron en un incubador que mantiene las células a 37°C y 5% de CO₂. Una vez elegido el campo de interés se adquirieron series de secciones ópticas a distintos tiempos.

2.7 ENSAYOS DE PULL-DOWN:

Se produjeron las construcciones GST fusionadas con los extremos C-terminal de EWI-2, EWI-F y CD81 y con la proteína Sintenina-1-HA/Myc y se acoplaron a una matriz de glutatión sefarosa (GST sola, EWI-2 C-terminal-GST EWI-F C-terminal-GST, CD81 C-terminal GST ó Sintenina-HA/Myc-GST). En el caso de las regiones citoplasmáticas de CD81, CD9, CD151 y EWI-2, se utilizaron péptidos con la secuencia correspondiente a estas regiones biotinilados (Tabla IX) (30 nmoles para 40 µl de estreptavidina-sefarosa por condición).

Para los ensayos de *pull-down* se utilizaron 1×10^7 de células J77 o HeLa ó 3×10^7 linfoblastos T por condición. Las células se lavaron dos veces con TBS a 4°C y se lisaron en 1% Nonidet P-40 en TBS durante 15 min a 4°C. Los lisados se centrifugaron 5 min a 15.000 rpm y 4°C. Se incubaron los lisados con sefarosa-GST/estreptavidina durante 2 h en rotación a 4°C para retirar interacciones inespecíficas. Este paso se repite de nuevo y por último, el sobrenadante resultante se incubó 16 h a 4°C y en rotación con la sefarosa acoplada a GST sola, EWI-2 C-terminal-GST EWI-F C-terminal-GST, CD81 C-terminal GST, Sintenina-HA/Myc-GST o la sefarosa-estreptavidina acoplada a los péptidos biotinilados.

En los casos en los que los pull-down se realizaron en condiciones de activación, los lisados se preincubaron con el anticuerpo anti-CD3 OKT3 (10µg/ml) en solución.

Tabla IX: Secuencias de los péptidos biotinilados para el estudio de las interacciones de proteínas de membrana con proteínas del citoesqueleto. Obtenidos de Ray Biotech Inc (Norcross, GA).

PROTEÍNA	Secuencia
CD81	biotina-SGSG-CCGIRNSSVY
CD151	biotina-SGSG-YRSLKLEHY
CD9	biotina-SGSG-CCAIRRNREMV
EWI-2	biotina-SGSG-CCFMKRLRKR

Cada péptido biotinilado consta de la biotina más un linker SGSG y la secuencia correspondiente al dominio citoplasmático de cada proteína.

A continuación se realizaron seis lavados, se hirvieron las muestras y a partir de este momento se siguieron los pasos semejantes al protocolo de *Western Blotting*.

2.8 UNIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA *IN VITRO*:

Los dominios N-terminal de Ezrina y Moesina clonados en el plásmido pCR3 se transcribieron y tradujeron *in vitro* usando un sistema de reticulocitos de conejo acoplados a TNT (Promega, Madison, WI), la polimerasa RNA T7 y [³⁵S] metionina. Los dominios citoplásmicos fusionados a GST de EWI-2, CD81, EWI-F, PSGL-1 (y sus formas truncadas R345Stop y 1-11) se incubaron durante 1 hora a 4° con los dominios N-terminales de Moesina y Ezrina en una solución de unión (0.1 M Tris, pH 8, 0.1% SDS, 200 mM NaCl). A continuación las muestras se lavaron utilizando la misma solución un total de seis veces y se resolvieron en un gel de acrilamida al 10% en condiciones reductoras y posteriormente se analizaron por fluorografía y autorradiografía.

2.9 INMUNOPRECIPITACIÓN:

2x10⁷ células CEM, HeLa o J77se lisaron en tampón 1% NP40 TRIS que además contenía 2mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, inhibidores de fosfatasas (1mM Pirofosfato sódico, 1mM ortovanadato sódico, 10mM Fluoruro sódico), e inhibidores de proteasas (Complete; Roche Applied Science). Los lisados se inmunoprecipitaron con distintos

anticuerpos unidos a proteína G sefarosa (1h) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se realizaron 6 lavados utilizando el mismo buffer de lisis diluido 10 veces. Después las muestras se hirvieron en laemmli durante 5 minutos y a partir de este momento se realizó el protocolo de Western blot.

2.10 FRACCIONAMIENTO CELULAR:

Para obtener las fracciones celulares de membrana y citosol se siguieron las instrucciones del kit comercial llamado Proteo Extract Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem), para células en suspensión que se basa en una lisis en Tritón X-114 para separar la fracción hidrofóbica enriquecida en membranas celulares.

2.11 WESTERN BLOTTING:

Los lisados celulares se hirvieron durante 5 min con el tampón de carga Laemmli. El contenido de cada muestra (20-30 µl) se resolvió por electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras o no (los anticuerpos anti-tetraspaninas sólo detectan la proteína en condiciones no reductoras), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Trans-Blot; BioRad), se bloqueó con leche desnatada al 5% en TBS y se inmunodetectaron las proteínas de interés por quimioluminiscencia usando el kit SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, Rockford, IL). Las membranas se revelaron utilizando el LAS3000 luminiscent imager (Fuji Photo Film, Elmsford, NY). Para realizar cuantificaciones de las bandas se utilizó el programa Image Gauge v.346 (Fujifilm).

Como control de carga de las muestras se usaron proteínas del citoesqueleto como vimentina y tubulina.

2.12 ANÁLISIS PROTEÓMICO POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS:

Las proteínas de los ensayos de *pull-down* con péptidos biotinilados se concentraron en un gel SDS-PAGE concentrador y se digirieron con tripsina. Los péptidos resultantes de la digestión se analizaron en el laboratorio del Dr. Jesús Vázquez (CBMSO; Madrid) mediante espectrometría de masas. Las proteínas fueron identificadas usando el programa SEQUEST y comparándolas con la base de datos de proteínas humanas del *Swissprot*. El análisis estadístico y la determinación del ratio de errores en la identificación de péptidos se realizó como se ha descrito previamente (Martinez-Bartolome et al., 2008) y corregidos con el método de cálculo FDR. El número de *scans*

y péptidos obtenidos para cada proteína se correlaciona con la cantidad de proteína asociada al péptido o construcción-GST utilizados. Como controles de especificidad se usaron péptidos biotinilados de otras proteínas (CD147 y CD151) además de Estreptoavidina sefarosa sola.

2.13 POLIMERIZACIÓN DE ACTINA:

Dos métodos distintos se utilizaron para medir la polimerización de actina.

Primero, las células CEM o J77 se estimularon o no con la quimiocina SDF-1 α , se fijaron con formaldehído al 4% durante 5 minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5%. Después mediante tinción con Faloidina-488 (para las células interferidas o sin tratar) ó 647 (para las células transfectadas con construcciones GFP) y posterior lavado se analizó la actina polarizada mediante citometría de flujo en el citofluorímetro FACS CANTO 3 (BD Biosciences).

Por otra parte, el contenido de G-actina/F-actina se midió utilizando un kit comercial de Cytoskeleton (Cytoskeleton, Inc., Denver, CO). Brevemente, las células CEM o J77 se estimularon con la quimiocina SDF-1 α en un buffer estabilizador de F-actina y las fracciones de F y G-actina se obtuvieron mediante ultracentrifugación de los lisados. La fracción de F-actina se despolimerizó con citocalasina-D y las muestras se resolvieron en geles SDS-PAGE, revelándose con anti- α -actina.

2.14 ENSAYOS DE MIGRACIÓN:

Los ensayos de migración se realizaron siempre 24 horas después de la transfección de células CEM con las construcciones GFP o 48h después de la transfección de las células CEM con los distintos RNAi usados en este trabajo. 5×10^5 en 100 μ l se añadieron en la parte superior de los pocillos Transwell inserts (Costar, Cambridge, MA) con poros de 5 μ M de diámetro. La parte inferior contenía 600 μ l de medio completo con quimiocina SDF-1 α (100nM) (R&D, Minneapolis, MN) o MIP3 β (1 μ M) (Peprotech, London, UK). Las cámaras se incubaron 2 horas a 37°C. Posteriormente se cuantificaron las células migradas a la parte inferior de la cámara por citometría de flujo. Cuando las células estaban transfectadas con construcciones GFP se analizaron escogiendo las células verdes. En el caso del estudio de migración a través de una capa de células endoteliales las cámaras superiores se sembraron con células HUVEC sobre FN 20 μ g/ml y se activaron con TNF- α 20 ng/ml durante 20 horas antes del ensayo de

migración. Posteriormente se añadieron las células linfoides como se acaba de describir.

2.15 MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE RAC:

La cantidad de Rac-GTP se midió utilizando un kit de la casa comercial Cytoskeleton llamado G-lisa™ activation assay que se basa en la unión del Rac-GTP de los lisados celulares a un dominio RBD de una proteína efectora de Rac inmovilizado en la placa. Para la realización se siguieron las instrucciones de la propia casa comercial (ver página web:<http://www.cytoskeleton.com/products/biochem/bk125.html>)

2.16 ANÁLISIS DE CITOQUINAS:

Para el análisis de citoquinas células J77 o PBLs se conjugaron con RAJI cargadas con SEE (1µg/ml) o con los anticuerpos específicos y se dejaron en placas toda la noche a 37°C. Después, se centrifugaron las placas y se realizaron ELISAS con los sobrenadantes celulares.

En el caso del ensayo Citomix se utilizó el kit humano básico BMS8420FF (Bender MedSystems) con PBLs estimulados con anticuerpos específicos o adheridos a placa y tras seguir el protocolo, las muestras se analizaron en el citofluorímetro (Becton Dickinson).

2.17 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS:

Para determinar si existen o no diferencias significativas en los experimentos realizados, en los que el tamaño muestral es pequeño, se conoce la media muestral y se desconoce la desviación típica, se realizó un análisis estadístico mediante la prueba t Student. El valor de significación estadística fue en unos casos $p < 0.001$ y en otros casos $p < 0.05$.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 3.1 Estudio de la posible asociación de las proteínas EWI y las tetraspaninas con las moléculas adaptadoras ERM.
- 3.2 Papel de EWI-2 en la polarización, migración linfocitaria y formación de la Sinapsis Inmune
- 3.3 Caracterización de otras asociaciones entre tetraspaninas y EWI-2 con el citoesqueleto celular:
 - 3.3.1 Estudio de Filamina-A y α -actinina en la Sinapsis inmune
 - 3.3.2 Estudio del papel de la proteína Sintenina-1 en la migración linfocitaria.

RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1) ESTUDIO DE LA POSIBLE ASOCIACIÓN ENTRE LAS PROTEÍNAS EWI Y LAS TETRASPANINAS CON LAS MOLÉCULAS ADAPTADORAS ERM.

4.1.1 EWI-2 y EWI-F SE LOCALIZAN EN ESTRUCTURAS CELULARES ENRIQUECIDAS EN ERMs

En primer lugar se analizó el patrón de expresión de EWI-2 y EWI-F por citometría de flujo en células linfoides, dendríticas derivadas de monocitos y algunas células adherentes. Se utilizaron anticuerpos monoclonales en todos los casos. Los resultados de la **figura 14** determinan que EWI-2 se expresa en líneas linfoblásticas T (HSB-2, CEM y J77) y B (RAJI), en células dendríticas, donde se incrementa su expresión cuando se induce la maduración mediante la utilización de LPS, y en linfocitos primarios (PBLs) y linfoblastos derivados de los mismos. En el caso de los PBLs no se observa un incremento de la expresión de EWI-2 tras la estimulación con la quimiocina SDF-1 α . Por otro lado, EWI-F se expresa principalmente en células adherentes, tales como HeLa y HUVEC, observándose muy poca o nula expresión en las células de origen hematopoiético.

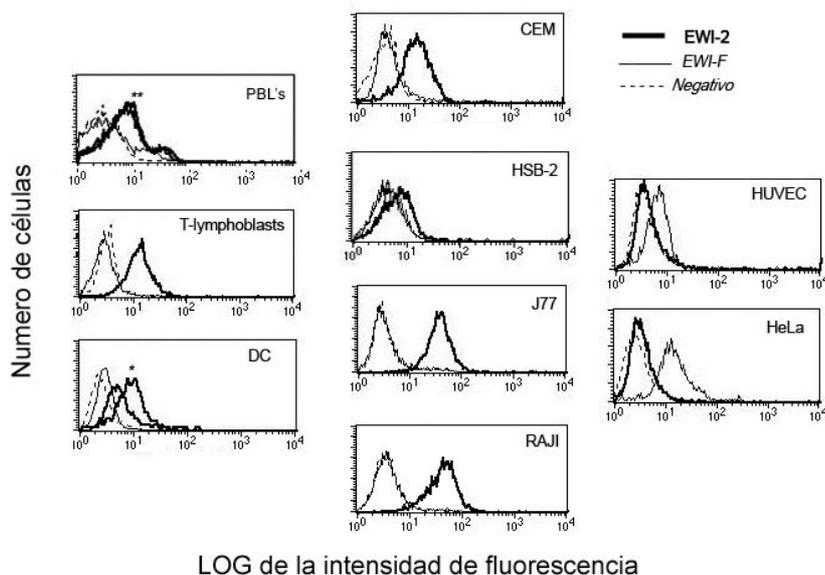


Figura 14: Expresión de las proteínas EWI-2 y EWI-F en distintos tipos celulares: Análisis mediante citometría de flujo en distintas líneas linfoblásticas T (CEM, HSB-2, J77), B (RAJI), células dendríticas, PBLs, linfoblastos y células adherentes (HeLa, HUVEC) utilizando los anticuerpos monoclonales anti-EWI-2 (8A12, línea gruesa) y anti-EWI-F (IF11, línea fina). En línea discontinua se presenta el control negativo X63. El asterisco marca las células dendríticas maduras con LPS (10ng/ml, 24h). Los dos asteriscos determinan a los PBLs estimulados con la quimiocina SDF-1 α (100nM, 10 min).

Posteriormente se estudió la localización subcelular de las proteínas EWI mediante técnicas de microscopía de fluorescencia indirecta y confocal. En las líneas linfoblásticas T constitutivamente polarizadas CEM y HSB-2 así como en linfocitos primarios estimulados con la quimiocina SDF-1 α , EWI-2 se observaba acumulado en el urópodo celular (**Figura 15A**), con la misma frecuencia que la proteína asociada a ERM y marcador de urópodo como es ICAM-3 (Figura 15B y C). Como control negativo se utilizó CD147, que no se relocaliza al urópodo. EWI-F, por otro lado, se observó en los contactos intercelulares de las células endoteliales primarias HUVEC y en los microvilli apicales y microespículas de las células HeLa (**Figura 15A**).

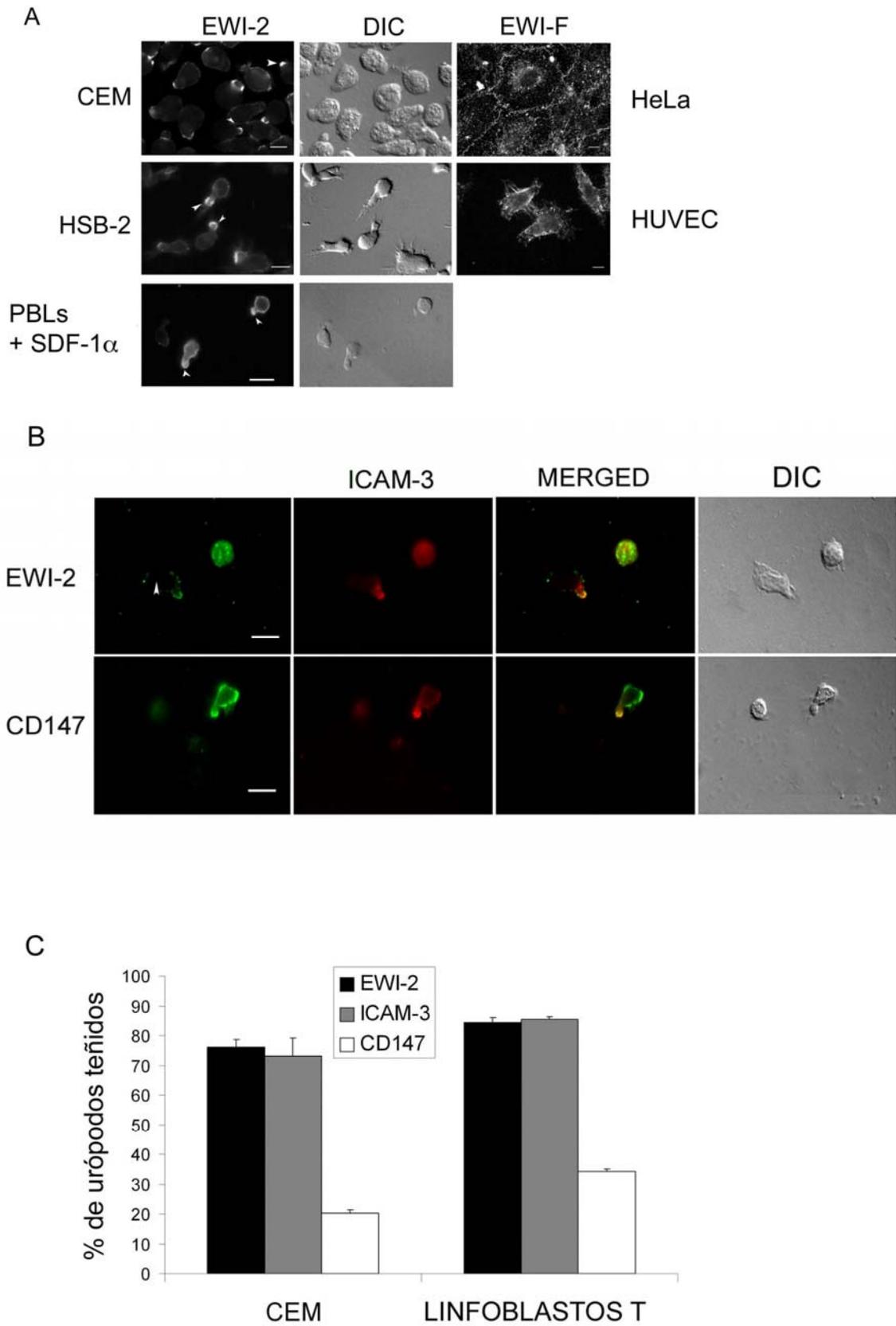


Figura 15: Localización subcelular de las proteínas EWI-2 y EWI-F: A) Las células constitutivamente polarizadas CEM y HSB-2, los linfocitos primarios estimulados con la quimiocina SDF1- α (100nM, 10 min), y las células adherentes HUVEC y HELA se tiñeron con los anticuerpos

primarios anti-EWI-2 (8A12) y anti-EWI-F (IF11) y se observaron al microscopio de fluorescencia. Se presentan también las imágenes correspondientes al visible. Las flechas señalan los urópodos celulares de los linfocitos polarizados. Barras=10µm. **B)** PBLs estimulados con la quimiocina SDF-1α (100nM, 10 min) se adhirieron a FN (50 µg/ml) y se fijaron con formaldehído al 4%. A continuación se tiñeron con los anticuerpos anti-EWI-2 (8A12) y anti-CD147 (VJ1/9) en combinación con anti-ICAM-3 (TP1/25) biotinilado. Se muestran las imágenes de la superposición de los canales de fluorescencia y el visible. Las flechas señalan los urópodos celulares. **C)** Cuantificación del porcentaje de células CEM y linfoblastos T polarizados que presentan a las proteínas EWI-2, CD147 e ICAM-3 en el urópodo celular. Los datos representan la media +/- la SD de 10 campos observados con el objetivo 63x en 3 experimentos independientes.

Las ERMs se localizan preferentemente en el urópodo de los linfocitos polarizados y en los contactos célula-célula y microvilli apicales de células adherentes (Louvet-Vallee, 2000; Sanchez-Madrid and del Pozo, 1999; Tsukita and Yonemura, 1999). Por tanto, la posible colocalización de las proteínas EWI con las ERMs se analizó mediante microscopía confocal. Como se observa en la **figura 16A**, en células CEM EWI-2 colocaliza con ERMs en los urópodos celulares. En células HeLa EWI-F colocaliza con ERMs en la superficie apical.

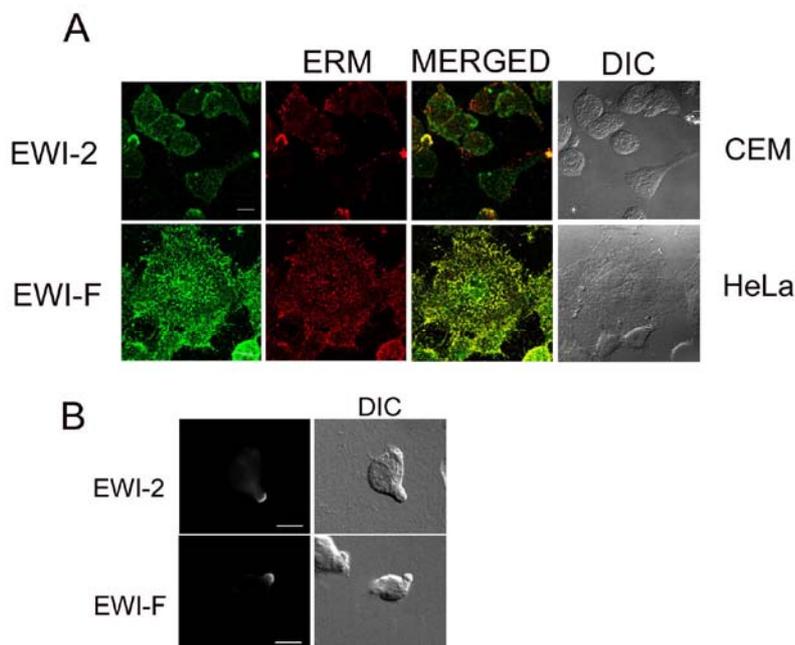


Figura 16: Las proteínas EWI colocalizan con las ERMs: **A)** Las muestras de células CEM y células HeLa se fijaron, permeabilizaron e incubaron con los anticuerpos monoclonales que reconocen a las proteínas EWI (en verde) y posteriormente con el anticuerpo policlonal 90:3 que reconoce a las ERMs (rojo). Las células se observaron al microscopio confocal. También se muestran las correspondientes imágenes de DIC. Las flechas señalan los urópodos de las células CEM. Barras=10µm. **B) Las proteínas EWI-2 y EWI-F transfectadas en células NS1 de ratón se localizan en el urópodo celular:** Se

transfectaron en células NS1 de ratón constitutivamente polarizadas los ADNc que codifican para las proteínas EWI-2 y EWI-F y posteriormente se realizó la correspondiente adhesión a FN (20µg/ml), fijación y tinción, observándose que ambas proteínas se localizan en el urópodo de estas células. También se muestran las correspondientes imágenes de DIC. Barras=10 µm.

Las células NS1 son una línea de mieloma de ratón que está constitutivamente polarizada. Las proteínas de la membrana plasmática asociadas a ERM que se introducen de manera exógena en estas células se redistribuyen al urópodo celular (Serrador et al., 2002b). Se transfectaron por tanto los ADNc que codifican para las proteínas EWI-2 y EWI-F mediante electroporación en células NS1 y ambas moléculas se relocalizaron al urópodo celular (**Figura 16B**).

4.1.2 EWI-2 y EWI-F SE ASOCIAN *IN VIVO* E *IN VITRO* CON LAS PROTEINAS ERM

Para determinar si las proteínas ERM interactúan *in vivo* con EWI-2 y EWI-F se realizaron ensayos de inmunoprecipitación. Para ello, células HeLa, HSB-2 y CEM se lisaron en tampón de lisis conteniendo 1% de Nonidet-P-40 y se inmunoprecipitaron con los anticuerpos EWI-2 (en células HSB-2 y CEM), EWI-F (en células HeLa), CD44, ICAM-1 (ambos controles positivos de interacción con ERMs) y CD59 (proteína unida a la membrana mediante GPI, utilizada como control negativo) o CD45 (también control negativo).

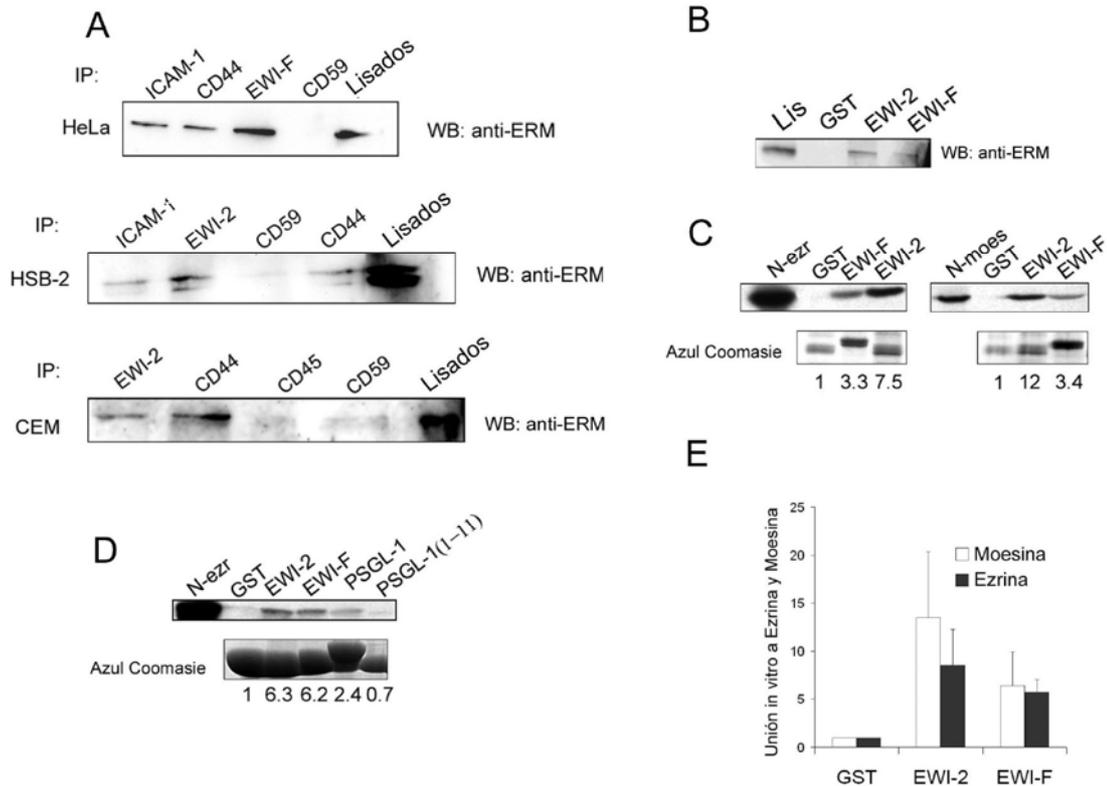


Figura 17: EWI-2 y EWI-F se asocian *in vivo* e *in vitro* a las proteínas ERM: **A)** Células HSB-2, CEM y HeLa se lisaron en tampón de lisis TBS conteniendo Nonidet P-40 1% e inhibidores de fosfatasas y proteasas y se inmunoprecipitaron con los anticuerpos anti-CD44 (HP2/9), anti-ICAM-1 (Hu5/3), anti-CD45 (D3/9), anti-CD59 (VJ1/12), anti-EWI-2 (8A12) y anti-EWI-F (IF11). Las muestras se resolvieron en un gel de acrilamida y se revelaron con el anticuerpo policlonal anti-ERM (90:3). **B)** **EWI-2 y EWI-F se asocian directamente a los dominios N-terminal de Ezrina y Moesina.** Células lisadas HeLa se precipitaron con GST o GST fusionada a los dominios C-terminal de las proteínas EWI-2 y EWI-F. Las muestras se resolvieron por electroforesis en condiciones reductoras, se transfirieron y se revelaron con el anticuerpo policlonal anti-ERMs (90:3). **C)** Se realizaron ensayos de unión proteína-proteína en los que se tradujeron *in vitro* los dominios N-terminal de ezrina y moesina marcados radiactivamente con [³⁵S]Met y se incubaron con las proteínas de fusión GST acopladas a los dominios citosólicos de las proteínas EWI. Las muestras se resolvieron después en un gel del 10% en condiciones reductoras y se analizaron por autorradiografía. Se presenta además la carga de GST utilizada en los ensayos por tinción con Coomasie. Los números representan la unión relativa de las proteínas respecto a GST, corregida con la cantidad de GST utilizada. **D)** Se tradujeron *in vitro* N-ezrina y N-moesina y se incubaron con proteínas de fusión GST y GSTs acopladas a los dominios C-terminal de EWI-2, EWI-F, el dominio citoplásmico salvaje de PSGL-1 y una construcción que sólo presenta los once primeros aminoácidos de dicha región y que actúa como control negativo R345Stop (1-11). Se presenta además la carga de GST por tinción con Coomasie. Los números representan la unión relativa de las proteínas respecto a GST, corregida con la carga de GST en cada carril. **E)** Cuantificación de la unión *in vitro* de los dominios

citoplásmicos de las proteínas EWI con los dominios N-terminal de Ezrina y Moesina. Los resultados representan la media +/- la SD de 4 experimentos independientes.

Tal y como se observa en la **Figura 17A**, las proteínas EWI-F y EWI-2 se asocian con las proteínas ERM, al igual que los controles positivos ICAM-1 y CD44 observándose una banda de 70kD cuando los geles se revelan con un anticuerpo policlonal que reconoce a las proteínas ERM. Esta banda no se observa cuando los lisados celulares se inmunoprecipitan con los controles negativos.

Para determinar si la interacción era directa se generaron proteínas de fusión con GST acopladas a los dominios citoplásmicos de las proteínas EWI-2 y EWI-F. Estas construcciones se enfrentaron a lisados de células HeLa y se resolvieron por SDS-PAGE y posterior *Western Blotting*. Mediante este abordaje se observó que dichos dominios interaccionaban con las proteínas ERM en oposición a los lisados enfrentados a la proteína GST sola (**Figura 17B**). Además, se tradujeron *in vitro* los dominios N-terminal de Ezrina y Moesina, en presencia de [³⁵S]Met mediante un sistema de reticulocitos de conejo. Dichos dominios marcados se enfrentaron a las GST fusionadas con los dominios citoplásmicos de EWI-2 y EWI-F. Como se observa en la **figura 17C** se confirma que la asociación entre las proteínas EWI y las ERMs es directa puesto que ambos dominios C-terminal de EWI-2 y EWI-F se asocian directamente con los dominios N-terminal de ambas proteínas ERM: Ezrina y Moesina. La cuantificación de los experimentos realizados se puede observar en **Figura 17E**. Por último, se realizó una nueva batería de ensayos en los que se incluyeron dos nuevos controles. Como control positivo se utilizó el dominio C-terminal de la proteína PSGL-1, cuya interacción directa con ERMs ha sido descrita y como control negativo una versión truncada de dicho dominio citoplásmico que solo posee los 11 primeros aminoácidos (mutante denominado R345 Stop o 1-11) (Serrador et al., 2002a). Como se observa en la **figura 17D**, el dominio N-terminal de Ezrina traducido *in vitro* interaccionó con los dominios C-terminal de las proteínas EWI-2, EWI-F y PSGL-1 wt acoplados a GST y no con la proteína GST sola o el truncado de PSGL-1 1-11.

4.1.3 LAS PROTEÍNAS ERM SON NECESARIAS PARA LA CORRECTA LOCALIZACIÓN DE EWI-2 EN EL URÓPODO CELULAR

Para estudiar el papel de las proteínas adaptadoras ERM en la localización subcelular de las proteínas EWI, se cotransfectaron los ADNc de las proteínas EWI con Moesina fusionada a GFP o un mutante de la moesina que solo presenta su dominio N-terminal, de manera que sólo puede unirse a membrana y carece del dominio de unión a actina, que se encuentra en el extremo C-terminal . Esta construcción al no ser capaz de unirse al citoesqueleto de actina se distribuye uniformemente por la membrana plásmatica, actuando como dominante negativo (Amieva et al., 1999; Serrador et al., 2002a).

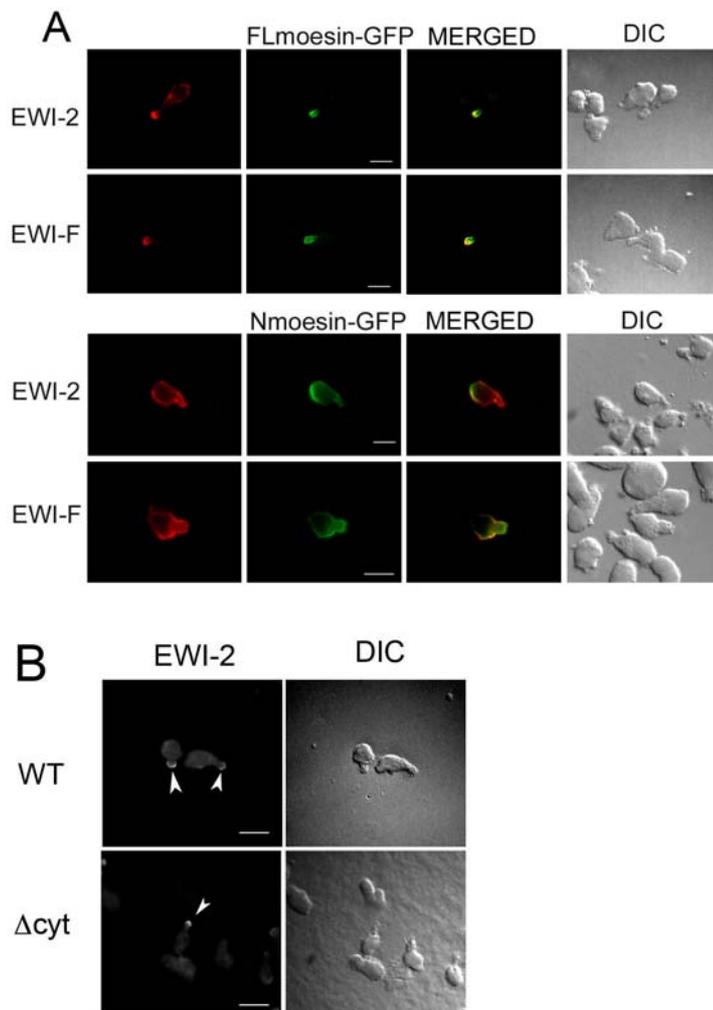


Figura 18: A) Las ERM son necesarias para la localización de EWI-2 en el urópodo celular. El dominante negativo de las ERM, N-Moesina-GFP deslocaliza a EWI-2 del urópodo celular. Las células HSB-2 fueron cotransfectadas con los ADNc de las proteínas EWI y dos construcciones GFP fusionadas

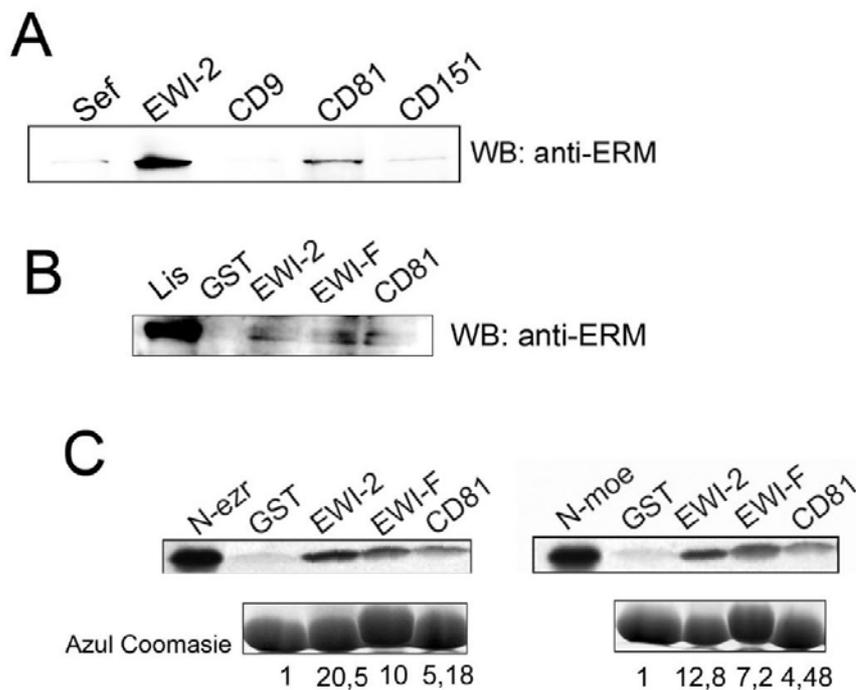
con moesina, una con la proteína salvaje y otra únicamente con el dominio N-terminal, que actúa como dominante negativo. Las células después se adherieron a FN (20µg/ml), fijaron e incubaron con los anticuerpos anti-EWI-2 (8A12) y anti-EWI-F (IF11). En la figura se muestra, en rojo, a las proteínas EWI, en verde, las GFP acopladas a las construcciones de moesina. También se representan las imágenes correspondientes de DIC y las imágenes de superposición de los dos canales de fluorescencia. Barras=10µm. **B) El mutante de EWI-2 carente del dominio citoplasmático se localiza igualmente en el urópodo celular.** El dominio citoplásmico de EWI-2 no es estrictamente necesario para la localización de la proteína en el urópodo celular. Las células NS1 se transfectaron con la proteína salvaje y con una construcción de la proteína EWI-2 sin el dominio citoplásmico y acoplada al epítipo FLAG. Las células se adherieron a FN (20µg/ml), se fijaron e incubaron con un anticuerpo anti-FLAG (M2). Se presentan también las imágenes del visible. Las flechas marcan los urópodos de las células NS1. Barras=10µm.

Tanto las proteínas EWI como la construcción nativa de moesina fusionada a GFP al ser transfectadas en células NS1 se localizaban en el urópodo celular (**Figura 18**). Sin embargo cuando las proteínas EWI se cotransfectaban con el mutante N-Moesina se observó que las proteínas EWI no eran capaces de localizarse en el urópodo y, al igual que la N-Moesina-GFP, se localizaban por toda la membrana plásmica. De esta manera, se confirmó el papel de las ERMs en la localización de las proteínas EWI en el urópodo celular.

4.1.4 LA TETRASPANINA CD81 SE ASOCIA DIRECTAMENTE A LAS PROTEÍNAS ERM

Para investigar si la localización de EWI-2 en el urópodo celular se debe únicamente a su asociación con las proteínas adaptadoras ERM, se transfectó una construcción truncada de EWI-2 sin el dominio citoplásmico acoplada al epítipo FLAG. Esta versión truncada de la proteína EWI-2 también se localizaba en el urópodo celular sugiriendo que otras proteínas que interactúan con ERMs y que además se asocian lateralmente a EWI-2 podrían estar también implicadas en la correcta localización de dicha proteína en el urópodo celular (**Figura 18B**). Las tetraspaninas, algunas de las cuales se asocian directamente a las proteínas EWI, parecen ser buenas candidatas para este posible mecanismo indirecto. Así pues, el mismo abordaje realizado para el estudio de las proteínas EWI y su interacción con las ERMs se realizó de nuevo para estudiar si también las tetraspaninas se asociaban directamente a las proteínas adaptadoras. Realizamos experimentos de *pull-down* con lisados de células Hela, que se enfrentaron

a péptidos biotinilados que contenían la secuencia de los dominios citoplásmicos C-terminal de CD9, CD81, CD151 y EWI-2. Como se muestra en la **figura 19A**, el dominio citoplásmico C-terminal de CD81, pero no los de las tetraspaninas CD9 y CD151, se asocia a ERMs. Posteriormente se generó una construcción GST fusionada al dominio C-terminal citoplásmico de CD81 y se confirmó mediante ensayos de *pull-down* y unión proteína-proteína que dicha asociación era directa (**Figura 19B y C**). A su vez, los experimentos de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos frente a la tetraspanina CD81 demostraron la asociación *in vivo* de CD81 y ERMs. Además se observó coimmunoprecipitación de CD9 con ERMs sugiriendo también una asociación indirecta (**Figura 19D**). Por último CD81 y CD9 colocalizaban con las proteínas ERM en los urópodos de células CEM y PBLs estimulados con quimiocinas y cuando los ADNc de estas proteínas se transfectaron en células NS1, las tetraspaninas exógenas se redistribuyeron al urópodo celular (**Figura 19E y F**).



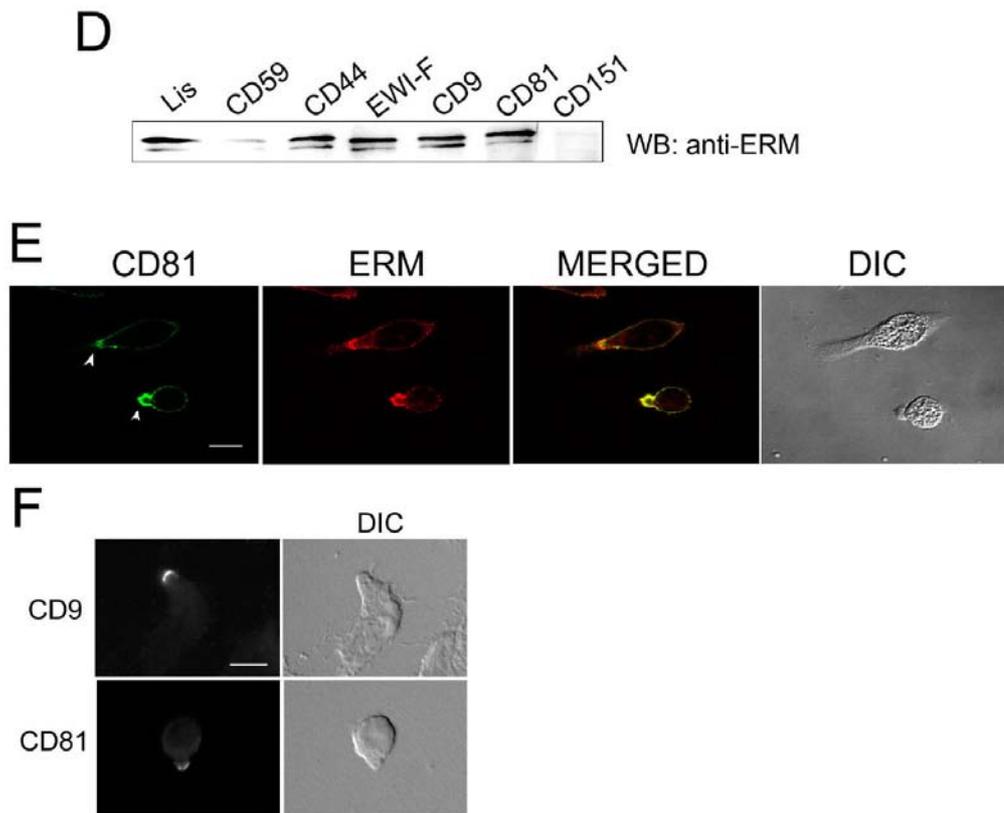


Figura 19: La tetraspanina CD81 se asocia directamente a ERMs: **A)** Las células HeLa lisadas en tampón de lisis con 1%NP-40 se precipitaron con péptidos biotinilados que contenían las secuencias de los dominios C-terminal de las tetraspaninas CD81, CD9, CD151 y el dominio C-terminal de EWI-2. Las muestras se resolvieron por electroforesis en condiciones reductoras y tras la transferencia, las membranas se incubaron con el anticuerpo policlonal 90:3 que reconoce a las proteínas ERM. **B)** Las células HeLa lisadas con tampón de lisis conteniendo 1% de NP40 se incubaron con los dominios C-terminal de las proteínas EWI-F y EWI-2 y el dominio C-terminal de la tetraspanina CD81 acoplados a la proteína de fusión GST. Las muestras se resolvieron por electroforesis en condiciones reductoras y se revelaron con el anticuerpo policlonal anti-ERM (90:3). **C)** Ensayo *in vitro* de unión proteína-proteína entre los dominios N-terminal de Ezrina y Moesina marcados radiactivamente con $[S^{35}]Met$ y los dominios C-terminales de las proteínas EWI y CD81. Las muestras se resolvieron por electroforesis en condiciones reductoras y se revelaron mediante autorradiografía. Se muestra la tinción por Coomassie para ver la carga de GST utilizada. Los números representan la cantidad de unión relativa respecto a GST, corregida con la carga de GST. **D)** Las células HUVEC se lisaron en tampón de lisis con NP40 al 1% y los lisados se inmunoprecipitaron con los anticuerpos anti-EWI-F (IF11), anti-CD59 (VJ1/12), anti-CD44 (HP2/9), anti-CD81 (I.33.22), anti-CD9 (VJ1/29) y anti-CD151 (Lia1/1). Los inmunoprecipitados se resolvieron por electroforesis en condiciones reductoras, el gel del 10% se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y dicha membrana se reveló para ERMs, incubándola con el anticuerpo policlonal 90:3. **E)** Las células CEM se adhirieron a FN (20 μ g/ml), se fijaron con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% y se tiñeron con los anticuerpos anti-CD81 (I.33.22) y anti-ERMs (90:3). Posteriormente, las muestras se analizaron en un microscopio confocal. En verde, la

tetraspanina. En rojo, las ERM5. Se presentan también las imágenes de la superposición de los canales de fluorescencia y el visible. Las flechas marcan los urópodos celulares. Barras=10µm. **F)** Los ADNc de las tetraspaninas CD9 y CD81 humanos se transfectaron en células de ratón NS1 que después se adherieron a FN (20µg/ml), se fijaron y tiñeron con los anticuerpos específicos frente a ambas tetraspaninas (anti-CD81, I.33.22 y anti-CD9, VJ1/20). Se incluyen las imágenes del visible. Barras=10µm.

4.2) PAPEL DE EWI-2 EN LA POLARIZACIÓN, MIGRACIÓN LINFOCITARIA Y FORMACIÓN DE LA SINAPSIS INMUNE

4.2.1 EWI-2 ESTÁ IMPLICADO EN LA FOSFORILACIÓN DE ERM5 REGULANDO NEGATIVAMENTE LA MIGRACIÓN LINFOCITARIA

La expresión exógena de EWI-2 en células metastáticas de cáncer de próstata Du145 inhibe su migración sobre fibronectina y laminina (Zhang et al., 2003). Sin embargo, el papel de la proteína EWI-2 endógena en funciones que son dependientes de ERM5 no ha sido investigado. Para ello se interfirió la expresión de EWI-2 con dos oligos distintos de ARNi en células CEM. Se obtuvo una disminución de la expresión en el rango de 60-80% (**Figura 20A**). Se controló que en dicho proceso no se afectara la expresión de otras proteínas que se asocian directa o indirectamente a EWI-2, como las tetraspaninas CD81, CD151, las integrinas β 1, otras proteínas que se unen a ERM5 como ICAM-3, CD43 y CD44 y por último, integrinas β 2 (**Figura 20B y resultados no mostrados**).

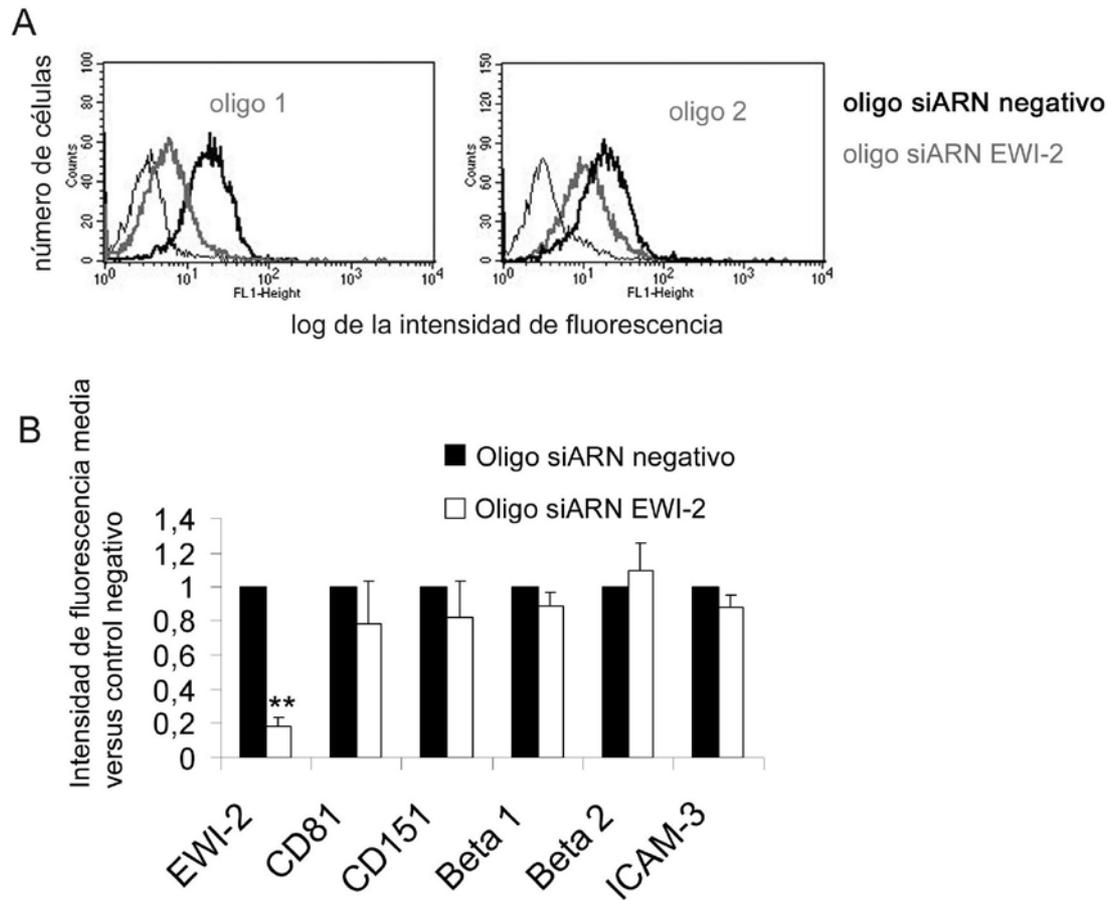


Figura 20: El silenciamiento de EWI-2 no afecta a la expresión de las tetraspaninas, integrinas y otras proteínas que se unen a las ERMs : **A)** Análisis por citometría de flujo de la expresión de EWI-2 en células CEM transfectadas con un control negativo de interferencia (línea negra) o con dos oligos distintos de interferencia específico frente a EWI-2 (línea gris). El control negativo se representa en línea fina. **B)** Análisis cuantitativo de la expresión de EWI-2 (8A12), CD81 (I.33.22), CD151 (Lia1/1), integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ (TS2/16 y Lia 3/2) e ICAM-3 (TP1/25) en células CEM transfectadas con el oligo 1 de interferencia de EWI-2 *versus* células CEM transfectadas con un oligo negativo. Los datos se representan como la media \pm la SD de 5 experimentos independientes. (**, $p < 0.001$ en un análisis t Student).

Con las células interferidas se realizaron experimentos de migración en transwell y se observó que las células con menos expresión de la proteína EWI-2 migraban más que las células transfectadas con un oligonucleótido control (**Figura 21A y B**). El mismo resultado se obtuvo cuando la migración no era aleatoria sino que las células migraban hacia la quimiocina SDF-1 α o en ensayos de migración transendotelial (datos no mostrados).

Este efecto funcional en migración nos llevó a analizar la polaridad de las células cuando la expresión de la proteína EWI-2 se disminuía mediante ARNi. Tal y como se

observa en la **figura 21C**, las células interferidas estaban mucho más polarizadas (en cuanto al número de células que presentaban urópodos en su morfología).

Se ha descrito que la fosforilación de ERMs tiene un papel importante en la formación de los urópodos celulares en linfocitos T (Lee et al., 2004). Por tanto, se estudió si las células interferidas para EW1-2 presentaban alguna diferencia en el estado de fosforilación de las ERMs. Para ello, lisados de células CEM previamente transfectadas con oligonucleótidos control, o de interferencia de EW1-2, se resolvieron por electroforesis y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se reveló con un anticuerpo que detecta las ERM fosforiladas y posteriormente con otro que reconoce la cantidad total de ERMs. Como se observa en la **figura 21D**, las células interferidas presentaban una mayor cantidad de ERMs fosforiladas. Este resultado apunta a que la interacción entre las proteínas EW1 y las ERMs regula la polaridad y motilidad celular.

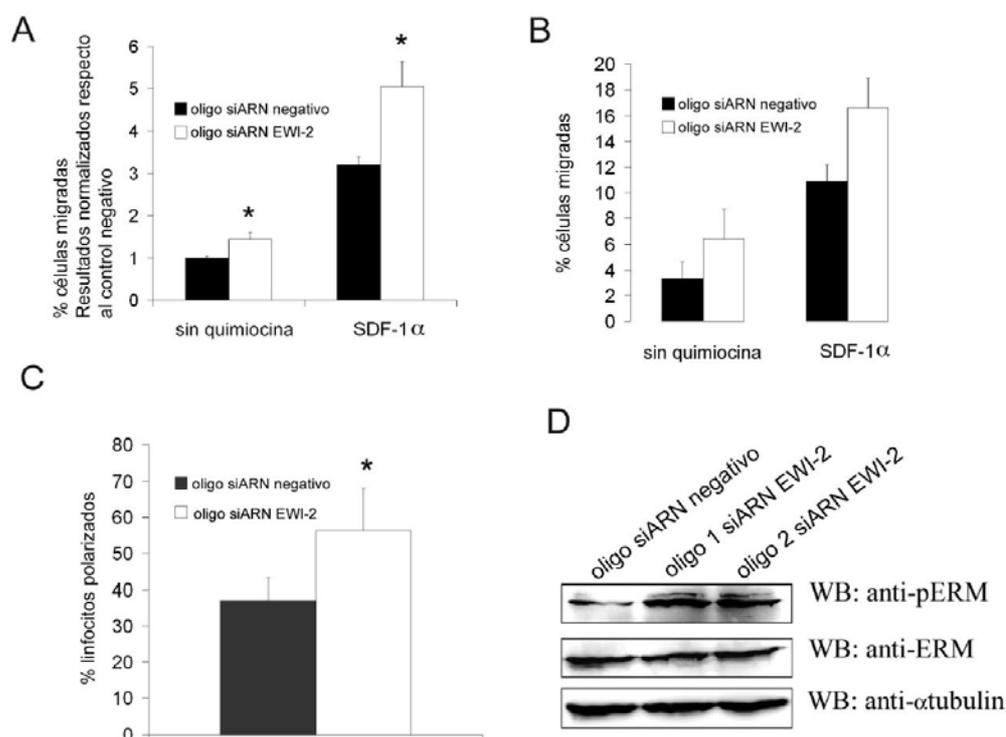


Figura 21: El silenciamiento de EW1-2 aumenta la migración y la polaridad celular, así como la fosforilación de las proteínas ERM en células CEM. **A)** Se realizaron ensayos de migración aleatoria y hacia la quimiocina SDF-1α con células CEM transfectadas con un oligo control y el oligo 1 frente a EW1-2. La gráfica representa la media +/- la SD de 5 experimentos independientes (*, $p < 0.001$ en un análisis t Student) **B)** Ensayo de migración aleatoria y de quimiotaxis con SDF-1α de células CEM transfectadas con un oligo control y el oligo 2 frente a EW1-2. La gráfica representa la media +/- la SD de 1 experimento representativo. **C)** Células CEM transfectadas con un oligo control o con el oligo 1 frente a EW1-2 se adhirieron a FN (20μg/ml), se fijaron con paraformaldehído al 4% y se observó su morfología al microscopio de fluorescencia, realizándose contajes del número de urópodos en 10 campos vistos con

un objetivo 63x en 3 experimentos independientes. Los resultados se reflejan con la media +/- la SD. (*, $p < 0.002$ en un análisis de t Student). **D)** Células CEM transfectadas con un oligo control y con el oligo 1 frente a EWI-2 se lisaron en tampón de lisis con NP40 al 1%. Los lisados se resolvieron en un gel de electroforesis que fue transferido a una membrana de nitrocelulosa, revelada posteriormente distintos anticuerpos: anti-fosfo-ERMs, ERMs totales y anti-tubulina como control de carga.

4.2.2 EWI 2 COLOCALIZA CON CD81 EN EL ANILLO CENTRAL DE LA SINAPSIS INMUNE.

Una vez descrito el papel regulador negativo de EWI-2 en la migración, el siguiente paso fue explorar el papel de este receptor en el proceso de activación de células T por antígeno. Para ello, lo primero que se hizo fue estudiar, mediante microscopía confocal, su localización en conjugados de células T con distintas células presentadoras de antígeno (CPA) como las células Raji (linfoblastos B) y las células dendríticas. En la **figura 22** se puede apreciar como en ambos tipos de conjugados EWI-2 se relocaliza a la zona de contacto. Además, cuando se realizaron estudios de colocalización con marcadores tanto de cSMAC (como CD3 ó CD81) como de pSMAC (LFA-1) se comprobó que EWI-2 se agrupa en el cSMAC de la sinapsis, colocalizando con CD3 y CD81 (**Figura 22**).

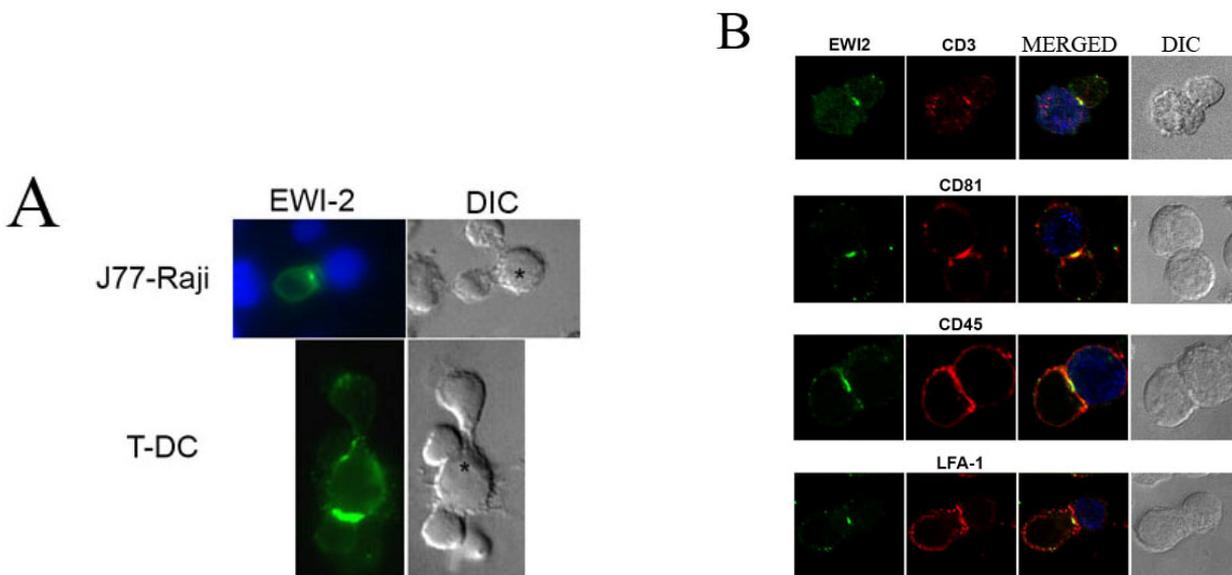


Figura 22: EWI-2 colocaliza con CD81 en el cSMAC de la Sinapsis Inmune. **A)** La línea de linfoblastos T J77 se conjugó con células CPA Raji (linfoblastos B), preincubadas con SEE (1 μ g/ml) y marcadas con la sonda CMAC. Los conjugados se adhirieron a PLL (50 μ g/ml), se fijaron con formaldehído al 4% y se tiñeron con el anticuerpo monoclonal anti-EWI-2 (8A12). Las células dendríticas cargadas con SEB (1 μ g/ml) se conjugaron con células T S3, se adhirieron a FN (20 μ g/ml),

fijaron con PFA al 4% y tiñeron con el anticuerpo anti-EWI-2 (8A12). Se presentan también las imágenes correspondientes de DIC. La CPA se marca en azul en los conjugados J77-Raji y con un asterisco en los conjugados T-DC. El asterisco se refiere igualmente a la CPA. **B)** Las células T J77 y células B RAJI cargadas con SEE (1µg/ml) y con la sonda CMAC se conjugaron, adhirieron, fijaron e incubaron con los siguientes anticuerpos: anti-CD3 (488 Ab), anti-CD81 (I.33.22), anti-LFA-1 (Lia3/2), anti-CD45 (D3/9) y anti-EWI-2 (8A12). Se presentan también las imágenes correspondientes a la superposición de ambos canales de fluorescencia así como el visible. En azul, la CPA.

4.2.3 EWI-2 ACTÚA COMO MOLÉCULA COESTIMULADORA

EWI-2 es capaz de actuar como receptor de la proteína HspA8 en células dendríticas (Kettner et al., 2007). Por su parte, la liberación de las proteínas Hsp en condiciones de estrés o necrosis provoca una señal de peligro que da lugar a una activación del sistema inmune (Calderwood et al., 2007). Basándonos en estos datos preliminares se estudió el efecto del entrecruzamiento de EWI-2 en linfocitos T. Para ello, linfocitos de sangre periférica (PBLs) se trataron con los anticuerpos anti-CD3 (OKT3 10µg/ml) y una combinación de anti-CD3 con otros anticuerpos, algunos de los cuales se sabe que provocan señales de coestimulación, como anti-CD28 (20µg/ml). El resto de anticuerpos utilizados fueron: anti-CD81 (5A6, 20µg/ml), anti-ICAM-1 (RR1, 20µg/ml) y el anticuerpo anti-EWI-2 (8A12). Después de 17 horas de incubación se analizó la generación, por parte de los linfocitos T, de varias citoquinas. En estos ensayos, el anticuerpo anti-EWI-2 resultó ser una potente señal coestimuladora que daba lugar a un patrón de expresión de citoquinas muy diferente al provocado por el anticuerpo anti-CD28. En concreto, los PBLs incubados con el anticuerpo anti-EWI-2 8A12 secretaron cantidades elevadas de IL-6 y mayor cantidad de IFN- γ , IL-8 y TNF- α que las células tratadas con anti-CD28. Por el contrario, los niveles de IL-10 e IL-2 fueron menores en el caso de estimulación con el anticuerpo purificado monoclonal anti-EWI-2. Sin embargo, los anticuerpos anti-CD81 e anti-ICAM-1 no produjeron una señal coestimuladora significativa cuando se combinaron con el anticuerpo anti-CD3 en solución (**Figura 23**).

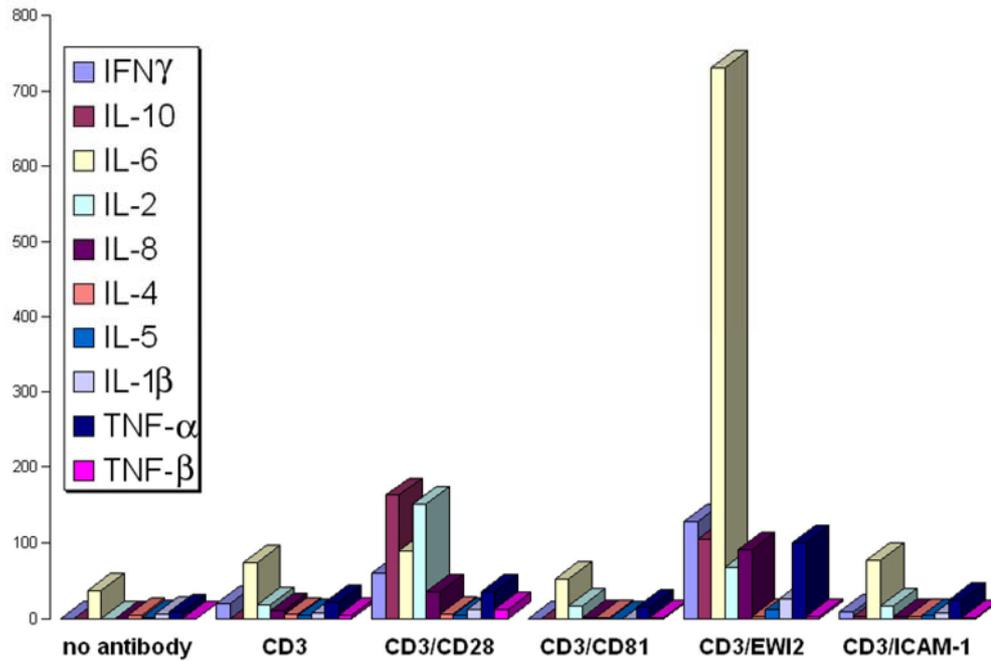


Figura 23: EWI-2 actúa como molécula coestimuladora: Los linfocitos de sangre periférica obtenidos de dos donantes distintos se trataron durante 24h con el anticuerpo anti-CD3 (OKT3, 10 μ g/ml) sólo o en combinación con los siguientes anticuerpos: anti-CD28 (CD28.2, 20 μ g/ml), anti-CD81 (5A6, 20 μ g/ml), anti-EWI-2 (8A12, 20 μ g/ml) y anti-ICAM-1 (RR/1, 20 μ g/ml). Se recogieron los sobrenadantes después de 24 horas y se midió, mediante un ensayo de Citomix, la concentración de las citoquinas que aparecen en la gráfica.

Para analizar en profundidad el papel de EWI-2 en la activación de los linfocitos T se realizaron dos tipos de transfecciones en la línea celular J77:

- Transfecciones de las construcciones GFP (control) o GFP fusionada a la proteína nativa EWI-2
- Transfecciones de los oligos de interferencia negativo (control) o específico para reducir la expresión de la proteína EWI-2

Se midió la secreción de IL-2 en los dos tipos de J77 transfectadas y posteriormente incubadas con células RAJI cargadas con SEE (1 μ g/ml). En paralelo, se modularon los niveles de expresión de la tetraspanina asociada a EWI-2, CD81. La sobreexpresión de EWI-2 no afectó a la secreción de IL-2 mientras que la disminución de su expresión por oligos de interferencia incrementó su contenido en los sobrenadantes obtenidos del cocultivo de células T-B. Por el contrario, el silenciamiento de la tetraspanina CD81 no

tuvo un efecto en estos ensayos, aunque su sobreexpresión si redujo la cantidad de IL-2 detectada (**Figura 24**).

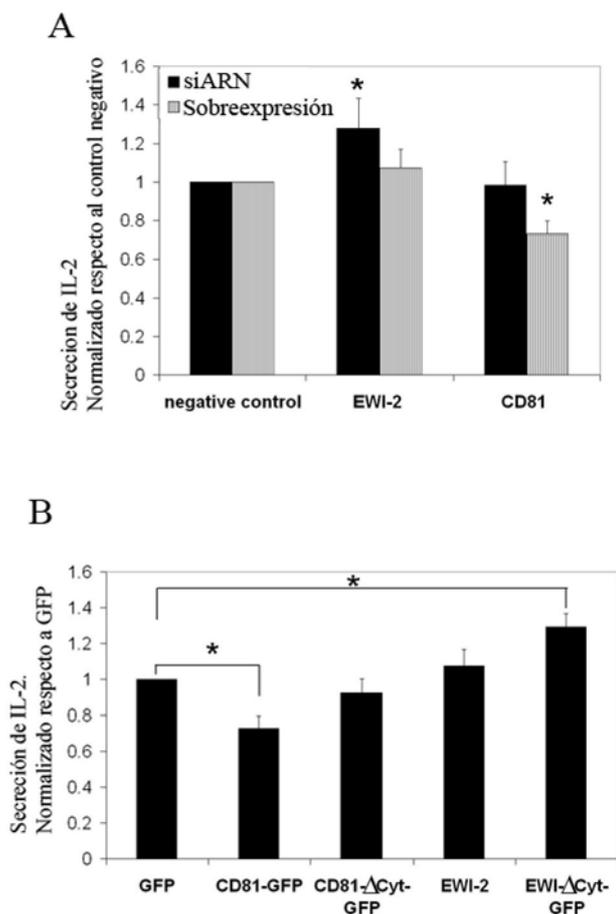


Figura 24: Los niveles de expresión de las proteínas EWI-2 y CD81 modulan la secreción de IL-2 en células T. A) Las células J77 se transfectaron con los oligos de interferencia control y con oligos específicos para reducir la expresión de EWI-2 y CD81 o bien se transfectaron con las construcciones GFP o GFP fusionada a dichas proteínas. Al tiempo de máxima expresión o máximo silenciamiento, las células se conjugaron con células RAJI cargadas con SEE (1µg/ml) durante toda la noche y se midió la concentración de IL-2 secretada en los sobrenadantes por ELISA. Los datos corresponden a la media +/- la SD de los niveles de IL-2 normalizados respecto al control negativo (oligonucleótido control o GFP) de al menos 3 experimentos independientes. * p<0.05 en un análisis t de Student.

B) La disminución de la secreción de IL-2 debida a la sobreexpresión de CD81 es dependiente del dominio C-terminal de esta tetraspanina. Las células J77 transfectadas bien con la GFP (control) y las construcciones de GFP fusionadas con CD81 y EWI-2 o bien con los mutantes que carecen del dominio C-terminal se conjugaron con células RAJI pulsadas con SEE (1µg/ml) durante toda la noche y se midió la concentración de IL-2 en los sobrenadantes mediante ELISA. Los datos representan la media +/- la SD de la producción de IL-2 normalizada respecto al control (GFP) de al menos 3 experimentos independientes. * p<0.05 en un análisis t de Student.

EWI-2 y CD81 son integrantes de los microdominios ricos en tetraspaninas y dentro de dichos TEM podrían estar implicados en la organización de determinadas proteínas asociadas a los receptores de membrana CD4 o CD3. Por otra parte, y como hemos visto en esta tesis, ambas proteínas conectan los microdominios con el citoesqueleto de actina a través de las proteínas adaptadoras ERM. Para investigar esta dicotomía se generaron mutantes de estas dos proteínas (EWI-2 y CD81) que carecían del dominio C-terminal citoplasmático. Cuando estas dos construcciones (EWI-2Δcyt y

CD81 Δ cyt, ambos GFP) se transfectaron en las células J77 el efecto inhibitorio de la sobreexpresión de la proteína salvaje CD81-GFP se perdía, mientras que el mutante de EWI-2 se comportaba como dominante negativo, al reproducir los efectos de la disminución de la expresión de dicha proteína (**Figura 24**).

4.3) CARACTERIZACIÓN DE OTRAS ASOCIACIONES ENTRE TETRASPANINAS Y EWI-2 CON EL CITOESQUELETO CELULAR

4.3.1. Estudio de Filamina-A y α -actinina en la Sinapsis inmune

4.3.1.1 EL DOMINIO CITOPASMÁTICO DE EWI-2 INTERACCIONA CON LAS PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO FILAMINA Y ALFA-ACTININA

El siguiente objetivo de esta tesis consistió en estudiar otras posibles interacciones que pudieran tener lugar entre las proteínas EWI y las tetraspaninas con otras proteínas del citoesqueleto. Así pues, se realizaron pull-downs con lisados de linfoblastos-T enfrentados a las secuencias de los dominios C-terminal citoplasmáticos correspondientes a las proteínas EWI-2 y CD81 acoplados a péptidos biotinilados y se analizaron por técnicas proteómicas, identificándose dos nuevas proteínas asociadas a estos dominios: Filamina A y α -actinina (**Figura 25A y B**).

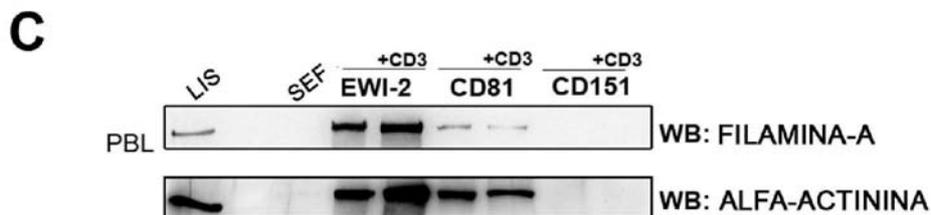
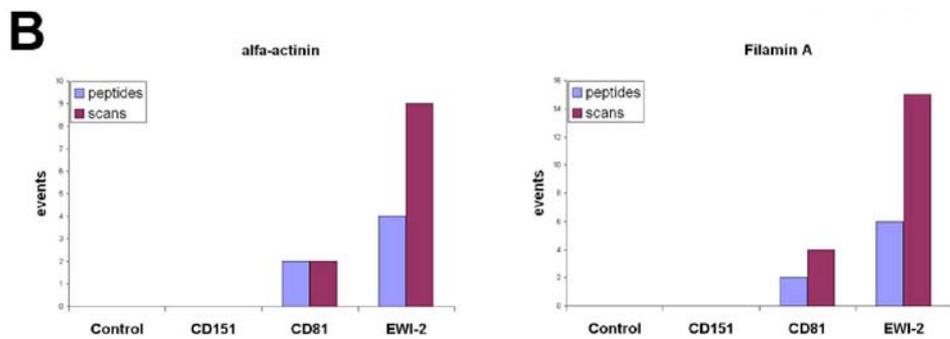
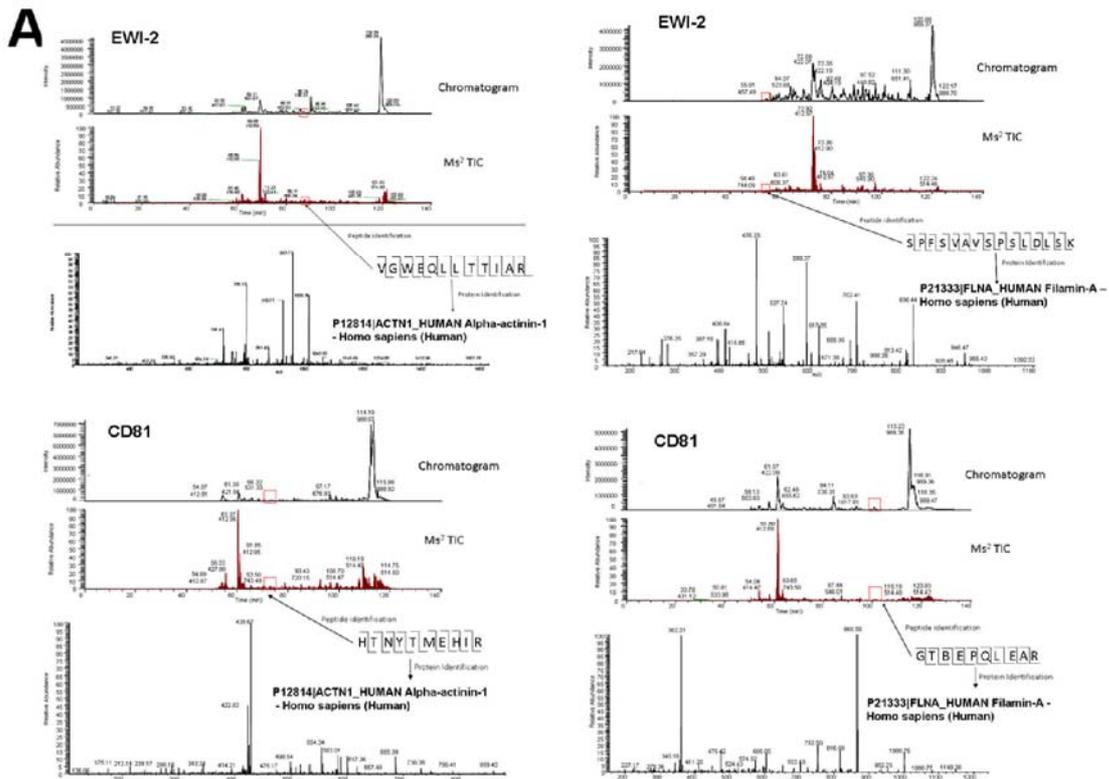


Figura 25: El dominio C-terminal citoplasmático de las proteínas EWI-2 y CD81 se une a Filamina-A y a α -actinina. A) Análisis mediante espectrometría de masas de las muestras obtenidas a partir de ensayos de *pull-down* de lisados de linfoblastos T con los péptidos biotinilados correspondientes a las regiones citoplasmáticas C-terminales de CD81 y EWI-2. Se muestran dos cromatogramas amplificando las zonas recuadradas en rojo sucesivamente y la identificación de un péptido de α -Actinina o Filamina-A

en cada caso (paneles recuadrados en rojo). **B)** Gráficas mostrando el número de péptidos y de *scans* de α -Actinina identificados para cada región C-terminal biotinilada. Como controles se usaron sefarosa-estreptavidina sin péptidos (control), y los péptidos biotinilados de las regiones citoplasmáticas C-terminales de CD147 y la tetraspanina CD151. Los valores representados son las medias de 2 experimentos independientes \pm SD. **C)** Análisis por WB de la unión *in vitro* de Filamina-A y α -actinina con los péptidos biotinilados correspondientes a las secuencias C-terminal citoplásmicas de las proteínas EWI-2 y CD81. Los PBLs se estimularon o no mediante la incubación con el anticuerpo anti-CD3 (HiT3, 10 μ g/ml) antes de lisarse en tampón de lisis conteniendo 1% de NP-40.

La confirmación de estos resultados se obtuvo mediante la realización de experimentos de *pull-down* con lisados de PBLs activados o no con el anticuerpo anti-CD3 (HiT3, 10 μ g/ml) y posterior WB con los anticuerpos correspondientes a Filamina A y α -actinina. Como podemos ver en la **figura 25C**, la interacción de Filamina-A ocurría preferentemente con el dominio C-terminal de EWI-2 en comparación con el de CD81. Además, la asociación de EWI-2 con la proteína α -actinina se incrementaba con la estimulación de los PBLs. Por el contrario, la asociación de CD81 con α -actinina no se alteraba significativamente al tratar los linfocitos con el anticuerpo anti-CD3.

4.3.1.2 FILAMINA Y ALFA-ACTININA SE LOCALIZAN EN EL ANILLO PERIFÉRICO DE LA SINAPSIS

Filamina-A desempeña un papel en la sinapsis inmune al interaccionar con CD28, de manera que dicha interacción es necesaria para la reorganización del citoesqueleto de actina que permite el reclutamiento entre otras, de proteínas señalizadoras (Tavano et al., 2006). El hecho de que esta proteína del citoesqueleto se asocie a EWI-2 le confiere a esta última un papel regulador en la reorganización de la membrana en este contexto. Sin embargo, aunque la Filamina-A-GFP se relocaliza claramente en la zona de contacto de la Sinapsis Inmune cuando esta construcción se transfecta en linfocitos T (**Figura 26B**), en este trabajo se ha observado que dicha proteína está más expresada en las CPA que en los linfocitos T (resultados no mostrados).

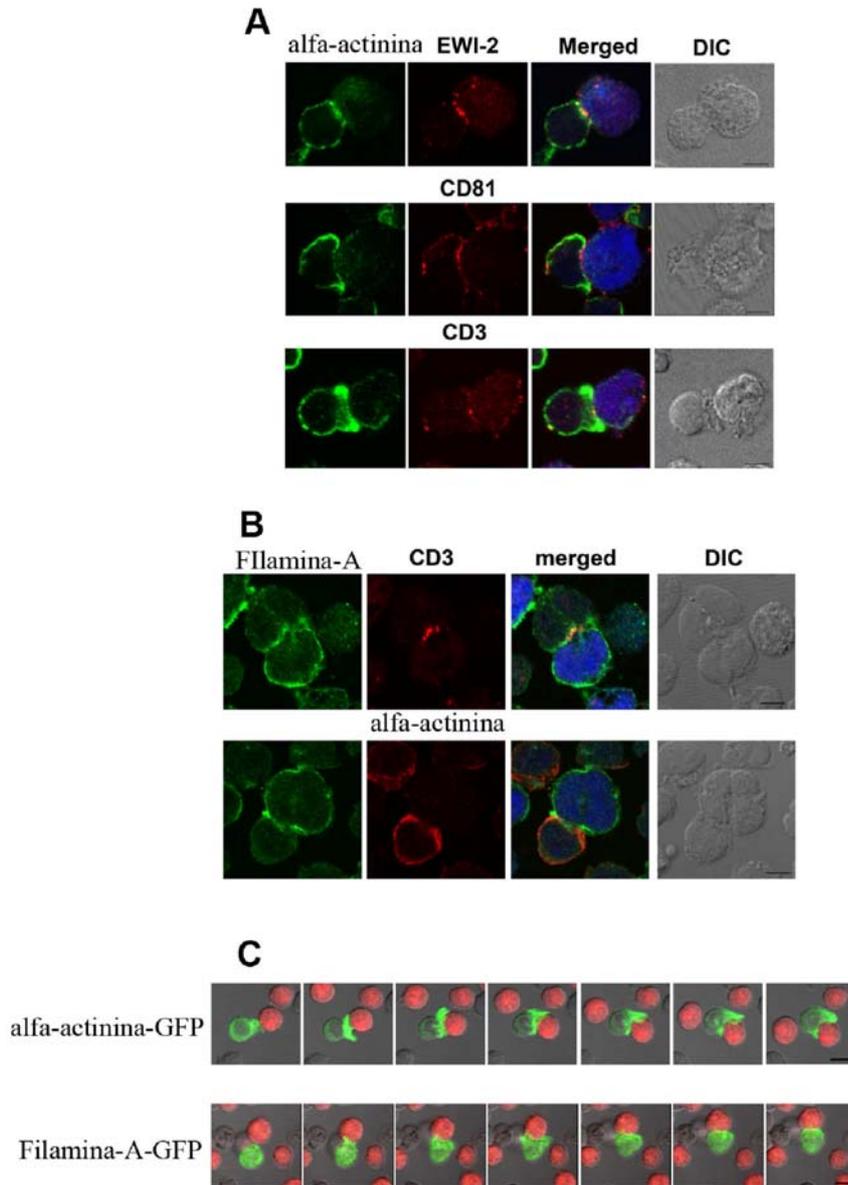


Figura 26: α -Actinina y Filamina-A se localizan en la zona de contacto de la SI. **A)** La línea celular T J77 se conjugó con la línea RAJI preincubada con SEE (1 μ g/ml) y marcada con la sonda azul CMAC. Los conjugados se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con un anticuerpo anti- α -actinina en combinación con los anticuerpos anti-EWI-2 (8A12), anti-CD81 (I.33.22), o anti-CD3 (T3b). Se muestra un plano confocal junto con la imagen del visible y la imagen de los dos canales superpuestos. En azul, la CPA. Barras=5 μ m. **B)** La línea celular T se conjugó con la línea RAJI cargada con SEE (1 μ g/ml) y teñida con la sonda azul CMAC. Los conjugados se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con un anticuerpo anti-Filamina-A en combinación con los anticuerpos anti-CD3 (488) y un anticuerpo anti- α -actinina. Se muestra un plano confocal junto con la imagen del visible y la imagen de los dos canales superpuestos. En azul, la CPA. Barras=5 μ m. **C)** La línea celular J77 se transfectó con las construcciones GFP acopladas a α -actinina y Filamina-A y los transfectantes se conjugaron con células B RAJI teñidas con la sonda CMTMR roja. Las células posteriormente se monitorizaron realizando videos a tiempo retardado a

intervalos de 30 segundos. En la figura se muestran las imágenes representativas así como la máxima proyección, la superposición de los canales de fluorescencia y el visible. Barras=10 μ m.

Se analizó la localización subcelular de Filamina A y α -actinina en la SI. En el caso de las proteínas endógena se observó que en los conjugados recién formados Filamina y α -Actinina colocalizaban con EWI-2 en el anillo central y posteriormente se relocalizaban a la zona periférica. Si además tranfectábamos las células J77 con una construcción de Filamina y α -actinina acoplada a GFP, observábamos la misma dinámica de localización (**Figura 26 y videos suplementarios**).

4.3.2. Estudio de la proteína Sintenina-1 en la migración linfocitaria

4.3.2.1 SINTENINA-1 PRESENTA UNA DISTRIBUCIÓN POLARIZADA EN LINFOCITOS T

Otra proteína del citoesqueleto que se incluye dentro de los microdominios de tetraspaninas es la Sintenina-1 (Latysheva et al., 2006). Está descrito que Sintenina-1 afecta a la migración de células de melanoma y de oligodendrocitos inmaduros (Boukerche et al., 2007; Chatterjee et al., 2008). Otras proteínas PDZ están implicadas en migración y polaridad celular (Ludford-Menting et al., 2005). Con estos antecedentes se investigó el papel de Sintenina-1 en el contexto de la migración linfocitaria. Primero se estudió la localización de Sintenina-1 en linfocitos de sangre periférica. En ausencia de estímulos, la Sintenina-1 presentaba una distribución submembranosa uniforme. Sin embargo, al estimular los PBLs con la quimiocina CXCL12/SDF-1 α , que provoca la consecuente polarización del linfocito, se observó una relocalización de Sintenina-1 a ambos polos de la célula, es decir, al frente de avance y al urópodo celular (**Figura 27A**). Cuando en lugar de PBLs, se estudió la localización de Sintenina-1 en una línea celular constitutivamente polarizada (CEM), ésta se observaba principalmente en el urópodo, colocalizando con proteínas como CD44 e ICAM-3, marcadores de esta estructura celular. En un 20% de los casos Sintenina-1 se localizaba además en el frente de avance. Este porcentaje se incrementaba hasta un máximo del 55% de las células, cuando se estimulaban durante 30 segundos con la quimiocina SDF-1 α (**Figura 27B**).

Para profundizar en el estudio de la dinámica de Sintenina-1 dentro de la célula se transfectaron dos tipos celulares distintos de linfocitos T constitutivamente

polarizados con la construcción GFP fusionada a Sintenina-1. Posteriormente las células se monitorizaron mediante microscopía confocal a tiempo retardado y se observó que Sintenina-1-GFP se acumulaba tanto en el frente de avance de estas células como en el urópodo de las mismas. Esta distribución polarizada se mantenía durante la migración (**Figura 27C y video suplementario**). Como se puede observar en las secuencias de videomicroscopía, Sintenina-1 se redistribuye activamente en el frente de avance correlacionando esta distribución con cada uno de los movimientos protrusivos en esta área subcelular.

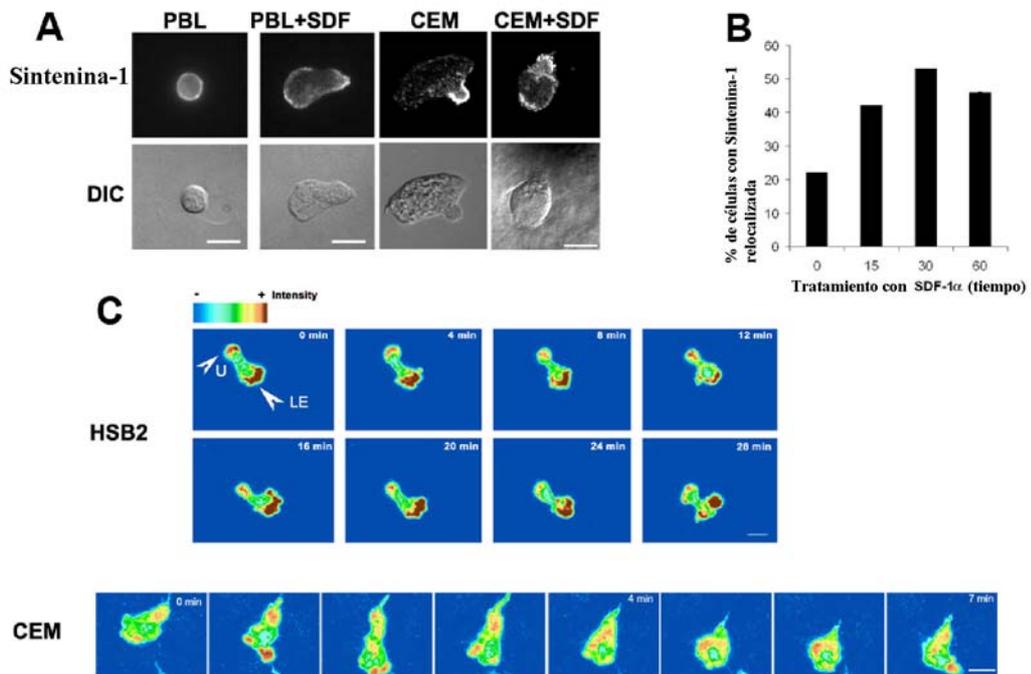


Figura 27: Redistribución polar de la Sintenina-1 en linfocitos T migratorios. **A)** Los PBLs o las células CEM adheridas a cristales recubiertos de FN (50 ó 20µg/ml respectivamente) se incubaron o no con la quimiocina SDF-1α (100nM) durante 5 minutos, se fijaron con formaldehído al 4%, se permeabilizaron con Tritón-X-100 al 0.5% durante 5 minutos y se tiñeron con el anticuerpo específico frente a Sintenina-1. Las preparaciones se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia confocal. También se muestran las imágenes del canal visible. Barras=10µm. **B)** Análisis cuantitativo de la relocalización de Sintenina-1 después de la estimulación con la quimiocina SDF-1α (100nM) a diferentes tiempos. El porcentaje de células en las que Sintenina-1 se encuentra localizada en el frente de avance se contó en 200 células procedentes de 2 experimentos independientes. Los datos representan la media +/- la SD. **C)** Se transfectaron transitoriamente células HSB-2 y CEM con la construcción Sintenina-1-GFP, se adhirieron a cristales cubiertos de FN (20µg/ml) y se estimularon con la quimiocina SDF-1α (100nM). Las células transfectadas y estimuladas se monitorizaron mediante microscopía confocal realizando la adquisición de series confocales con intervalos de 30 segundos. Se muestran imágenes representativas.

Las flechas marcan los urópodos celulares (U) y el frente de avance de las células (LE). Se representa también la escala de pseudocolor. Barras=5µm.

4.3.2.2 SINTENINA-1 ES UN FACTOR LIMITANTE EN LA POLIMERIZACIÓN DE ACTINA Y LA QUIMIOTAXIS DE LOS LINFOCITOS T

Puesto que Sintenina-1 se relocaliza a zonas de protrusión de membrana, decidimos estudiar si tenía algún efecto sobre la polimerización de actina. Para ello, interferimos la expresión de Sintenina-1 en células CEM con dos oligonucleótidos de ARNi específicos frente a la molécula PDZ (**Figura 28A**) y analizamos el contenido de F-actina tras estimulación con la quimiocina SDF-1 α . Como se observa en las **figuras 28B y 28C**, en las células CEM silenciadas la cantidad de F-actina basal era menor con respecto a las células transfectadas con el oligo negativo. La estimulación con SDF-1 α causaba un rápido incremento de la actina polimerizada en las células control a los 60 segundos. Sin embargo, en las células con expresión reducida de Sintenina-1 no se detectó este incremento. El mismo resultado se obtuvo tanto por citometría de flujo (**Figura 28B**) como por separación mediante ultracentrifugación de las fracciones de actina filamentosa (F-actina) o globular (G-actina) (**Figura 28C**). Estos resultados sugieren que Sintenina-1 regula el balance entre la actina polimerizada y la actina soluble.

A continuación se abordó el papel funcional de Sintenina-1 en la migración de linfocitos T, tanto en migración aleatoria, como en la migración dirigida hacia estímulos quimiotácticos. Se transfectó la línea celular CEM con un oligo negativo y con un oligo específico de interferencia de Sintenina-1 y se realizaron experimentos en cámaras Transwell que valoraron la capacidad migratoria de estas células. Los experimentos se llevaron a cabo en presencia/ausencia de las quimiocinas SDF-1 α y MIP-3 β y se observó que en ambos casos la capacidad migratoria de las células silenciadas para Sintenina-1 era significativamente menor (**Figura 28D**). En paralelo se realizaron experimentos equivalentes en los que las células estaban transfectadas tanto con el control GFP como con dos construcciones de Sintenina-1 (Sintenina-1-GFP y Sintenina-1-HA). Los resultados confirmaron un papel de esta proteína en la migración, puesto que la sobreexpresión causaba el efecto contrario al silenciamiento, esto es, un aumento significativo de la migración tanto hacia la quimiocina SDF-1 α (**Figura 28E**) como hacia MIP-3 β (resultados no mostrados).

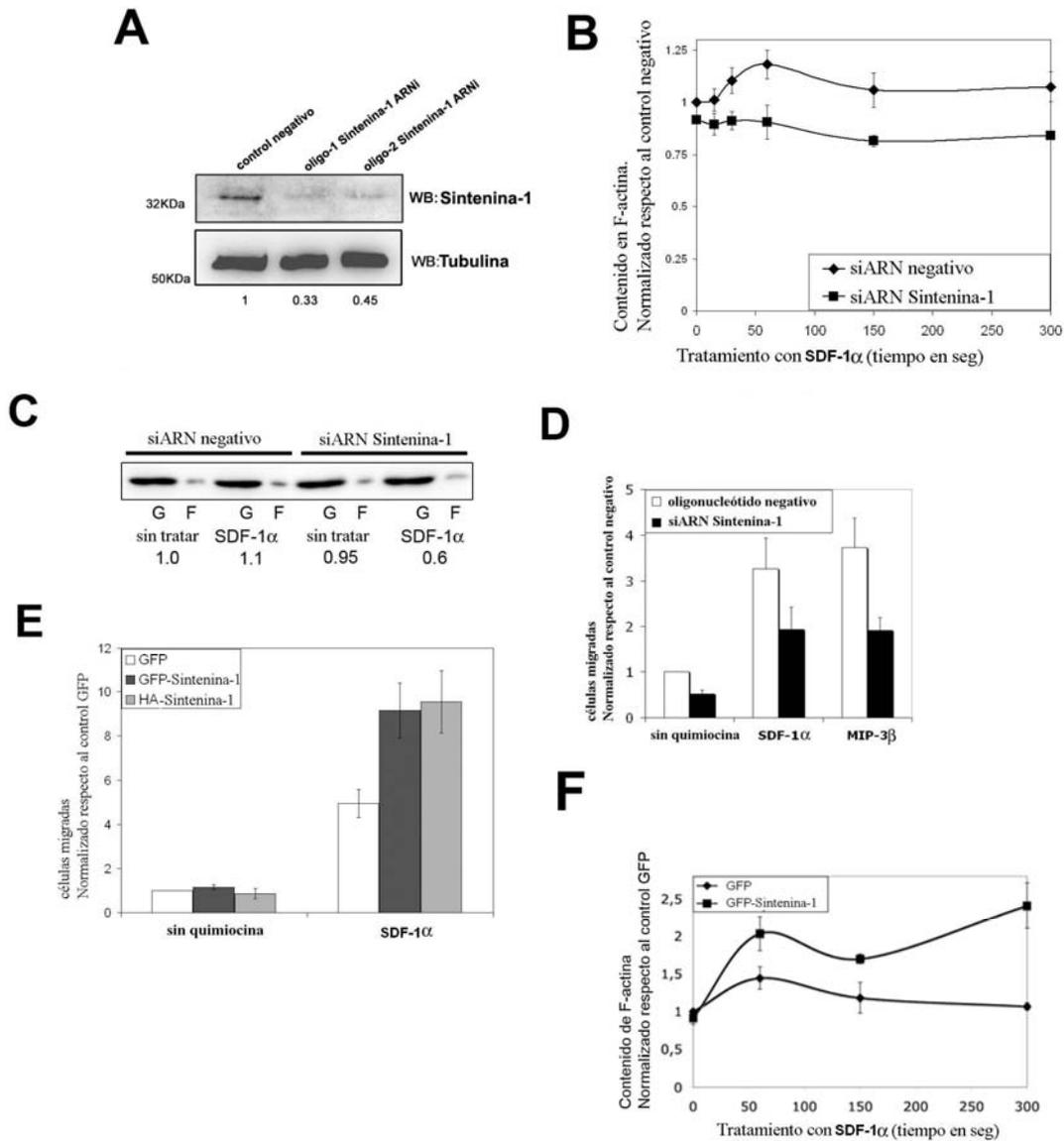


Figura 28: Sntenina-1 regula la polimerización de actina y la motilidad de los linfocitos T. **A)** Control de los oligos de interferencia utilizados para silenciar Sntenina-1. Se transfectaron células CEM con un control negativo y con 2 oligonucleótidos de ARNi específicos frente a Sntenina-1. Las células se lisaron en NP40 1% y tras el protocolo de WB se revelaron tanto con anti-Sntenina-1 como con tubulina para el control de carga. **B)** Se transfectaron células CEM con oligonucleótidos de interferencia control y específico para Sntenina-1. Después las células se trataron o no con la quimiocina SDF-1α (100nM), se fijaron a diferentes tiempos de estimulación, se permeabilizaron y se tiñeron con faloidina 488. Después se analizaron por citometría de flujo. Los datos muestran la media +/- la SD de 4 experimentos independientes. **C)** Se transfectaron células CEM con los oligos control y específico para Sntenina-1 y se trataron o no con la quimiocina SDF-1α (100nM) durante 1 minuto. Después las células se lisaron en un tampón que estabiliza la F-actina y se llevó a cabo la separación de F-actina y G-actina por ultracentrifugación. Los números representan el ratio F/G actina en cada condición respecto al obtenido para las células transfectadas con el control negativo sin estimular. **D)** Ensayos de migración realizados con células CEM transfectadas con un oligo control negativo o con ARNi específicos para Sntenina-1 en

presencia/ausencia de las quimiocinas SDF-1 α (100nM) y MIP-3 β (1 μ g/ml). Los datos representan la media +/- la SD de 4 experimentos independientes. $p < 0.05$ en un test t de Student. **E)** Se transfectaron células CEM con las construcciones GFP, GFP fusionada a Sintenina-1 y Sintenina-1-HA. Después las células se sembraron en cámaras Transwell en presencia/ausencia de la quimiocina SDF-1 α (100nM). Las células migradas se recogieron a las 2 horas y se analizaron por citometría de flujo. Los datos representan la media +/- la SD de 2 experimentos independientes. **F)** Las células CEM transfectadas con GFP o Sintenina-1 GFP se trataron o no con la quimiocina SDF-1 α (100nM), se fijaron a diferentes tiempos de estimulación, se permeabilizaron y se tiñeron con faloidina-647. Después se analizaron por citometría de flujo. Los datos muestran la media +/- la SD de 2 experimentos independientes.

La sobreexpresión de Sintenina-1 también aumentó la polimerización de actina en respuesta a la quimiocina SDF-1 α (**Figura 28F**), sugiriendo que Sintenina-1 actúa como factor limitante en la migración y señalización inducida por quimiocinas.

4.3.2.3 SINTENINA-1 REGULA LA TRANSLOCACIÓN DE RAC A LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Se ha descrito que la GTPasa Rac, perteneciente a la familia de Rho, está involucrada en la polimerización de actina inducida por quimiocinas (Vicente-Manzanares et al., 2005). Por tanto, decidimos analizar la actividad de Rac en células interferidas en la expresión de Sintenina-1. Para ello, se analizó el contenido celular de Rac-GTP mediante ensayos modificados de ELISA. Estos ensayos se basan en la unión de Rac-GTP a un dominio RBD de un efector de Rac inmovilizado en la placa de ELISA. Se observó que en células transfectadas con un oligonucleótido control y posteriormente estimuladas con SDF-1 α tenía lugar un incremento en la actividad de Rac (**Figura 29A**) que no se observaba en células transfectadas con el oligo de ARNi frente a Sintenina-1.

El análisis por microscopía confocal de la localización subcelular de Rac reveló que en las células CEM transfectadas con el control negativo, Rac tenía una localización difusa en el citoplasma y se translocaba a la membrana después de la estimulación con la quimiocina SDF-1 α , colocalizando con Sintenina-1 en el frente de avance (**Figura 29B**). En las células interferidas para Sintenina-1 desaparecía la tinción submembranosa de la proteína PDZ mientras que se mantenía algo de expresión localizada en vesículas intracelulares, sugiriendo un mayor tiempo de vida de la proteína en estos compartimentos. La estimulación con SDF-1 α de estas células era incapaz de relocalizar Rac al frente de avance, permaneciendo la GTPasa con el patrón

difuso observado en células sin estímulo (Figura 29B). Esta inhibición en la translocación de Rac a la membrana fue confirmada en ensayos bioquímicos de fraccionamiento (Figura 29C).

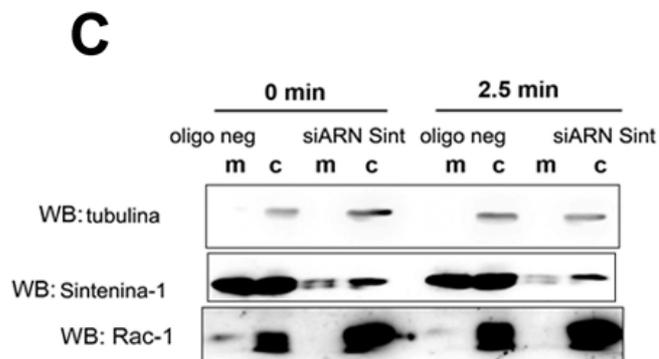
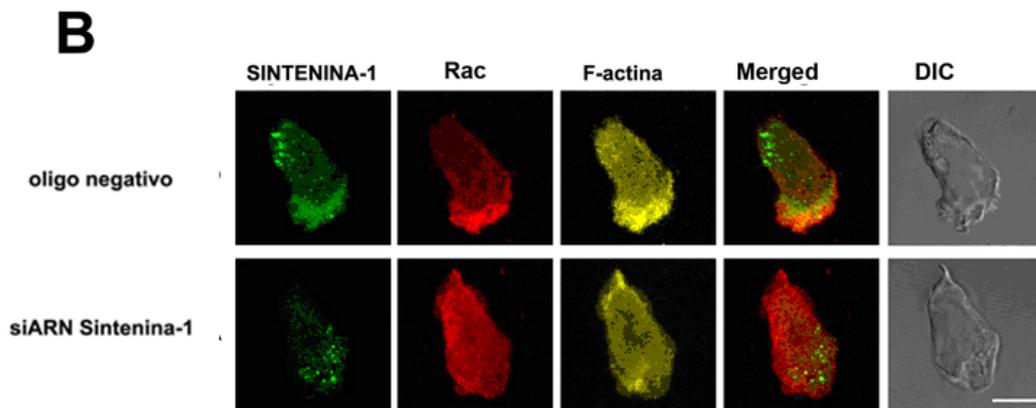
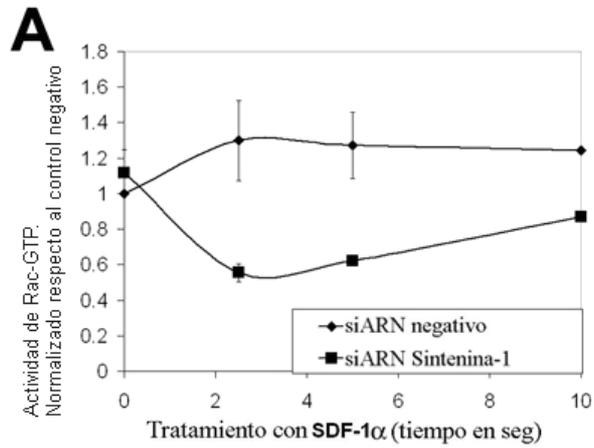


Figura 29: El silenciamiento de Sintenina-1 inhibe la activación de Rac e impide su relocalización al frente de avance. **A)** Las células CEM transfectadas tanto con un oligo control como con un oligo específico para disminuir la expresión de Sintenina-1 se trataron o no con SDF-1 α (100nM) y se midió la cantidad de Rac-GTP mediante el ensayo de G-LISA para Rac. Los datos representan la media +/- la SD de 2 experimentos independientes realizados por duplicado **B)** Células CEM transfectadas con un oligo control o con el ARNi específico de Sintenina-1 se trataron con la quimiocina SDF-1 α (100nM) durante 5 minutos, se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con los anticuerpos anti-Sintenina-1, anti-Rac y con faloidina-647. Las muestras se analizaron mediante microscopía confocal manteniendo para ambas muestras los mismos parámetros de adquisición. Se presentan las proyecciones máximas así como la superposición de los canales de fluorescencia y el canal visible. Barras=5 μ m. **C)** Células CEM transfectadas con un oligo control o con el oligo específico para Sintenina-1 fueron tratadas o no con la quimiocina SDF-1 α (100nM) durante 2,5 minutos. Se separaron las fracciones de citosol y membrana mediante un kit de extracción comercial. Las muestras se analizaron para Sintenina-1, Rac y tubulina como control de carga.

4.3.2.4 SINTENINA-1 ES UN SUSTRATO DE LA FAMILIA DE QUINASAS SRC

En diversos contextos celulares la activación de Rac es dependiente de la actividad de Src (Ouyang et al., 2008; Sai et al., 2008). Además, en células de melanoma se ha descrito la unión de Sintenina-1 a Src (Boukerche et al., 2008). Como podemos observar en la figura 30A, Sintenina-1 presenta un alto nivel de fosforilación basal en Tyr que aumenta significativamente a 30s tras la estimulación de las células con la quimioquina SDF-1 α . El pretratamiento de las células con el inhibidor de las quinasas de la familia de Src PP2 inhibe la fosforilación inducida por quimioquinas, demostrando así que la fosforilación de Sintenina-1 es dependiente de quinasas de la familia Src (Figura 30B).

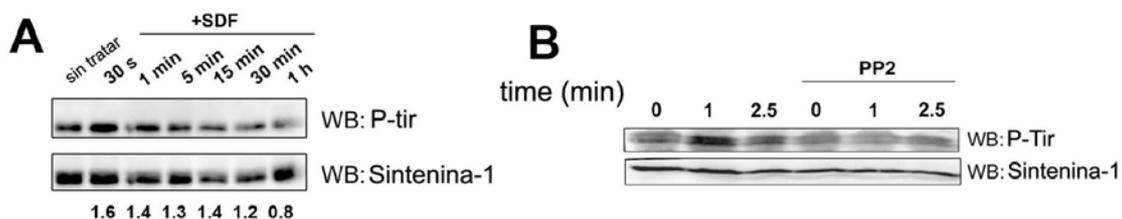


Figura 30: La quinasa Src fosforila a Sintenina-1. **A)** Lisados de células CEM tratadas o no con la quimiocina SDF-1 α (100nM) a los tiempos indicados fueron inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-Sintenina-1. Las membranas se revelaron secuencialmente para fosfotirosina y para Sintenina-1. Se representa también el análisis cuantitativo de la fosforilación de Sintenina-1 en estos residuos normalizándolo con la cantidad de Sintenina-1 inmunoprecipitada. **B)** Las células CEM tratadas o no con

la quimiocina SDF-1 α (100nM) a los tiempos indicados y previamente incubadas con el inhibidor PP2 de Src se lisaron y los lisados se revelaron con los anticuerpos anti-fosfotirosina y anti-Sintenina-1.

4.3.2.5 SINTENINA-1 MEDIA LA ACTIVACION DE RAC DEPENDIENTE DE SRC

Para determinar directamente si Sintenina-1 media la activación de Rac posterior a Src, se examinó el papel de los 4 sitios potenciales de fosforilación en tirosina presentes en la región N-terminal de Sintenina-1. Estos residuos están incluidos dentro de una secuencia ITAM (YxxI/Lx(6-12)YxxI/L), que incluye una secuencia hemi-ITAM adicional, y una secuencia ITIM (S/I/VLxYxx/V/L) (**Figura 31A**). Se generaron mutantes de Sintenina-1 con los 4 residuos de Tyr mutados (mutante Y4), con el motivo ITAM mutado (mutante Y3) y con el primer motivo ITIM mutado (mutante Y1). En todos los casos, las Tyr se mutaron a Phe. Las construcciones se fusionaron a la proteína fluorescente GFP. Estos mutantes se expresaron en células CEM y se observó que tanto su distribución como su dinámica eran semejantes a las de la proteína salvaje en células CEM polarizadas y estimuladas con la quimiocina SDF-1 α (**Figura 31B y vídeo suplementarios**). En ensayos de migración se observó que la sobreexpresión de mutante Y3-GFP incrementaba la migración pero nunca alcanzaba los niveles de la sobreexpresión de la proteína salvaje. El mutante Y1-GFP se comportaba igual que la construcción GFP sola y por último, la sobreexpresión del mutante Y4 bloqueaba dicha migración (**Figura 31C**). Se estudió a continuación el efecto de los mutantes en la polimerización de actina. Para ello se midió mediante citometría de flujo la cantidad de F-actina en respuesta a SDF-1 α en los distintos mutantes. El efecto observado se correlacionaba con el encontrado en quimiotaxis. El mutante Y3 daba lugar a un incremento de F-actina mayor que el control pero nunca superior al provocado por la sobreexpresión de la Sintenina-1 salvaje. A su vez, el mutante Y1 presentaba cantidades similares de F-actina que el control GFP. La sobreexpresión del mutante Y4, al igual que ocurría con la migración, bloqueaba la polimerización de actina en respuesta a SDF-1 α (**Figura 31D**), y también producía una reducción en el contenido de F-actina basal en células sin estimular. En los cultivos del mutante Y4 se observaba una depleción paulatina de células transfectadas, sugiriendo un efecto tóxico de la sobreexpresión de este mutante. Finalmente, para determinar si la fosforilación de Sintenina-1 afecta directamente a la activación de Rac, se transfectaron las células con Sintenina-1-GFP y los mutantes Y1 e Y3 y se analizó la por citometría de flujo los

niveles de Rac-GTP con un anticuerpo específico tras estimulación con la quimiocina SDF-1 α . En estos ensayos se observó un aumento en Rac-GTP tras la estimulación con SDF-1 α en células control (Figura 31E trazo grueso). Este aumento era mayor en células transfectadas con la forma salvaje de Sintenina y algo menos con el mutante Y3 (Figura 31E). Para el mutante Y1, se observó una actividad de Rac por debajo de las células control, sugiriendo que Sintenina-1 a través de la fosforilación de su motivo ITIM regula la activación de Rac y consecuente polimerización de actina de manera dependiente de Src en la migración celular.

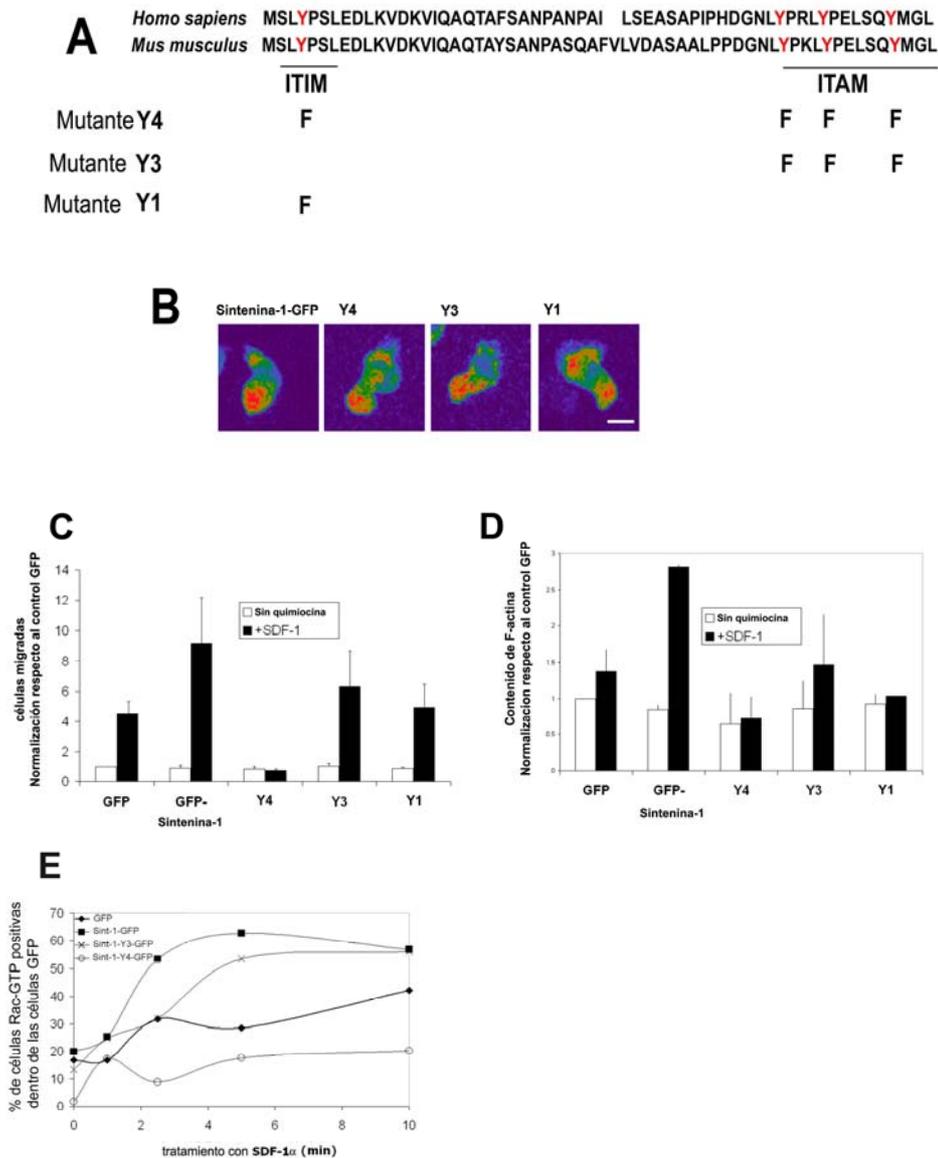


Figura 31: La fosforilación de Sintenina-1 es esencial para la polimerización de actina en respuesta a SDF-1 α . A) Secuencia de aminoácidos del dominio N-terminal de Sintenina-1 y posición de las mutaciones realizadas para la construcción de los distintos mutantes fusionados a la proteína fluorescente

GFP. Se muestran además las secuencias ITAM e ITIM de la proteína. **B)** Se transfectaron células CEM con las construcciones GFP, Sintenina-GFP y los tres mutantes Y3-GFP, Y1-GFP e Y4-GFP y se analizaron mediante microscopía confocal a tiempo retardado en presencia de la quimiocina SDF-1 α (100nM). Se muestra una imagen representativa de cada mutante. Barras=5 μ m. **C)** Las células CEM transfectadas con GFP, Sintenina-1-GFP y los distintos mutantes se añadieron a las cámaras Transwell en la ausencia/presencia de la quimiocina SDF-1 α (100nM). Se recogieron las células migradas y se analizaron por citometría de flujo. Los datos representan la media +/- la SD de 4 experimentos independientes. **D)** Las células CEM transfectadas con GFP, Sintenina-1-GFP y los distintos mutantes se trataron con la quimiocina SDF-1 α (100nM) durante 1 minuto. Después se fijaron con formaldehído al 4%, se permeabilizaron con Tritón-X-100 al 0,5%, se tiñeron con faloidina-647 y se analizaron por citometría de flujo. Los datos representan la media +/- la SD de 2 experimentos independientes. **E)** Las células J77 transfectadas con las construcciones GFP, Sintenina-1-GFP y los mutantes Y3 e Y1 se trataron o no con SDF-1 α (100nM) y se cuantificó por citometría de flujo la tinción de Rac-GTP mediante un anticuerpo específico. Los datos representan la media +/- la SD de un experimento representativo.

4.3.2.6 EL MOTIVO ITIM DE LA SECUENCIA N-TERMINAL DE SINTENINA-1 ES NECESARIO PARA LA ASOCIACION INDUCIBLE CON LA PROTEINA M-RIP

Para investigar el mecanismo mediante el cual la proteína Sintenina-1, fosforilada por la quinasa Src, regula la activación de Rac decidimos determinar, mediante técnicas proteómicas, qué proteínas eran capaces de unirse a Sintenina-1 tras la estimulación con quimioquinas, y no con el mutante Y1. Para ello, estas células transfectadas con Sintenina-1-GFP salvaje o con el mutante Y1-GFP se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-GFP. Gracias a las técnicas proteómicas, confirmadas en paralelo con experimentos de WB (**Figura 32A**) detectamos que la proteína M-RIP (“myosin phosphatase Rho interacting protein”) interaccionaba con la Sintenina-1 nativa. Esta unión aumentaba tras estimulación con la quimiocina y sin embargo la interacción no tenía lugar en los inmunoprecipitados de células transfectadas con el mutante Y1 que no se fosforila en el dominio ITIM, sugiriendo por tanto, una unión inducible tras la fosforilación de dicho dominio (**Figura 32A**). La asociación inducible entre Sintenina-1 y M-RIP fue confirmada mediante coimmunoprecipitación en ambas direcciones con las proteínas nativas (**Figura 32B**).

La proteína M-RIP, también llamado p116^{RIP} es una proteína adaptadora que se une a RhoA y a la subunidad MBS (“myosin-binding-subunit”) de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (Surks et al., 2003), inhibiendo, por tanto, los movimientos contráctiles estimulados por la GTPasa Rho (Gebbink et al., 1997; Koga et al., 2006). Mediante la utilización de construcciones GST de diferentes dominios de M-RIP se demostró que la interacción con Sintenina-1 tiene lugar a través del segundo dominio coiled-coil (residuos 728-878). Este dominio es el mismo al que se une MBS (Mulder et al., 2004; Surks et al., 2003). En estos experimentos también se demostró la unión de M-RIP a Rac a través del extremo N-terminal de M-RIP (residuos 1-578) (**Figura 32C**). Por último, estudiamos la localización subcelular de M-RIP en linfocitos polarizados, observando dicha proteína presenta un patrón de localización muy similar al de Sintenina-1. Encontrándose en el urópodo en células no estimuladas (no se muestra) y en el frente de avance de la célula, colocalizando con F-actina tras estimulación con SDF-1 α (**Figura 32D**).

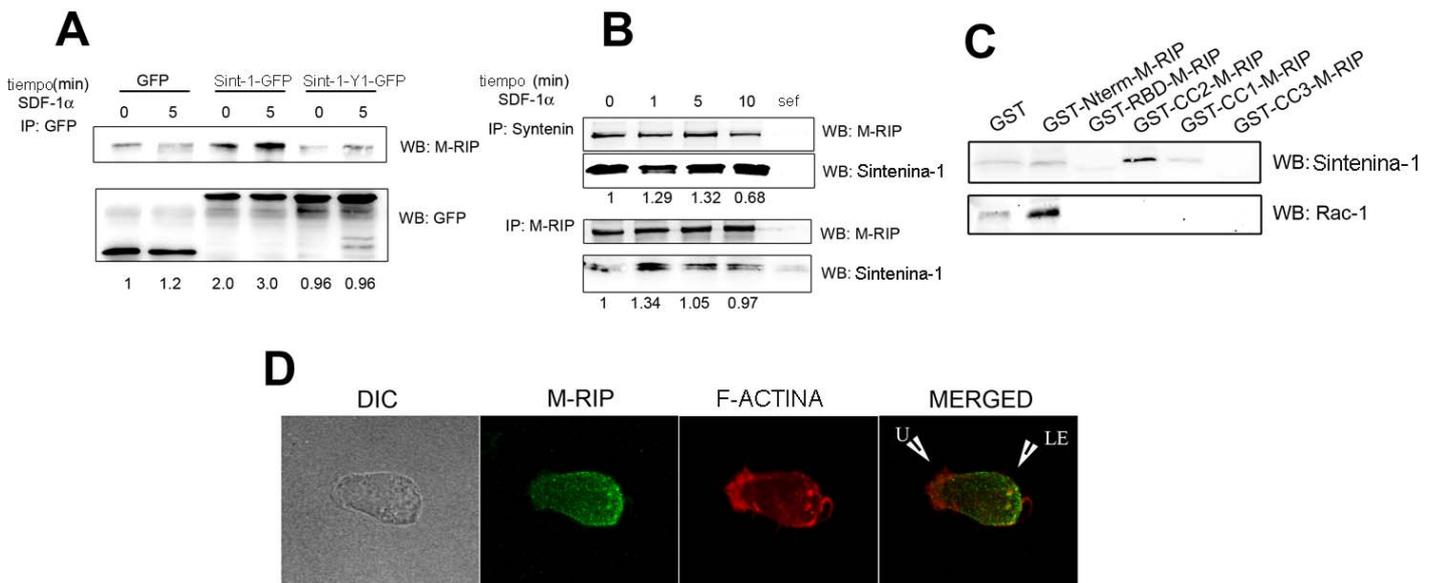


Figura 32: Identificación de M-RIP como proteína de unión a Sintenina-1 y a Rac en linfocitos T:

A) Las células J77 transfectadas con GFP, Sintenina-1-GFP o Sintenina-Y1-GFP se trataron con la quimiocina SDF-1 α (100 ng/ml), se lisaron a los tiempos indicados y se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-GFP. Las membranas se revelaron con anti-M-RIP y anti-GFP. Los números representan la unión relativa de M-RIP y Sintenina corregido con la cantidad de GFP inmunoprecipitada y normalizada con respecto al control GFP. **B)** Las células J77 tratadas con la quimiocina SDF-1 α (100 ng/ml), se lisaron a los tiempos indicados y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-Sintenina-1 ó anti-M-RIP y las membranas se revelaron secuencialmente con los mismos anticuerpos. Los números representan la unión relativa relativa de M-RIP y Sintenina-1 corregida con la cantidad de proteína

inmunoprecipitada y normalizada respecto al control negativo sin tratar. **C)** Los lisados de linfoblastos T se precipitaron con diferentes construcciones de M-RIP (N-terminal: 1-538; RBD: 545-823; CC1: 672-707; CC2: 728-875; CC3: 900-974) fusionadas a GST. Las membranas se revelaron con los anticuerpos anti-Sintenina-1 y anti-Rac. **D)** Las células CEM tratadas o no con SDF-1 α adheridas a FN (20 μ g/ml), se fijaron con formaldehído al 4%, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,5% y se tiñeron con un anticuerpo anti-M-RIP junto con faloidina-568. Las muestras se observaron al microscopio confocal. En verde, M-RIP. EN rojo, F-actina. También se representan la imagen superpuesta de los dos canales de fluorescencia y la del canal visible. Barra 10 μ m. Las flechas apuntan al urópodo (U) y al frente de avance (LE).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El citoesqueleto de actina es una red activa y dinámica compuesta por polímeros de actina y una gran variedad de moléculas asociadas. Está implicado en la migración, polarización y división celular (Louvet-Vallee, 2000). Además, el citoesqueleto cortical de actina conecta con la membrana plasmática a través de proteínas adaptadoras de manera que desde la superficie celular se activan cascadas de señalización hacia el interior celular. En este trabajo de tesis se han demostrado nuevas asociaciones entre el citoesqueleto de actina y la membrana plasmática. En concreto asociaciones que conectan, a través de las proteínas adaptadoras ERM, alfa-actinina, Filamina-A y la proteína PDZ Sintenina-1, el citoesqueleto de actina con los Microdominios Ricos en Tetraspaninas. De esta forma los TEMs no sólo actúan como plataformas especializadas que organizan en la membrana ciertos receptores (Yanez-Mo et al., 2009), sino que además sirven de conexión con el citoesqueleto y facilitan la activación de diferentes vías de señalización. Como ya hemos descrito en la introducción, se han demostrado asociaciones funcionales de los microdominios de tetraspaninas con proteínas señalizadoras intracelulares sin embargo, antes de este trabajo, no se había demostrado una interacción directa y constitutiva que conecte dichos microdominios con el citoesqueleto de actina y su regulación a través de rutas de señalización intracelular.

Conexión directa de las proteínas EWI y de la tetraspanina CD81 con el citoesqueleto de actina a través de las proteínas adaptadoras ERM Funciones en polarización, migración y sinapsis inmune.

Se ha demostrado en nuestro estudio la asociación directa de EWI-2, EWI-F y la tetraspanina asociada lateral y directamente a ellas, CD81, con las proteínas ERM, que conectan la membrana con el citoesqueleto de actina. Previamente a las proteínas EWI y CD81, se había descrito la unión de ERMs a otros receptores de membrana, tales como CD44, CD43, ICAM 1,2 y VCAM-1 (Barreiro et al., 2002; Serrador et al., 1997; Serrador et al., 1998; Yonemura et al., 1993). Todas estas proteínas tienen en común la presencia de residuos básicos en sus secuencias citoplásmicas generalmente en la región

más próxima a la transmembrana. CD44 e ICAM-1 además comparten otra característica, el punto isoeléctrico básico basado en el balance de las cargas positivas y negativas del dominio citoplásmico de dichas proteínas (**Tabla X**).

Tabla X: Comparación de la secuencia de aminoácidos de los dominios citoplásmicos de las proteínas EWI (EWI-2 y EWI-F), de algunas tetraspaninas (CD9, CD81, CD82, CD151) y de determinadas proteínas que se unen a ERM (ICAM-1,3 y CD44).

	N-terminal	Bucle Intracelular	C-terminal
EWI-2	CCFM KRLRKR 10,93		
EWI-F	CSSHWCC KK EVQ ETRR RRRLMSME MD 8,68		
CD9	MPV KGGTKCYKY 9,52	QESQ 4	CCAI RRN REMV 9,02
CD81	MGV EGTKCIK 8,05	QESQ 4	CCGI RN SSVY 8,06
CD82	MGAGCV KVTKY 9,19	NEVR 6	CRYI HSE DYS KV PKY 8,15
CD151	MGEFNE KK TT CGTVCLKY 7,79	KERR 10,84	YRSL KLEHY 8,50
ICAM-1	RQRKIKKY RLQQA QK GTPM KP NTQATP P 11,76		
ICAM-3	REHQ RSGSYHV RE ESTYLPLTSMQPTE AMG EEPSRAE 5,21		
CD44	NS RRRCGQ KKK LVINSGNGAV EDRKP SGLNG EASKSQ EMVHLVN KES ETPDQ FMTA DETR NLQNVDMKIGV 8,93		

En negrita se representan los aminoácidos de tipo básico. Subrayado, el punto isoeléctrico.

Se ha confirmado también el papel de las ERM en la localización subcelular de las proteínas EWI. Sin embargo, la transfección de una versión truncada de la proteína EWI-2 que no presenta el dominio citoplásmico se comportó como la proteína salvaje, localizándose en el urópodo celular. Esto sucede también con mutantes truncados de CD44 (Legg and Isacke, 1998) y VCAM-1 (Barreiro et al., 2008), ambos asociados a ERM e incluidos en microdominios ricos en tetraspaninas. En el caso de VCAM-1, durante la adhesión linfocito-endotelio, Barreiro et al., 2008 demuestran que la asociación con la tetraspanina CD151 dentro de los TEMs determina la localización subcelular de VCAM-1. De esta forma, aunque las ERM son necesarias para la localización de las proteínas EWI, las tetraspaninas mediante su asociación con dichas

proteínas adaptadoras son capaces de mantener la localización y organización en membrana de EWI-2 y EWI-F.

En el caso de CD9 se observó su presencia en los complejos con ERMs en los experimentos de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos. Sin embargo no se ha podido demostrar una asociación directa con la región C-terminal. Es posible que exista una asociación indirecta a través de CD81 en el contexto de la red de tetraspaninas. De hecho, se sabe que las tetraspaninas heterodimerizan a través de motivos hidrofóbicos conservados (Kitadokoro et al., 2001). Otra posibilidad sería que la asociación tuviera lugar a través del bucle intracelular, que posee un punto isoeléctrico básico (**Tabla X**).

En cuanto al papel regulador negativo de EWI-2 en la migración y polarización de linfocitos T, se trata de la primera vez que se adscribe un papel a la proteína endógena. En efecto, el silenciamiento de la expresión de EWI-2 conlleva el aumento tanto de la migración como del número de células polarizadas. Este aumento se correlaciona con un incremento en la fosforilación de ERMs, confirmando que dicha fosforilación es crucial en ambos procesos. Aunque la asociación de EWI-2 y CD81 con ERM parece ser constitutiva, no se puede descartar que dicha asociación presente algún tipo de regulación. Tanto EWI-2 como CD81 podrían estar implicados en la modulación de la fosforilación de las ERMs y/o en el reclutamiento de proteínas señalizadoras. Así, se podría reclutar a estos complejos la tirosina quinasa Syk, a través de su interacción con motivos ITAM presentes en Moesina (Urzainqui et al., 2002). La quinasa ROCK (Kawano et al., 1999) o la GTPasa Rho (Takahashi et al., 1997), están implicadas en la fosforilación y activación de ERMs. Además, las proteínas ERM también se asocian a PIP₂, importante en la activación de Rho al reclutar sus reguladores positivos y negativos (Louvvet-Vallee, 2000; Tsukita and Yonemura, 1999). Con posterioridad a nuestro trabajo se ha publicado que el entrecruzamiento de CD81 mediante anticuerpos monoclonales, induce la fosforilación de ezrina en tirosina al activar Syk, promoviendo la colocalización de la tetraspanina con ezrina y actina filamentosa (Coffey et al., 2009). CD81 también se asocia a la quinasa PI4K, a Shc y a las vías de activación ERK-MAPK (Carlioni et al., 2004; Mazzocca et al., 2008). Un aspecto interesante sería estudiar si EWI-2 participa en el reclutamiento de estas enzimas.

La asociación de las proteínas EWI y CD81 con las ERM dentro de los microdominios de tetraspaninas puede tener consecuencias relevantes en muchos procesos celulares. Como hemos visto en la introducción, las tetraspaninas están implicadas en los procesos celulares de fusión y adhesión (Hemler, 2005; Yanez-Mo et al., 1998; Yanez-Mo et al., 2009). En concreto, las tetraspaninas CD9 y CD81 tienen un papel principal en el proceso de fusión óvulo-espermatozoide en ratón (Kaji et al., 2002; Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000; Rubinstein et al., 2006). Dicha fusión tiene lugar en regiones ricas en microvilli, donde se localiza CD9 (Kaji et al., 2002; Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000). Por su parte, el balance de fosforilación/defosforilación de las proteínas ERM contribuye a la formación de los microvilli (Tsukita and Yonemura, 1999). Bajo estas condiciones, las interacciones EWI-2/CD81-ERMs podrían regular la formación de estos microvilli y la ausencia de las tetraspaninas CD9 y CD81 inhibirían la fusión debido a la pérdida de estas protrusiones de membrana. Por otra parte, los niveles de expresión de EWI-2 en los oocitos que carecen de CD9 disminuye un 90%, sugiriendo una cooperación entre EWI-2 y su tetraspanina asociada en el proceso de fusión (He et al., 2009). EWI-F también se expresa en oocitos (Rubinstein et al., 2006). Otra posibilidad interesante es que los complejos de tetraspaninas actúen en *trans*. En este sentido, la molécula de los espermatozoides de ratón llamada Izumo (Inoue et al., 2005) podría tener como receptor a alguna de las proteínas EWI en el oocito.

La expresión de CD81 en células inmunes se ha asociado con la patogénesis del virus de la hepatitis C (HCV) y del virus de la inmunodeficiencia humana (Gordon-Alonso et al., 2006; Rosa et al., 2005). En el caso del HCV, aunque CD81 es necesario para que tenga lugar la infección de los hepatocitos, su presencia no es suficiente (Rocha-Perugini et al., 2009). Además, una versión truncada en la región extracelular de EWI-2 denominada EWI-2wint inhibe la entrada del virus (Rocha-Perugini et al., 2008). Por otra parte, la unión de la glicoproteína viral de HCV E2 a CD81 desencadena una serie de señales intracelulares a través de la quinasa JNK, que median en parte los efectos patogénicos en los linfocitos B inducidos por la infección viral (Rosa et al., 2005) al desencadenar la hiperproliferación de la subpoblación de linfocitos B vírgenes (CD27-) versus la subpoblación de linfocitos B memoria (CD27+). En células T, la coestimulación de CD81 esta mediada por Lck (Soldaini et al., 2003).

En lo que respecta a VIH la reducción de la expresión de CD81 y CD9 da lugar a un incremento en la formación de sincitios y en la entrada viral (Gordon-Alonso et al., 2006). En dichos procesos la interacción de la proteína de la envuelta viral gp120 con el receptor CD4 aumenta la fosforilación de ezrina y moesina en células T (Barrero-Villar et al., 2009).

En cuanto a la Sinapsis Inmune, los datos publicados son contradictorios. En primer lugar, se ha descrito que la ezrina y la moesina tienen funciones complementarias. Por un lado, ezrina se fosforila en treonina y al activarse interacciona y recluta a la quinasa ZAP-70 mientras que moesina se defosforila y se excluye de la sinapsis junto con su molécula asociada CD43 (Ilani et al., 2007). En otro trabajo posterior, sin embargo, se ha descrito que ambas proteínas se defosforilan/refosforilan en treonina en respuesta a la activación del TCR y se sitúan en el polo distal de la célula. Esta defosforilación estaría controlada por Vav1 y Rac1. Ezrina se localiza de manera transitoria en la zona de contacto de la Sinapsis Inmune (Shaffer et al., 2009) y su presencia es necesaria para la actividad de la subunidad p85 de la quinasa PI3K. La presencia transitoria de ezrina en la zona de contacto de la sinapsis inmune podría deberse a su asociación con EWI-2 y CD81. Se ha demostrado en este trabajo que EWI-2 se localiza en el anillo central de la Sinapsis Inmune, colocalizando con CD81 y CD3. El estudio exhaustivo de la señalización de los complejos de CD81/EWI-2 vía ERM puede aclarar y encontrar puntos de unión a las cascadas descritas hasta el momento. Por otra parte, la regulación de la expresión de EWI-2 y CD81 afecta de manera distinta a la secreción de la IL-2. Puesto que tanto ezrina como moesina están implicadas en la producción de IL-2, activación de la PLC- γ y flujo de Ca^{2+} (Shaffer et al., 2009) sería interesante estudiar si la asociación diferencial con las proteínas ERM explica estas diferencias.

Conexión directa de las proteínas EWI y de la tetraspanina CD81 con el citoesqueleto de actina a través de las proteínas adaptadoras α -Actinina y Filamina-A.

Otras interacciones descritas en esta tesis son las correspondientes a α -Actinina y Filamina-A. Estas proteínas entrecruzadoras de actina se asocian directamente a los dominios C-terminal de EWI-2 y CD81, tal y como han demostrado los experimentos

de pull-down con los péptidos biotinilados que contienen las secuencias de dichos dominios citoplasmáticos. Estas dos nuevas asociaciones abren nuevas vías de señalización a través de los microdominios de tetraspaninas, que a su vez pueden conectar con las cascadas ya descritas. En este sentido se ha descrito el papel regulador de la Filamina-A en la migración e invasión celular, ya que Filamina-A es crucial para el reclutamiento y actividad de las proteínas señalizadoras y reguladoras del citoesqueleto como Cdc42, Rac1 y RhoA (Leung et al., 2009). También se ha descrito el papel de la Filamina-A en cáncer de mama, donde juega un papel importante su fosforilación en los residuos Ser²¹⁵² y Ser¹⁴⁵⁹ y su asociación a la Ciclina-D1 (Zhong et al.).

La participación de las balsas lipídicas como organizadores de la membrana plasmática en los procesos de activación de células T y su dinámica basada en la conexión de dichos dominios con el citoesqueleto de actina a través de proteínas que unen actina ha sido descrita (Viola and Gupta, 2007). Así, por ejemplo, Filamina-A se ha implicado en la Sinapsis Inmune al interaccionar con la molécula estimuladora CD28 y llevar a cabo procesos de reorganización del citoesqueleto y reclutamiento de enzimas señalizadoras como PKC- θ en el contexto de dichos dominios de lípidos-proteínas (Tavano et al., 2006). A su vez, la proteína 14.3.3 une Filamina-A e integrinas α L β 2 en linfocitos T activados (Nurmi et al., 2006) regulando cambios en el citoesqueleto. Y 14.3.3 interacciona con PKC- θ (Meller et al., 1996) y con CD81 (Clark et al., 2004). En nuestro trabajo hemos descrito la localización de Filamina-A durante la formación y establecimiento de los conjugados en la zona de contacto de la Sinapsis y su asociación con los microdominios de tetraspaninas a través de CD81 y EWI-2. En muchos casos el término balsas lipídicas se utiliza para describir simplemente las fracciones de membrana que flotan en un gradiente de sacarosa. Sin embargo, estas técnicas bioquímicas no son capaces en la mayoría de las ocasiones, de distinguir entre distintos tipos de microdominios (Yañez-Mo 2009). Diversas tetraspaninas se asocian a CD3 y a los coreceptores CD4 o CD8 (Levy and Shoham, 2005; Levy et al., 1998), y además su efecto coestimulador proviene de un reclutamiento del TCR a dominios ricos en lípidos (Soldaini et al., 2003). La unión de EWI-2 a Filamina, que regula a su vez la dinámica de dominios ricos en lípidos, sugiere que dichos dominios sean TEM y no balsas lipídicas clásicas.

Por su parte, la α -Actinina se ha relacionado con la GTPasa RhoA (Quick and Skalli), ERK1/2 y la fosforilación de FAK (Craig et al., 2007b). Tanto α -Actinina-1 como α -Actinina-4 se fosforilan en tirosina después de la estimulación con EGF, requiriendo la activación de quinasas Src, p38-MAPK pero no MEK/ERK o Rac-1. (Shao et al.). La fosforilación de α -Actinina-1 en la tirosina 12 juega un papel crucial en la adhesión celular al facilitar el reclutamiento de Src y su consecuente asociación con FAK, activando su fosforilación (Craig et al., 2007a). En cuanto a la Sinapsis Inmune, α -Actinina interacciona con SPA-1, un GAP de Rap-1, que regularía la función de las integrinas en el proceso de activación de células T en respuesta a antígeno (Harazaki et al., 2004). En nuestro trabajo hemos demostrado la localización de α -Actinina en la zona de contacto entre la célula T y la CPA. Por tanto, a través de su interacción con los microdominios de tetraspaninas en la membrana plasmática, α -Actinina podría proveer la base molecular a la activación de FAK por tetraspaninas descrita en otros trabajos (Berditchevski and Odintsova, 1999). Sería interesante determinar la dinámica y la posible competición entre las asociaciones intracelulares de EWI-2 y CD81 con las distintas proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina.

Conexión directa de los dominios de tetraspaninas con la proteína adaptadora Sintenina-1. Función de esta proteína en los procesos de migración, polimerización de actina y activación de Rac.

El proceso de migración celular requiere del ensamblaje del citoesqueleto de actina en el frente de avance. Dicho ensamblaje se realiza gracias a proteínas que entrecruzan actina y regulan la señalización intracelular durante el proceso de migración celular. En dicho proceso, la GTPasa Rac se requiere para la polimerización de actina y la generación de protusiones de membrana en el frente de avance, mientras que Rho es necesaria para la retracción del urópodo celular. El papel de las proteínas ERM en la regulación de estas GTPasas ha sido previamente descrito (Ivetic and Ridley, 2004). En esta tesis se ha demostrado que la proteína PDZ Sintenina-1, incluida en los microdominios de tetraspaninas (Latysheva et al., 2006), participa también en la activación de la GTPasa Rac durante la quimiotaxis de linfocitos T. Así, Sintenina-1 es necesaria para la correcta polarización de la señalización vía Src que permite la translocación de Rac a la membrana y la consiguiente polimerización de actina.

Previamente ya se había descrito que Src se une directamente a Sintenina-1 (Boukerche et al., 2008). Además, Src actúa en paralelo con PI3K durante la quimiotaxis dirigida por la quimiocina CXCR2 en neutrófilos (Sai et al., 2008). Sin embargo en este trabajo presenta la primera evidencia de que Sintenina-1 presenta en su secuencia N-terminal motivos ITAM e ITIM funcionales en la activación con la quimiocina SDF-1 α .

La relación entre Src y Rac es compleja. La activación de Rac en respuesta a PDGF parece ser dependiente de la actividad de Src (Ouyang et al., 2008). Sin embargo, Src al activarse por PDGF no se polariza, mientras que la consecuente activación de Rac presenta una clara polaridad, localizándose en el frente de avance. Además, se puede inhibir la activación de Src dependiente de PDGF mediante la utilización de dominantes negativos de Rac (Ouyang et al., 2008). Estos datos sugieren la posibilidad de que la activación de Src tras estimulación con quimiocinas de lugar a una señal polarizada a través de la unión de Src con Sintenina-1. Por otra parte, la reducción de la expresión de Sintenina-1 no afecta a la fosforilación de las proteínas señalizadoras PLC- γ , ERK o Vav (señalización temprana), si bien la deficiente translocación de Rac a la membrana resulta en una deficiente polimerización de actina en respuesta a la quimiocina SDF-1 α .

Además, no sólo el silenciamiento de Sintenina-1 sino la mutación de sus dominios ITAM e ITIM afecta a ambos procesos, sugiriendo una regulación compleja de esta proteína PDZ. La mutación de la tirosina 4 situada en el motivo ITIM suprimió el efecto de la sobreexpresión de Sintenina-1 tanto en la migración como en la polimerización de actina. Sin embargo la mutación del motivo ITAM tuvo un efecto parcial sugiriendo pues que el balance y/o la fosforilación secuencial de las tirosinas pueden estar implicados en la activación de Rac y los efectos funcionales de esta activación. Como dato interesante en este apartado de la tesis, la construcción obtenida de la mutación de los cuatro residuos de tirosina del dominio N-terminal de la Sintenina-1 se comportó como un dominante negativo, bloqueando tanto la migración como la polimerización de actina. Este efecto se podría deber a un cambio conformacional del dominio o a una posible dimerización o secuestro de la proteína endógena. Este mutante además presentaba un efecto deletéreo sobre la viabilidad celular. Sin embargo, la mutación de estas tirosinas no afectó a la polarización subcelular de Sintenina-1, quizá porque su localización subcelular este regulada no por el dominio N-terminal sino por sus dos

dominios PDZ. En este sentido, cuando se transfectan construcciones que carecen de alguno de estos dominios se pierde el efecto potenciador de Sintenina-1 en la migración de células tumorales (Meerschaert et al., 2007).

Nuestros resultados revelan que el dominio ITIM de Sintenina es esencial para la unión a M-RIP. M-RIP se ha descrito como una molécula adaptadora esencial en la contractilidad mediada por Rho al unirse también a la subunidad de unión a miosina (MBS) de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (Mulder et al., 2004; Surks et al., 2003). El sitio de unión a Sintenina coincide con el dominio de unión a MBS de forma que la asociación Sintenina-1-M-RIP podría estar compitiendo con la asociación Miosina fosfatasa-M-RIP regulando dicho balance hacia Rac y por tanto, hacia la polimerización de actina *versus* contracción vía Rho. Por último, en células linfoides, hemos demostrado que M-RIP es capaz de asociarse a Rac, siendo así el nexo de unión molecular entre Src-Sintenina-1 y Rac.

El aumento/disminución de la migración tras sobreexpresión/silenciamiento de Sintenina-1 concuerda con los trabajos publicados en los que Sintenina-1 juega un papel en la malignidad de determinados cánceres. De hecho, Sintenina-1 (también llamada mda-9) está sobreexpresada en melanoma y cánceres de mama y estómago y parece activar mecanismos y señalizaciones específicas que activan los procesos metastáticos y de invasión de celular tumorales (Boukerche et al., 2005; Helmke et al., 2004; Koo et al., 2002; Sarkar et al., 2004). Las quimiocinas y sus receptores también están implicadas en estos procesos de malignización y metástasis (Ben-Baruch, 2006), aunque en conjunto con otros mecanismos (Bachelder et al., 2002; Li et al., 2004). Sería interesante, por tanto, estudiar los niveles de expresión de Sintenina-1 en procesos de malignización en el sistema hematopoiético. En este sentido, recientemente, un muestreo *in vivo* mediante ARNi ha demostrado que la GTPasa Rac2 y otros reguladores de actina son determinantes fundamentales en la progresión de linfomas (Harazaki et al., 2004)

Por último cabe destacar que Sintenina-1 se asocia también a la proteína Merlina, de la familia de las ERMs y a PIP₂ (Kang et al., 2003; Zimmermann et al., 2002), de manera que no solo se incluye en los microdominios de tetraspaninas por su asociación con la tetraspanina CD63, sino también por su posible inclusión en los complejos EWI-TM4 a través de su interacción con las proteínas adaptadoras estudiadas en esta tesis.

CONEXIONES ENTRE EL CITOESQUELETO Y LOS MICRODOMINIOS DE TETRASPANINAS Y POSIBLES VIAS DE SEÑALIZACIÓN

Con todo lo expuesto hasta el momento, podemos ampliar la Figura 5 de señalización a través de los microdominios de las tetraspaninas con nuevas conexiones a través de las proteínas adaptadoras y reguladoras del citoesqueleto ERM, Filamina-A, α -actinina y Sintenina-1.

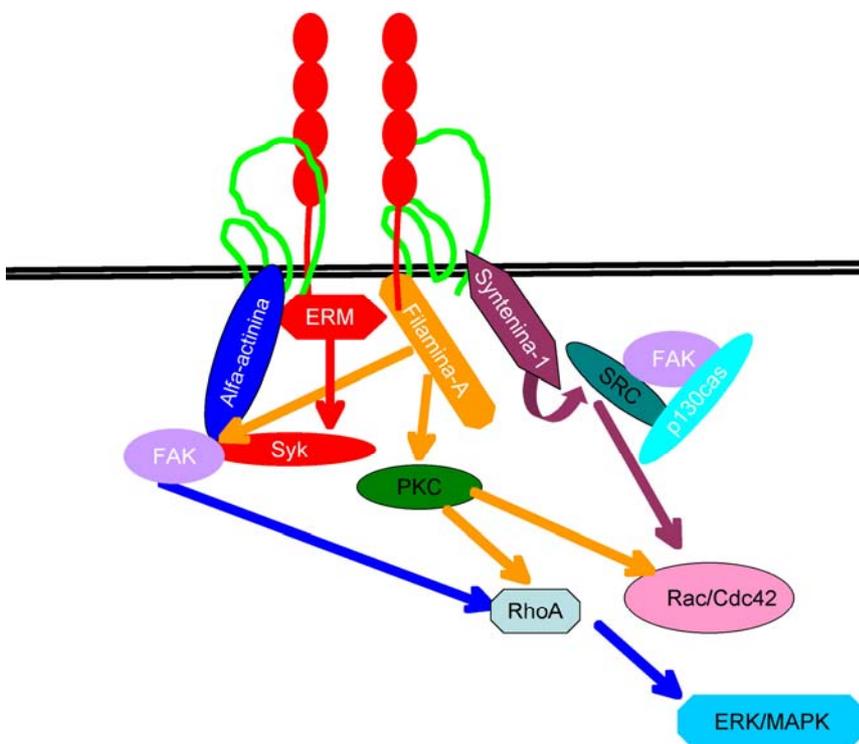


Figura 32: Nuevas conexiones de los microdominios de tetraspaninas con el citoesqueleto de actina y moléculas señalizadoras..

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) Las proteínas EWI-2 y EWI-F, incluidas en los microdominios de tetraspaninas por su unión a CD9, CD81 y CD151, colocalizan en el urópodo celular y estructuras apicales de linfocitos polarizados y células adherentes, respectivamente, con ERMs siendo estas últimas necesarias para dicha localización.
- 2) Los dominios C-terminal de EWI-2 y EWI-F interaccionan directamente con el dominio N-terminal de Ezrina y Moesina tal y como demuestran los experimentos de *pull down*, unión proteína-proteína y co-inmunoprecipitación.
- 3) Tanto el dominio C-terminal de CD81, como la proteína endógena, se asocian *in vitro* e *in vivo* a ERMs mientras que la asociación a CD9 parece ser indirecta probablemente a través de CD81.
- 4) El silenciamiento de EWI-2 aumenta la migración y polarización de linfocitos T. Este efecto se relaciona con un aumento de la fosforilación en treonina de las ERMs.
- 5) EWI-2 se localiza en el anillo central de la Sinapsis Inmune junto con CD81 y CD3. Además, actúa como molécula coestimuladora provocando un patrón de secreción de citoquinas diferente al de la coestimulación con CD28 en el que destaca la elevada producción de IL-6. El nivel de expresión de las proteínas EWI-2 y CD81 afecta a la producción de IL-2, de manera que el silenciamiento de EWI-2 y la sobreexpresión de un mutante que carece del dominio citoplásmico aumentan dicha secreción y la sobreexpresión de CD81 la disminuye.
- 6) Las proteínas de unión a actina Filamina-A y α -Actinina se asocian directamente a EWI-2 y CD81 tal y como demuestran las técnicas proteómicas y los ensayos de *pull down* con péptidos biotinilados que contienen las secuencias N-terminal de EWI-2 y CD81. Dicha asociación aumenta con la estimulación de los linfocitos con anticuerpos anti-CD3. Filamina-A y α -Actinina se localizan en

el anillo periférico de la zona de contacto entre la célula T y la célula presentadora de antígeno en presencia de SEE.

- 7) La proteína PDZ Sintenina-1 presenta una distribución polarizada en linfocitos estimulados con SDF-1 α observándose con mayor frecuencia en el frente de avance tras la estimulación.
- 8) La sobreexpresión de Sintenina-1 aumenta la quimiotaxis dirigida hacia la quimiocina SDF-1 α mientras que su silenciamiento la disminuye. Las células con menor expresión de Sintenina-1 también presentan una disminución de la polimerización de actina. Además, en estas células, la GTPasa Rac no es capaz de relocalizarse a la membrana plasmática.
- 9) La proteína Sintenina-1 se fosforila en Tirosina por quinasas de la familia Src. Su secuencia presenta 4 residuos de tirosina incluidos en un motivo ITAM y otro ITIM. La mutación del residuo incluido en el motivo ITIM (mutante Y1) elimina el efecto de la sobreexpresión de Sintenina-1. Dicho mutante, no es capaz de asociarse a la proteína que une RhoA, y la cadena ligera de la miosina fosfatasa, M-RIP.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B., J.A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 1996. *Biología Molecular de la Célula*. Omega. 595 pp.
- Amieva, M.R., P. Litman, L. Huang, E. Ichimaru, and H. Furthmayr. 1999. Disruption of dynamic cell surface architecture of NIH3T3 fibroblasts by the N-terminal domains of moesin and ezrin: in vivo imaging with GFP fusion proteins. *J Cell Sci*. 112 (Pt 1):111-25.
- Arduise, C., T. Abache, L. Li, M. Billard, A. Chabanon, A. Ludwig, P. Mauduit, C. Boucheix, E. Rubinstein, and F. Le Naour. 2008. Tetraspanins regulate ADAM10-mediated cleavage of TNF-alpha and epidermal growth factor. *J Immunol*. 181:7002-13.
- Bachelder, R.E., M.A. Wendt, and A.M. Mercurio. 2002. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res*. 62:7203-6.
- Barreiro, O., M. Yanez-Mo, M. Sala-Valdes, M.D. Gutierrez-Lopez, S. Ovalle, A. Higginbottom, P.N. Monk, C. Cabanas, and F. Sanchez-Madrid. 2005. Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood*. 105:2852-61.
- Barreiro, O., M. Yanez-Mo, J.M. Serrador, M.C. Montoya, M. Vicente-Manzanares, R. Tejedor, H. Furthmayr, and F. Sanchez-Madrid. 2002. Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J Cell Biol*. 157:1233-45.
- Barreiro, O., M. Zamai, M. Yanez-Mo, E. Tejera, P. Lopez-Romero, P.N. Monk, E. Gratton, V.R. Caiolfa, and F. Sanchez-Madrid. 2008. Endothelial adhesion receptors are recruited to adherent leukocytes by inclusion in preformed tetraspanin nanoplateforms. *J Cell Biol*. 183:527-42.
- Barrero-Villar, M., J.R. Cabrero, M. Gordon-Alonso, J. Barroso-Gonzalez, S. Alvarez-Losada, M.A. Munoz-Fernandez, F. Sanchez-Madrid, and A. Valenzuela-Fernandez. 2009. Moesin is required for HIV-1-induced CD4-CXCR4 interaction, F-actin redistribution, membrane fusion and viral infection in lymphocytes. *J Cell Sci*. 122:103-13.
- Bellanger, J.M., C. Astier, C. Sardet, Y. Ohta, T.P. Stossel, and A. Debant. 2000. The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat Cell Biol*. 2:888-92.
- Ben-Baruch, A. 2006. The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev*. 25:357-71.
- Berdichevski, F. 2001. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci*. 114:4143-51.
- Berdichevski, F., and E. Odintsova. 1999. Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol*. 146:477-92.
- Boucheix, C., and E. Rubinstein. 2001. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci*. 58:1189-205.
- Boukerche, H., Z.Z. Su, L. Emdad, P. Baril, B. Balme, L. Thomas, A. Randolph, K. Valerie, D. Sarkar, and P.B. Fisher. 2005. mda-9/Syntenin: a positive regulator of melanoma metastasis. *Cancer Res*. 65:10901-11.
- Boukerche, H., Z.Z. Su, L. Emdad, D. Sarkar, and P.B. Fisher. 2007. mda-9/Syntenin regulates the metastatic phenotype in human melanoma cells by activating nuclear factor-kappaB. *Cancer Res*. 67:1812-22.

- Boukerche, H., Z.Z. Su, C. Prevot, D. Sarkar, and P.B. Fisher. 2008. mda-9/Syntenin promotes metastasis in human melanoma cells by activating c-Src. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:15914-9.
- Calderwood, D.A., A. Huttenlocher, W.B. Kiosses, D.M. Rose, D.G. Woodside, M.A. Schwartz, and M.H. Ginsberg. 2001. Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat Cell Biol*. 3:1060-8.
- Calderwood, S.K., S.S. Mambula, and P.J. Gray, Jr. 2007. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann N Y Acad Sci*. 1113:28-39.
- Carloni, V., A. Mazzocca, and K.S. Ravichandran. 2004. Tetraspanin CD81 is linked to ERK/MAPKinase signaling by Shc in liver tumor cells. *Oncogene*. 23:1566-74.
- Carpen, O., P. Pallai, D.E. Staunton, and T.A. Springer. 1992. Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and alpha-actinin. *J Cell Biol*. 118:1223-34.
- Charrin, S., F. Le Naour, V. Labas, M. Billard, J.P. Le Caer, J.F. Emile, M.A. Petit, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2003. EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochem J*. 373:409-21.
- Charrin, S., S. Manie, M. Oualid, M. Billard, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2002. Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Lett*. 516:139-44.
- Charrin, S., S. Yalaoui, B. Bartosch, L. Cocquerel, J.F. Franetich, C. Boucheix, D. Mazier, E. Rubinstein, and O. Silvie. 2009. The Ig domain protein CD9P-1 down-regulates CD81 ability to support Plasmodium yoelii infection. *J Biol Chem*. 284:31572-8.
- Chatterjee, N., J. Stegmuller, P. Schatzle, K. Karram, M. Koroll, H.B. Werner, K.A. Nave, and J. Trotter. 2008. Interaction of syntenin-1 and the NG2 proteoglycan in migratory oligodendrocyte precursor cells. *J Biol Chem*. 283:8310-7.
- Clark, K.L., A. Oelke, M.E. Johnson, K.D. Eilert, P.C. Simpson, and S.C. Todd. 2004. CD81 associates with 14-3-3 in a redox-regulated palmitoylation-dependent manner. *J Biol Chem*. 279:19401-6.
- Coffey, G.P., R. Rajapaksa, R. Liu, O. Sharpe, C.C. Kuo, S.W. Krauss, Y. Sagi, R.E. Davis, L.M. Staudt, J.P. Sharman, W.H. Robinson, and S. Levy. 2009. Engagement of CD81 induces ezrin tyrosine phosphorylation and its cellular redistribution with filamentous actin. *J Cell Sci*. 122:3137-44.
- Craig, D.H., B. Haimovich, and M.D. Basson. 2007a. Alpha-actinin-1 phosphorylation modulates pressure-induced colon cancer cell adhesion through regulation of focal adhesion kinase-Src interaction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 293:C1862-74.
- Craig, D.H., J. Zhang, and M.D. Basson. 2007b. Cytoskeletal signaling by way of alpha-actinin-1 mediates ERK1/2 activation by repetitive deformation in human Caco2 intestinal epithelial cells. *Am J Surg*. 194:618-22.
- Danielli, J., and H. Davson. 1935. A contribution to the theory of permeability of thin films. *In J. Cell. Comp. Physiol*. Vol. 5.
- Delaguillaumie, A., C. Lagaudriere-Gesbert, M.R. Popoff, and H. Conjeaud. 2002. Rho GTPases link cytoskeletal rearrangements and activation processes induced via the tetraspanin CD82 in T lymphocytes. *J Cell Sci*. 115:433-43.
- Deneka, M., A. Pelchen-Matthews, R. Byland, E. Ruiz-Mateos, and M. Marsh. 2007. In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J Cell Biol*. 177:329-41.
- Douglass, A.D., and R.D. Vale. 2005. Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell*. 121:937-50.

- Evans, M.J., T. von Hahn, D.M. Tscherne, A.J. Syder, M. Panis, B. Wolk, T. Hatzioannou, J.A. McKeating, P.D. Bieniasz, and C.M. Rice. 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*. 446:801-5.
- Fearon, D.T. 1993. The CD19-CR2-TAPA-1 complex, CD45 and signaling by the antigen receptor of B lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 5:341-8.
- Feigelson, S.W., V. Grabovsky, R. Shamri, S. Levy, and R. Alon. 2003. The CD81 tetraspanin facilitates instantaneous leukocyte VLA-4 adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) under shear flow. *J Biol Chem*. 278:51203-12.
- Feng, Y., and C.A. Walsh. 2004. The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat Cell Biol*. 6:1034-8.
- Garcia, E., D.S. Nikolic, and V. Piguet. 2008. HIV-1 replication in dendritic cells occurs through a tetraspanin-containing compartment enriched in AP-3. *Traffic*. 9:200-14.
- Garcia, E., M. Pion, A. Pelchen-Matthews, L. Collinson, J.F. Arrighi, G. Blot, F. Leuba, J.M. Escola, N. Demaurex, M. Marsh, and V. Piguet. 2005. HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic*. 6:488-501.
- Gebbink, M.F., O. Kranenburg, M. Poland, F.P. van Horck, B. Houssa, and W.H. Moolenaar. 1997. Identification of a novel, putative Rho-specific GDP/GTP exchange factor and a RhoA-binding protein: control of neuronal morphology. *J Cell Biol*. 137:1603-13.
- Gesierich, S., I. Berezovskiy, E. Ryschich, and M. Zoller. 2006. Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6.1A/CO-029. *Cancer Res*. 66:7083-94.
- Gimferrer, I., A. Ibanez, M. Farnos, M.R. Sarrias, R. Fenutria, S. Rosello, P. Zimmermann, G. David, J. Vives, C. Serra-Pages, and F. Lozano. 2005. The Lymphocyte Receptor CD6 Interacts with Syntenin-1, a Scaffolding Protein Containing PDZ Domains. *J Immunol*. 175:1406-1414.
- Glazar, A.I., and J.P. Evans. 2009. Immunoglobulin superfamily member IgSF8 (EWI-2) and CD9 in fertilisation: evidence of distinct functions for CD9 and a CD9-associated protein in mammalian sperm-egg interaction. *Reprod Fertil Dev*. 21:293-303.
- Gordon-Alonso, M., M. Yanez-Mo, O. Barreiro, S. Alvarez, M.A. Munoz-Fernandez, A. Valenzuela-Fernandez, and F. Sanchez-Madrid. 2006. Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion. *J Immunol*. 177:5129-37.
- Grigorov, B., V. Attuil-Audenis, F. Perugi, M. Nedelec, S. Watson, C. Pique, J.L. Darlix, H. Conjeaud, and D. Muriaux. 2009. A role for CD81 on the late steps of HIV-1 replication in a chronically infected T cell line. *Retrovirology*. 6:28.
- Harazaki, M., Y. Kawai, L. Su, Y. Hamazaki, T. Nakahata, N. Minato, and M. Hattori. 2004. Specific recruitment of SPA-1 to the immunological synapse: involvement of actin-bundling protein actinin. *Immunol Lett*. 92:221-6.
- Harris, H.J., M.J. Farquhar, C.J. Mee, C. Davis, G.M. Reynolds, A. Jennings, K. Hu, F. Yuan, H. Deng, S.G. Hubscher, J.H. Han, P. Balfe, and J.A. McKeating. 2008. CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol*. 82:5007-20.
- Hayashi, K., and A. Altman. 2006. Filamin A is required for T cell activation mediated by protein kinase C-theta. *J Immunol*. 177:1721-8.

- He, Z.Y., S. Gupta, D. Myles, and P. Primakoff. 2009. Loss of surface EWI-2 on CD9 null oocytes. *Mol Reprod Dev.* 76:629-36.
- Heiska, L., C. Kantor, T. Parr, D.R. Critchley, P. Vilja, C.G. Gahmberg, and O. Carpen. 1996. Binding of the cytoplasmic domain of intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) to alpha-actinin. *J Biol Chem.* 271:26214-9.
- Helmke, B.M., M. Polychronidis, A. Benner, M. Thome, J. Arribas, and M. Deichmann. 2004. Melanoma metastasis is associated with enhanced expression of the syntenin gene. *Oncol Rep.* 12:221-8.
- Hemler, M.E. 2003. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 19:397-422.
- Hemler, M.E. 2005. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:801-11.
- Ho, S.H., F. Martin, A. Higginbottom, L.J. Partridge, V. Parthasarathy, G.W. Moseley, P. Lopez, C. Cheng-Mayer, and P.N. Monk. 2006. Recombinant extracellular domains of tetraspanin proteins are potent inhibitors of the infection of macrophages by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 80:6487-96.
- Ilani, T., C. Khanna, M. Zhou, T.D. Veenstra, and A. Bretscher. 2007. Immune synapse formation requires ZAP-70 recruitment by ezrin and CD43 removal by moesin. *J Cell Biol.* 179:733-46.
- Imai, T., M. Kakizaki, M. Nishimura, and O. Yoshie. 1995. Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82. *J Immunol.* 155:1229-39.
- Imhof, I., W.J. Gasper, and R. Derynck. 2008. Association of tetraspanin CD9 with transmembrane TGF{alpha} confers alterations in cell-surface presentation of TGF{alpha} and cytoskeletal organization. *J Cell Sci.* 121:2265-74.
- Inoue, N., M. Ikawa, A. Isotani, and M. Okabe. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature.* 434:234-8.
- Ivetic, A., and A.J. Ridley. 2004. Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology.* 112:165-76.
- Izquierdo-Useros, N., M. Naranjo-Gomez, J. Archer, S.C. Hatch, I. Erkizia, J. Blanco, F.E. Borrás, M.C. Puertas, J.H. Connor, M.T. Fernandez-Figueras, L. Moore, B. Clotet, S. Gummuluru, and J. Martinez-Picado. 2009. Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood.* 113:2732-41.
- Jimenez-Baranda, S., C. Gomez-Mouton, A. Rojas, L. Martinez-Prats, E. Mira, R. Ana Lacalle, A. Valencia, D.S. Dimitrov, A. Viola, R. Delgado, A.C. Martinez, and S. Manes. 2007. Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors. *Nat Cell Biol.* 9:838-46.
- Johnson, J.L., N. Winterwood, K.A. DeMali, and C.S. Stipp. 2009. Tetraspanin CD151 regulates RhoA activation and the dynamic stability of carcinoma cell-cell contacts. *J Cell Sci.* 122:2263-73.
- Jolly, C., and Q.J. Sattentau. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *J Virol.* 81:7873-84.
- Jung, K.K., X.W. Liu, R. Chirco, R. Fridman, and H.R. Kim. 2006. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J.* 25:3934-42.
- Kaji, K., S. Oda, S. Miyazaki, and A. Kudo. 2002. Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81; polyadenylated

- mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. *Dev Biol.* 247:327-34.
- Kang, B.S., D.R. Cooper, F. Jelen, Y. Devedjiev, U. Derewenda, Z. Dauter, J. Otlewski, and Z.S. Derewenda. 2003. PDZ tandem of human syntenin: crystal structure and functional properties. *Structure.* 11:459-68.
- Kapadia, S.B., H. Barth, T. Baumert, J.A. McKeating, and F.V. Chisari. 2007. Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *J Virol.* 81:374-83.
- Kawano, Y., Y. Fukata, N. Oshiro, M. Amano, T. Nakamura, M. Ito, F. Matsumura, M. Inagaki, and K. Kaibuchi. 1999. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol.* 147:1023-38.
- Kettner, S., F. Kalthoff, P. Graf, E. Priller, F. Kricek, I. Lindley, and T. Schweighoffer. 2007. EWI-2/CD316 is an inducible receptor of HSPA8 on human dendritic cells. *Mol Cell Biol.* 27:7718-26.
- Kiema, T., Y. Lad, P. Jiang, C.L. Oxley, M. Baldassarre, K.L. Wegener, I.D. Campbell, J. Ylanne, and D.A. Calderwood. 2006. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol Cell.* 21:337-47.
- Kitadokoro, K., D. Bordo, G. Galli, R. Petracca, F. Falugi, S. Abrignani, G. Grandi, and M. Bolognesi. 2001. CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J.* 20:12-8.
- Koga, T., M. Awai, J. Tsutsui, B.Y. Yue, and H. Tanihara. 2006. Rho-associated protein kinase inhibitor, Y-27632, induces alterations in adhesion, contraction and motility in cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res.* 82:362-70.
- Kolesnikova, T.V., C.S. Stipp, R.M. Rao, W.S. Lane, F.W. Luscinskas, and M.E. Hemler. 2004. EWI-2 modulates lymphocyte integrin alpha4beta1 functions. *Blood.* 103:3013-9.
- Komorowski, S., B. Baranowska, and M. Maleszewski. 2006. CD9 protein appears on growing mouse oocytes at the time when they develop the ability to fuse with spermatozoa. *Zygote.* 14:119-23.
- Koo, T.H., J.J. Lee, E.M. Kim, K.W. Kim, H.D. Kim, and J.H. Lee. 2002. Syntenin is overexpressed and promotes cell migration in metastatic human breast and gastric cancer cell lines. *Oncogene.* 21:4080-8.
- Kovalenko, O.V., X.H. Yang, and M.E. Hemler. 2007. A novel cysteine cross-linking method reveals a direct association between claudin-1 and tetraspanin CD9. *Mol Cell Proteomics.* 6:1855-67.
- Kramer, B., D. Schulte, C. Korner, C. Zwank, A. Hartmann, M. Michalk, J. Sohne, B. Langhans, H.D. Nischalke, M. Coenen, C. Mohl, A. Vogt, M. Hennenberg, T. Sauerbruch, U. Spengler, and J. Nattermann. 2009. Regulation of NK cell trafficking by CD81. *Eur J Immunol.* 39:3447-58.
- Krementsov, D.N., J. Weng, M. Lambele, N.H. Roy, and M. Thali. 2009. Tetraspanins regulate cell-to-cell transmission of HIV-1. *Retrovirology.* 6:64.
- Kropshofer, H., S. Spindeldreher, T.A. Rohn, N. Platania, C. Grygar, N. Daniel, A. Wolpl, H. Langen, V. Horejsi, and A.B. Vogt. 2002. Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes. *Nat Immunol.* 3:61-8.
- Kuhn, S., M. Koch, T. Nubel, M. Ladwein, D. Antolovic, P. Klingbeil, D. Hildebrand, G. Moldenhauer, L. Langbein, W.W. Franke, J. Weitz, and M. Zoller. 2007. A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res.* 5:553-67.

- Ladwein, M., U.F. Pape, D.S. Schmidt, M. Schnolzer, S. Fiedler, L. Langbein, W.W. Franke, G. Moldenhauer, and M. Zoller. 2005. The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res.* 309:345-57.
- Lafleur, M.A., D. Xu, and M.E. Hemler. 2009. Tetraspanin proteins regulate membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent pericellular proteolysis. *Mol Biol Cell.* 20:2030-40.
- Lagaudriere-Gesbert, C., S. Lebel-Binay, C. Hubeau, D. Fradelizi, and H. Conjeaud. 1998. Signaling through the tetraspanin CD82 triggers its association with the cytoskeleton leading to sustained morphological changes and T cell activation. *Eur J Immunol.* 28:4332-44.
- Latysheva, N., G. Muratov, S. Rajesh, M. Padgett, N.A. Hotchin, M. Overduin, and F. Berditchevski. 2006. Syntenin-1 is a new component of tetraspanin-enriched microdomains: mechanisms and consequences of the interaction of syntenin-1 with CD63. *Mol Cell Biol.* 26:7707-18.
- Le Naour, F., M. Andre, C. Boucheix, and E. Rubinstein. 2006. Membrane microdomains and proteomics: lessons from tetraspanin microdomains and comparison with lipid rafts. *Proteomics.* 6:6447-54.
- Le Naour, F., E. Rubinstein, C. Jasmin, M. Prenant, and C. Boucheix. 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science.* 287:319-21.
- Le Naour, F., and M. Zoller. 2008. The tumor antigen EpCAM: tetraspanins and the tight junction protein claudin-7, new partners, new functions. *Front Biosci.* 13:5847-65.
- Lee, J.H., T. Katakai, T. Hara, H. Gonda, M. Sugai, and A. Shimizu. 2004. Roles of p-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation. *J Cell Biol.* 167:327-37.
- Legg, J.W., and C.M. Isacke. 1998. Identification and functional analysis of the ezrin-binding site in the hyaluronan receptor, CD44. *Curr Biol.* 8:705-8.
- Lekishvili, T., E. Fromm, M. Mujoomdar, and F. Berditchevski. 2008. The tumour-associated antigen L6 (L6-Ag) is recruited to the tetraspanin-enriched microdomains: implication for tumour cell motility. *J Cell Sci.* 121:685-94.
- Leung, R., Y. Wang, K. Cuddy, C. Sun, J. Magalhaes, M. Grynopas, and M. Glogauer. 2009. Filamin A Regulates Monocyte Migration Through Rho Small GTPases During Osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.*
- Levy, S., and T. Shoham. 2005. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol.* 5:136-48.
- Levy, S., S.C. Todd, and H.T. Maecker. 1998. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 16:89-109.
- Li, Y.M., Y. Pan, Y. Wei, X. Cheng, B.P. Zhou, M. Tan, X. Zhou, W. Xia, G.N. Hortobagyi, D. Yu, and M.C. Hung. 2004. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell.* 6:459-69.
- Liu, L., B. He, W.M. Liu, D. Zhou, J.V. Cox, and X.A. Zhang. 2007. Tetraspanin CD151 promotes cell migration by regulating integrin trafficking. *J Biol Chem.* 282:31631-42.
- Liu, W.M., and X.A. Zhang. 2006. KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor. *Cancer Lett.* 240:183-94.
- Longo, N., M. Yanez-Mo, M. Mittelbrunn, G. de la Rosa, M.L. Munoz, F. Sanchez-Madrid, and P. Sanchez-Mateos. 2001. Regulatory role of tetraspanin CD9 in

- tumor-endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells. *Blood*. 98:3717-26.
- Louvet-Vallee, S. 2000. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol Cell*. 92:305-16.
- Ludford-Menting, M.J., J. Oliaro, F. Sacirbegovic, E.T. Cheah, N. Pedersen, S.J. Thomas, A. Pasam, R. Iazzolino, L.E. Dow, N.J. Waterhouse, A. Murphy, S. Ellis, M.J. Smyth, M.H. Kershaw, P.K. Darcy, P.O. Humbert, and S.M. Russell. 2005. A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity*. 22:737-48.
- Maecker, H.T. 2003. Human CD81 directly enhances Th1 and Th2 cell activation, but preferentially induces proliferation of Th2 cells upon long-term stimulation. *BMC Immunol*. 4:1.
- Mahbub Hasan, A.K., Z. Ou, K. Sakakibara, S. Hirahara, T. Iwasaki, K. Sato, and Y. Fukami. 2007. Characterization of *Xenopus* egg membrane microdomains containing uroplakin Ib/III complex: roles of their molecular interactions for subcellular localization and signal transduction. *Genes Cells*. 12:251-67.
- Mammoto, A., S. Huang, and D.E. Ingber. 2007. Filamin links cell shape and cytoskeletal structure to Rho regulation by controlling accumulation of p190RhoGAP in lipid rafts. *J Cell Sci*. 120:456-67.
- Martinez-Bartolome, S., P. Navarro, F. Martin-Maroto, D. Lopez-Ferrer, A. Ramos-Fernandez, M. Villar, J.P. Garcia-Ruiz, and J. Vazquez. 2008. Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method. *Mol Cell Proteomics*. 7:1135-45.
- Masciopinto, F., S. Campagnoli, S. Abrignani, Y. Uematsu, and P. Pileri. 2001. The small extracellular loop of CD81 is necessary for optimal surface expression of the large loop, a putative HCV receptor. *Virus Res*. 80:1-10.
- Mazurov, D., G. Heidecker, and D. Derse. 2006. HTLV-1 Gag protein associates with CD82 tetraspanin microdomains at the plasma membrane. *Virology*. 346:194-204.
- Mazurov, D., G. Heidecker, and D. Derse. 2007. The inner loop of tetraspanins CD82 and CD81 mediates interactions with human T cell lymphotropic virus type 1 Gag protein. *J Biol Chem*. 282:3896-903.
- Mazzocca, A., F. Liotta, and V. Carloni. 2008. Tetraspanin CD81-regulated cell motility plays a critical role in intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 135:244-256 e1.
- McGrath, J.L. 2006. Cell mechanics: filaminA leads the way. *Curr Biol*. 16:R326-7.
- Meerschaert, K., E. Bruyneel, O. De Wever, B. Vanloo, C. Boucherie, M. Bracke, J. Vandekerckhove, and J. Gettemans. 2007. The tandem PDZ domains of syntenin promote cell invasion. *Exp Cell Res*. 313:1790-804.
- Meller, N., Y.C. Liu, T.L. Collins, N. Bonnefoy-Berard, G. Baier, N. Isakov, and A. Altman. 1996. Direct interaction between protein kinase C theta (PKC theta) and 14-3-3 tau in T cells: 14-3-3 overexpression results in inhibition of PKC theta translocation and function. *Mol Cell Biol*. 16:5782-91.
- Meuleman, P., J. Hesselgesser, M. Paulson, T. Vanwolleghem, I. Desombere, H. Reiser, and G. Leroux-Roels. 2008. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection in vivo. *Hepatology*. 48:1761-8.
- Miller, B.J., E. Georges-Labouesse, P. Primakoff, and D.G. Myles. 2000. Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 and is CD9-dependent. *J Cell Biol*. 149:1289-96.

- Mittelbrunn, M., G. Martinez del Hoyo, M. Lopez-Bravo, N.B. Martin-Cofreces, A. Scholer, S. Hugues, L. Fetler, S. Amigorena, C. Ardavin, and F. Sanchez-Madrid. 2009. Imaging of plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells. *Blood*. 113:75-84.
- Mittelbrunn, M., M. Yanez-Mo, D. Sancho, A. Ursa, and F. Sanchez-Madrid. 2002. Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. *J Immunol*. 169:6691-5.
- Miyado, K., E. Mekada, and K. Kobayashi. 2000. [A crucial role of tetraspanin, CD9 in fertilization]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 45:1728-34.
- Morelli, A.E., A.T. Larregina, W.J. Shufesky, M.L. Sullivan, D.B. Stolz, G.D. Papworth, A.F. Zahorchak, A.J. Logar, Z. Wang, S.C. Watkins, L.D. Falo, Jr., and A.W. Thomson. 2004. Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*. 104:3257-66.
- Mulder, J., A. Ariaens, D. van den Boomen, and W.H. Moolenaar. 2004. p116Rip targets myosin phosphatase to the actin cytoskeleton and is essential for RhoA/ROCK-regulated neuriteogenesis. *Mol Biol Cell*. 15:5516-27.
- Munoz, P., M. Mittelbrunn, H. de la Fuente, M. Perez-Martinez, A. Garcia-Perez, A. Ariza-Veguillas, F. Malavasi, M. Zubiaur, F. Sanchez-Madrid, and J. Sancho. 2008. Antigen-induced clustering of surface CD38 and recruitment of intracellular CD38 to the immunologic synapse. *Blood*. 111:3653-64.
- Nakamura, H., and H. Ozawa. 1996. Immunolocalization of CD44 and the ERM family in bone cells of mouse tibiae. *J Bone Miner Res*. 11:1715-22.
- Nakamura, N., N. Oshiro, Y. Fukata, M. Amano, M. Fukata, S. Kuroda, Y. Matsuura, T. Leung, L. Lim, and K. Kaibuchi. 2000. Phosphorylation of ERM proteins at filopodia induced by Cdc42. *Genes Cells*. 5:571-81.
- Nazarenko, I., S. Rana, A. Baumann, J. McAlear, A. Hellwig, M. Trendelenburg, G. Lochnit, K.T. Preissner, and M. Zoller. Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res*. 70:1668-78.
- Nurmi, S.M., C.G. Gahmberg, and S.C. Fagerholm. 2006. 14-3-3 proteins bind both filamin and alphaLbeta2 integrin in activated T cells. *Ann N Y Acad Sci*. 1090:318-25.
- Nydegger, S., S. Khurana, D.N. Krementsov, M. Foti, and M. Thali. 2006. Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J Cell Biol*. 173:795-807.
- Odintsova, E., T. Sugiura, and F. Berditchevski. 2000. Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr Biol*. 10:1009-12.
- Ohta, Y., J.H. Hartwig, and T.P. Stossel. 2006. FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat Cell Biol*. 8:803-14.
- Otey, C.A., F.M. Pavalko, and K. Burridge. 1990. An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol*. 111:721-9.
- Ouyang, M., J. Sun, S. Chien, and Y. Wang. 2008. Determination of hierarchical relationship of Src and Rac at subcellular locations with FRET biosensors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:14353-8.
- Ovalle, S., M.D. Gutierrez-Lopez, N. Olmo, J. Turnay, M.A. Lizarbe, P. Majano, F. Molina-Jimenez, M. Lopez-Cabrera, M. Yanez-Mo, F. Sanchez-Madrid, and C. Cabanas. 2007. The tetraspanin CD9 inhibits the proliferation and tumorigenicity of human colon carcinoma cells. *Int J Cancer*. 121:2140-52.

- Pavalko, F.M., and S.M. LaRoche. 1993. Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD18) and the actin binding protein alpha-actinin. *J Immunol.* 151:3795-807.
- Pavalko, F.M., C.A. Otey, K.O. Simon, and K. Burridge. 1991. Alpha-actinin: a direct link between actin and integrins. *Biochem Soc Trans.* 19:1065-9.
- Pollard, T.D. 2003. The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature.* 422:741-5.
- Poloso, N.J., L.K. Denzin, and P.A. Roche. 2006. CDw78 defines MHC class II-peptide complexes that require Ii chain-dependent lysosomal trafficking, not localization to a specific tetraspanin membrane microdomain. *J Immunol.* 177:5451-8.
- Qi, J.C., J. Wang, S. Mandadi, K. Tanaka, B.D. Roufogalis, M.C. Madigan, K. Lai, F. Yan, B.H. Chong, R.L. Stevens, and S.A. Krilis. 2006. Human and mouse mast cells use the tetraspanin CD9 as an alternate interleukin-16 receptor. *Blood.* 107:135-42.
- Quick, Q., and O. Skalli. Alpha-actinin 1 and alpha-actinin 4: contrasting roles in the survival, motility, and RhoA signaling of astrocytoma cells. *Exp Cell Res.* 316:1137-47.
- Rocha-Perugini, V., M. Lavie, D. Delgrange, J. Canton, A. Pillez, J. Potel, C. Lecoeur, E. Rubinstein, J. Dubuisson, C. Wychowski, and L. Cocquerel. 2009. The association of CD81 with tetraspanin-enriched microdomains is not essential for Hepatitis C virus entry. *BMC Microbiol.* 9:111.
- Rocha-Perugini, V., C. Montpellier, D. Delgrange, C. Wychowski, F. Helle, A. Pillez, H. Drobecq, F. Le Naour, S. Charrin, S. Levy, E. Rubinstein, J. Dubuisson, and L. Cocquerel. 2008. The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS One.* 3:e1866.
- Rosa, D., G. Saletti, E. De Gregorio, F. Zorat, C. Comar, U. D'Oro, S. Nuti, M. Houghton, V. Barnaba, G. Pozzato, and S. Abrignani. 2005. Activation of naive B lymphocytes via CD81, a pathogenetic mechanism for hepatitis C virus-associated B lymphocyte disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:18544-9.
- Rous, B.A., B.J. Reaves, G. Ihrke, J.A. Briggs, S.R. Gray, D.J. Stephens, G. Banting, and J.P. Luzio. 2002. Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell.* 13:1071-82.
- Rubinstein, E., F. Le Naour, C. Lagaudriere-Gesbert, M. Billard, H. Conjeaud, and C. Boucheix. 1996. CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol.* 26:2657-65.
- Rubinstein, E., A. Ziyat, M. Prenant, E. Wrobel, J.P. Wolf, S. Levy, F. Le Naour, and C. Boucheix. 2006. Reduced fertility of female mice lacking CD81. *Dev Biol.* 290:351-8.
- Ruiz-Mateos, E., A. Pelchen-Matthews, M. Deneka, and M. Marsh. 2008. CD63 is not required for production of infectious human immunodeficiency virus type 1 in human macrophages. *J Virol.* 82:4751-61.
- Sai, J., D. Raman, Y. Liu, J. Wikswa, and A. Richmond. 2008. Parallel phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-dependent and Src-dependent pathways lead to CXCL8-mediated Rac2 activation and chemotaxis. *J Biol Chem.* 283:26538-47.
- Sala-Valdes, M., A. Ursa, S. Charrin, E. Rubinstein, M.E. Hemler, F. Sanchez-Madrid, and M. Yanez-Mo. 2006. EWI-2 and EWI-F Link the Tetraspanin Web to the Actin Cytoskeleton through Their Direct Association with Ezrin-Radixin-Moesin Proteins. *J Biol Chem.* 281:19665-75.

- Sanchez-Madrid, F., and M.A. del Pozo. 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 18:501-11.
- Sarkar, D., H. Boukerche, Z.Z. Su, and P.B. Fisher. 2004. mda-9/syntenin: recent insights into a novel cell signaling and metastasis-associated gene. *Pharmacol Ther.* 104:101-15.
- Sato, K., J. Aoki, N. Misawa, E. Daikoku, K. Sano, Y. Tanaka, and Y. Koyanagi. 2008. Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J Virol.* 82:1021-33.
- Sawada, S., M. Yoshimoto, E. Odintsova, N.A. Hotchin, and F. Berditchevski. 2003. The tetraspanin CD151 functions as a negative regulator in the adhesion-dependent activation of Ras. *J Biol Chem.* 278:26323-6.
- Scherberich, A., G. Giannone, E. Perennou, K. Takeda, C. Boucheix, E. Rubinstein, F. Lanza, and A. Beretz. 2002. FAK-mediated inhibition of vascular smooth muscle cell migration by the tetraspanin CD9. *Thromb Haemost.* 87:1043-50.
- Schmidt, A., and M.N. Hall. 1998. Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14:305-38.
- Sechi, A.S., and J. Wehland. 2000. The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci.* 113 Pt 21:3685-95.
- Serrador, J.M., J.L. Alonso-Lebrero, M.A. del Pozo, H. Furthmayr, R. Schwartz-Albiez, J. Calvo, F. Lozano, and F. Sanchez-Madrid. 1997. Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *J Cell Biol.* 138:1409-23.
- Serrador, J.M., M. Nieto, J.L. Alonso-Lebrero, M.A. del Pozo, J. Calvo, H. Furthmayr, R. Schwartz-Albiez, F. Lozano, R. Gonzalez-Amaro, P. Sanchez-Mateos, and F. Sanchez-Madrid. 1998. CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood.* 91:4632-44.
- Serrador, J.M., A. Urzainqui, J.L. Alonso-Lebrero, J.R. Cabrero, M.C. Montoya, M. Vicente-Manzanares, M. Yanez-Mo, and F. Sanchez-Madrid. 2002a. A juxta-membrane amino acid sequence of P-selectin glycoprotein ligand-1 is involved in moesin binding and ezrin/radixin/moesin-directed targeting at the trailing edge of migrating lymphocytes. *Eur J Immunol.* 32:1560-6.
- Serrador, J.M., M. Vicente-Manzanares, J. Calvo, O. Barreiro, M.C. Montoya, R. Schwartz-Albiez, H. Furthmayr, F. Lozano, and F. Sanchez-Madrid. 2002b. A novel serine-rich motif in the intercellular adhesion molecule 3 is critical for its ezrin/radixin/moesin-directed subcellular targeting. *J Biol Chem.* 277:10400-9.
- Shaffer, M.H., R.S. Dupree, P. Zhu, I. Saotome, R.F. Schmidt, A.I. McClatchey, B.D. Freedman, and J.K. Burkhardt. 2009. Ezrin and moesin function together to promote T cell activation. *J Immunol.* 182:1021-32.
- Shao, H., C. Wu, and A. Wells. Phosphorylation of alpha-actinin 4 upon epidermal growth factor exposure regulates its interaction with actin. *J Biol Chem.* 285:2591-600.
- Sheng, K.C., A.B. van Spriel, K.H. Gartlan, M. Sofi, V. Apostolopoulos, L. Ashman, and M.D. Wright. 2009. Tetraspanins CD37 and CD151 differentially regulate Ag presentation and T-cell co-stimulation by DC. *Eur J Immunol.* 39:50-5.
- Shi, W., H. Fan, L. Shum, and R. Derynck. 2000. The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF-alpha and regulates TGF-alpha-induced EGF receptor activation and cell proliferation. *J Cell Biol.* 148:591-602.

- Shigeta, M., N. Sanzen, M. Ozawa, J. Gu, H. Hasegawa, and K. Sekiguchi. 2003. CD151 regulates epithelial cell-cell adhesion through PKC- and Cdc42-dependent actin cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol.* 163:165-76.
- Silverstein, R.L., and M. Febbraio. 2009. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal.* 2:re3.
- Silvie, O., S. Charrin, M. Billard, J.F. Franetich, K.L. Clark, G.J. van Gemert, R.W. Sauerwein, F. Dautry, C. Boucheix, D. Mazier, and E. Rubinstein. 2006a. Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites. *J Cell Sci.* 119:1992-2002.
- Silvie, O., C. Greco, J.F. Franetich, A. Dubart-Kupperschmitt, L. Hannoun, G.J. van Gemert, R.W. Sauerwein, S. Levy, C. Boucheix, E. Rubinstein, and D. Mazier. 2006b. Expression of human CD81 differently affects host cell susceptibility to malaria sporozoites depending on the Plasmodium species. *Cell Microbiol.* 8:1134-46.
- Silvie, O., E. Rubinstein, J.F. Franetich, M. Prenant, E. Belnoue, L. Renia, L. Hannoun, W. Eling, S. Levy, C. Boucheix, and D. Mazier. 2003. Hepatocyte CD81 is required for Plasmodium falciparum and Plasmodium yoelii sporozoite infectivity. *Nat Med.* 9:93-6.
- Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387:569-72.
- Singer, S.J., and G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 175:720-31.
- Skubitz, K.M., K.D. Campbell, J. Iida, and A.P. Skubitz. 1996. CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18, and transmits an activation signal in neutrophils. *J Immunol.* 157:3617-26.
- Small, J.V., K. Rottner, and I. Kaverina. 1999. Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 11:54-60.
- Soldaini, E., A. Wack, U. D'Oro, S. Nuti, C. Ulivieri, C.T. Baldari, and S. Abrignani. 2003. T cell costimulation by the hepatitis C virus envelope protein E2 binding to CD81 is mediated by Lck. *Eur J Immunol.* 33:455-64.
- Spoden, G., K. Freitag, M. Husmann, K. Boller, M. Sapp, C. Lambert, and L. Florin. 2008. Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16--involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS One.* 3:e3313.
- Stahlhut, M., and B. van Deurs. 2000. Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 11:325-37.
- Stipp, C.S., T.V. Kolesnikova, and M.E. Hemler. 2001. EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J Biol Chem.* 276:40545-54.
- Stipp, C.S., T.V. Kolesnikova, and M.E. Hemler. 2003. EWI-2 regulates alpha3beta1 integrin-dependent cell functions on laminin-5. *J Cell Biol.* 163:1167-77.
- Sugiura, T., and F. Berditchevski. 1999. Function of alpha3beta1-tetraspanin protein complexes in tumor cell invasion. Evidence for the role of the complexes in production of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2). *J Cell Biol.* 146:1375-89.
- Surks, H.K., C.T. Richards, and M.E. Mendelsohn. 2003. Myosin phosphatase-Rho interacting protein. A new member of the myosin phosphatase complex that directly binds RhoA. *J Biol Chem.* 278:51484-93.

- Szollosi, J., V. Horejsi, L. Bene, P. Angelisova, and S. Damjanovich. 1996. Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J Immunol.* 157:2939-46.
- Takahashi, K., T. Sasaki, A. Mammoto, K. Takaishi, T. Kameyama, S. Tsukita, and Y. Takai. 1997. Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem.* 272:23371-5.
- Takahashi, M., T. Sugiura, M. Abe, K. Ishii, and K. Shirasuna. 2007. Regulation of c-Met signaling by the tetraspanin KAI-1/CD82 affects cancer cell migration. *Int J Cancer.* 121:1919-29.
- Takahashi, Y., D. Bigler, Y. Ito, and J.M. White. 2001. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. *Mol Biol Cell.* 12:809-20.
- Takeda, Y., A.R. Kazarov, C.E. Butterfield, B.D. Hopkins, L.E. Benjamin, A. Kaipainen, and M.E. Hemler. 2007. Deletion of tetraspanin Cd151 results in decreased pathologic angiogenesis in vivo and in vitro. *Blood.* 109:1524-32.
- Takino, T., H. Miyamori, N. Kawaguchi, T. Uekita, M. Seiki, and H. Sato. 2003. Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 304:160-6.
- Tanigawa, M., K. Miyamoto, S. Kobayashi, M. Sato, H. Akutsu, M. Okabe, E. Mekada, K. Sakakibara, M. Miyado, A. Umezawa, and K. Miyado. 2008. Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice. *Mol Reprod Dev.* 75:150-5.
- Tavano, R., R.L. Contento, S.J. Baranda, M. Soligo, L. Tuosto, S. Manes, and A. Viola. 2006. CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nat Cell Biol.* 8:1270-6.
- Thali, M. 2009. The roles of tetraspanins in HIV-1 replication. *Curr Top Microbiol Immunol.* 339:85-102.
- Tham, T.N., E. Gouin, E. Rubinstein, C. Boucheix, P. Cossart, and J. Pizarro-Cerda. 2010. Tetraspanin CD81 is required for *Listeria monocytogenes* invasion. *Infect Immun.* 78:204-9.
- Thorne, R.F., J.W. Legg, and C.M. Isacke. 2004. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci.* 117:373-80.
- Tigges, U., B. Koch, J. Wissing, B.M. Jockusch, and W.H. Ziegler. 2003. The F-actin cross-linking and focal adhesion protein filamin A is a ligand and in vivo substrate for protein kinase C alpha. *J Biol Chem.* 278:23561-9.
- Travis, M.A., A. van der Flier, R.A. Kammerer, A.P. Mould, A. Sonnenberg, and M.J. Humphries. 2004. Interaction of filamin A with the integrin beta 7 cytoplasmic domain: role of alternative splicing and phosphorylation. *FEBS Lett.* 569:185-90.
- Tsukita, S., and S. Yonemura. 1999. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem.* 274:34507-10.
- Ueda, K., Y. Ohta, and H. Hosoya. 2003. The carboxy-terminal pleckstrin homology domain of ROCK interacts with filamin-A. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:886-90.

- Unternaehrer, J.J., A. Chow, M. Pypaert, K. Inaba, and I. Mellman. 2007. The tetraspanin CD9 mediates lateral association of MHC class II molecules on the dendritic cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:234-9.
- Urzainqui, A., J.M. Serrador, F. Viedma, M. Yanez-Mo, A. Rodriguez, A.L. Corbi, J.L. Alonso-Lebrero, A. Luque, M. Deckert, J. Vazquez, and F. Sanchez-Madrid. 2002. ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1. *Immunity*. 17:401-12.
- VanCompernelle, S.E., S. Levy, and S.C. Todd. 2001. Anti-CD81 activates LFA-1 on T cells and promotes T cell-B cell collaboration. *Eur J Immunol*. 31:823-31.
- VanCompernelle, S.E., A.V. Wiznycia, J.R. Rush, M. Dhanasekaran, P.W. Baures, and S.C. Todd. 2003. Small molecule inhibition of hepatitis C virus E2 binding to CD81. *Virology*. 314:371-80.
- Vicente-Manzanares, M., A. Cruz-Adalia, N.B. Martin-Cofreces, J.R. Cabrero, M. Dosil, B. Alvarado-Sanchez, X.R. Bustelo, and F. Sanchez-Madrid. 2005. Control of lymphocyte shape and the chemotactic response by the GTP exchange factor Vav. *Blood*. 105:3026-34.
- Viola, A., and N. Gupta. 2007. Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nat Rev Immunol*. 7:889-96.
- Vogt, A.B., S. Spindeldreher, and H. Kropshofer. 2002. Clustering of MHC-peptide complexes prior to their engagement in the immunological synapse: lipid raft and tetraspan microdomains. *Immunol Rev*. 189:136-51.
- W.Deamer, D., A. Kelnzeller, and D.M. Fambrough. 1999. Membrane Permeability: 100 years since Ernest Overton.
- Wang, X.Q., Q. Yan, P. Sun, J.W. Liu, L. Go, S.M. McDaniel, and A.S. Paller. 2007. Suppression of epidermal growth factor receptor signaling by protein kinase C-alpha activation requires CD82, caveolin-1, and ganglioside. *Cancer Res*. 67:9986-95.
- Waterhouse, R., C. Ha, and G.S. Dveksler. 2002. Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17. *J Exp Med*. 195:277-82.
- Weng, J., D.N. Kremmentsov, S. Khurana, N.H. Roy, and M. Thali. 2009. Formation of syncytia is repressed by tetraspanins in human immunodeficiency virus type 1-producing cells. *J Virol*. 83:7467-74.
- Witherden, D.A., R. Boismenu, and W.L. Havran. 2000. CD81 and CD28 costimulate T cells through distinct pathways. *J Immunol*. 165:1902-9.
- Wright, M.D., G.W. Moseley, and A.B. van Spriel. 2004. Tetraspanin microdomains in immune cell signalling and malignant disease. *Tissue Antigens*. 64:533-42.
- Yalaoui, S., T. Huby, J.F. Franetich, A. Gego, A. Rametti, M. Moreau, X. Collet, A. Siau, G.J. van Gemert, R.W. Sauerwein, A.J. Luty, J.C. Vaillant, L. Hannoun, J. Chapman, D. Mazier, and P. Froissard. 2008a. Scavenger receptor BI boosts hepatocyte permissiveness to Plasmodium infection. *Cell Host Microbe*. 4:283-92.
- Yalaoui, S., S. Zougbede, S. Charrin, O. Silvie, C. Arduise, K. Farhati, C. Boucheix, D. Mazier, E. Rubinstein, and P. Froissard. 2008b. Hepatocyte permissiveness to Plasmodium infection is conveyed by a short and structurally conserved region of the CD81 large extracellular domain. *PLoS Pathog*. 4:e1000010.
- Yanez-Mo, M., A. Alfranca, C. Cabanas, M. Marazuela, R. Tejedor, M.A. Ursa, L.K. Ashman, M.O. de Landazuri, and F. Sanchez-Madrid. 1998. Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol*. 141:791-804.

- Yanez-Mo, M., O. Barreiro, P. Gonzalo, A. Batista, D. Megias, L. Genis, N. Sachs, M. Sala-Valdes, M.A. Alonso, M.C. Montoya, A. Sonnenberg, A.G. Arroyo, and F. Sanchez-Madrid. 2008. MT1-MMP collagenolytic activity is regulated through association with tetraspanin CD151 in primary endothelial cells. *Blood*. 112:3217-26.
- Yanez-Mo, M., O. Barreiro, M. Gordon-Alonso, M. Sala-Valdes, and F. Sanchez-Madrid. 2009. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol.* 19:434-46.
- Yanez-Mo, M., M. Mittelbrunn, and F. Sanchez-Madrid. 2001. Tetraspanins and intercellular interactions. *Microcirculation*. 8:153-68.
- Yang, X., O.V. Kovalenko, W. Tang, C. Claas, C.S. Stipp, and M.E. Hemler. 2004. Palmitoylation supports assembly and function of integrin-tetraspanin complexes. *J Cell Biol.* 167:1231-40.
- Yauch, R.L., and M.E. Hemler. 2000. Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase. *Biochem J.* 351 Pt 3:629-37.
- Yonemura, S., M. Hirao, Y. Doi, N. Takahashi, T. Kondo, and S. Tsukita. 1998. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol.* 140:885-95.
- Yonemura, S., A. Nagafuchi, N. Sato, and S. Tsukita. 1993. Concentration of an integral membrane protein, CD43 (leukosialin, sialophorin), in the cleavage furrow through the interaction of its cytoplasmic domain with actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol.* 120:437-49.
- Yoshida, T., Y. Kawano, K. Sato, Y. Ando, J. Aoki, Y. Miura, J. Komano, Y. Tanaka, and Y. Koyanagi. 2008. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic*. 9:540-58.
- Zhang, F., J. Kotha, L.K. Jennings, and X.A. Zhang. 2009. Tetraspanins and vascular functions. *Cardiovasc Res.* 83:7-15.
- Zhang, X.A., A.L. Bontrager, and M.E. Hemler. 2001. Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem.* 276:25005-13.
- Zhang, X.A., W.S. Lane, S. Charrin, E. Rubinstein, and L. Liu. 2003. EWI2/PGRL associates with the metastasis suppressor KAI1/CD82 and inhibits the migration of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 63:2665-74.
- Zheng, Z., and Z. Liu. 2006. CD151 gene delivery activates PI3K/Akt pathway and promotes neovascularization after myocardial infarction in rats. *Mol Med.* 12:214-20.
- Zhong, Z., W.S. Yeow, C. Zou, R. Wassell, C. Wang, R.G. Pestell, J.N. Quong, and A.A. Quong. Cyclin D1/cyclin-dependent kinase 4 interacts with filamin A and affects the migration and invasion potential of breast cancer cells. *Cancer Res.* 70:2105-14.
- Zilber, M.T., N. Setterblad, T. Vasselon, C. Doliger, D. Charron, N. Mooney, and C. Gelin. 2005. MHC class II/CD38/CD9: a lipid-raft-dependent signaling complex in human monocytes. *Blood*. 106:3074-81.
- Zimmermann, P., K. Meerschaert, G. Reekmans, I. Leenaerts, J.V. Small, J. Vandekerckhove, G. David, and J. Gettemans. 2002. PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Mol Cell.* 9:1215-25.

- Ziyyat, A., E. Rubinstein, F. Monier-Gavelle, V. Barraud, O. Kulski, M. Prenant, C. Boucheix, M. Bomsel, and J.P. Wolf. 2006. CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *J Cell Sci.* 119:416-24.
- Zoller, M. 2009. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer.* 9:40-55.
- Zuo, H., Z. Liu, X. Liu, J. Yang, T. Liu, S. Wen, X.A. Zhang, K. Cianflone, and D. Wang. 2009. CD151 gene delivery after myocardial infarction promotes functional neovascularization and activates FAK signaling. *Mol Med.* 15:307-15.

LEYENDAS DE VIDEOS

VIDEO 1: LA PROTEINA FILAMINA-A SE LOCALIZA EN LA ZONA DE CONTACTO EN LA SINAPSIS INMUNE

Videomicroscopía confocal a tiempo retardado de la localización de Filamina-A a la zona de contacto entre la célula T (J77) y la célula B (Raji), marcada en rojo con la sonda CMTMR. Las células J77 transfectadas con la construcción Filamina-A-GFP se adhirieron sobre PLL (50µg/ml) y se añadieron las células Raji pulsadas con SEE (1µg/ml).

VIDEO 2: LA PROTEINA α -ACTININA SE LOCALIZA EN LA ZONA DE CONTACTO EN LA SINAPSIS INMUNE

Videomicroscopía confocal a tiempo retardado de la localización de α -Actinina a la zona de contacto entre la célula T (J77) y la célula B, marcada en rojo con la sonda CMTMR (Raji). Las células J77 transfectadas con la construcción α -Actinina se adhirieron sobre PLL (50µg/ml) y se añadieron las células Raji cargadas con SEE (1µg/ml).

VIDEO 3: LA PROTEINA PDZ SINTENINA-1 SE DISTRIBUYE DE FORMA POLARIZADA EN LINFOCITOS T

Videomicroscopía confocal a tiempo retardado de la localización de Sintenina-1 en células T estimuladas con la quimiocina SDF-1 α . Primero, las células HSB-2 y después las células CEM se transfectaron transitoriamente con la construcción de Sintenina-1 fusionada con GFP. Las células se adhirieron a FN (20µg/ml) y se estimularon con la quimiocina SDF-1 α . Las células se monitorizaron a intervalos de 30 segundos. Las proyecciones máximas en pseudocolor se obtuvieron utilizando un programa informático de LEICA.

VÍDEO 4: LOS MUTANTES EN TIROSINA DE SINTENINA-1 PRESENTAN LA MISMA LOCALIZACIÓN QUE LA PROTEÍNA NATIVA

Las células CEM se transfectaron con la construcción Sintenina-1-GFP y con los mutantes Y4, Y3 e Y1. Las células se adhirieron a FN (20µg/ml) y se estimularon con la quimiocina SDF-1 α para posteriormente ser monitorizadas a intervalos de 30 segundos.

Las proyecciones máximas en pseudocolor se obtuvieron utilizando un programa informático de LEICA.

ANEXOS

ARTICULOS RELACIONADOS CON ESTE TRABAJO DE TESIS

1. Sala-Valdés M, Ursa A, Charrin S, Rubinstein E, Hemler ME, Sánchez-Madrid F and Yañez-Mó M. **EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ERM proteins.** J Biol Chem 2006 Jul 281 (28): 19665-19675
2. Yañez-Mó M, Barreiro O, Gordón-Alonso M, Sala-Valdés M and Sánchez-Madrid F. **Tetraspanin enriched Microdomains: a functional unit in cell plasma membranas.** Trends cell Biol 19 (9): 434-46.
3. Sala-Valdes M, Gordon-Alonso M, Tejera E, Ibañez A, Cabrero JR, Ursa A, Mittelbrunn M, Perez-Martinez M, Rey M, Gimferrer I, Serra-Pages C, Lozano F, Sanchez-Madrid F and Yañez-Mo M. **The PDZ protein Syntenin-1 binds to M-RIP and polarizes Src-mediated Rac activation to induce actin polarization during T-cell immune interactions and chemotaxis** (en revision).
4. Gordon-Alonso M, Sala-Valdes M, Perez D, Ursa A, Mittelbrunn M, Kolesnikova TV, Rubinstein E, Vazquez J, Sanchez-Madrid F and Yañez-Mo M. **EWI-2/ α -actinin act as a negative regulatory axis in T-cell activation and HIV infection** (en revision).
5. Tejera E, Sala-Valdes M and Yañez-Mo M. **Role of Tetraspanins in cell migration and intercellular adesion.** Tetraspanin Book. Ed. Springer (en revision).

OTROS ARTICULOS PUBLICADOS

1. Yañez-Mó M, Barreiro O, Gonzalo P, Batista A, Megías D, Genís L, Sachs N, Sala-Valdés M, Alonso MA, Montoya MC, Sonnenberg A, Arroyo AG, Sánchez-Madrid F. **MT1-MMP collagenolytic activity is regulated through association with tetraspanin CD151 in primary endothelial cells.** Blood. 2008 Oct 15;112(8):3217-26.
2. Barreiro O, Yañez-Mó M, Sala-Valdés M, Gutierrez-Lopez MD, Ovalle S, Higginbottom A, Monk PN, Cabañas C and Sánchez-Madrid F. **Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation.** Blood. 2005 Apr 1;105(7):2852-61.
3. Lopez-Giral S, Quintana NE, Cabrerizo M, Alfonso-Perez M, Sala-Valdes M, De Soria VG, Fernandez-Ranada JM, Fernandez-Ruiz E, Munoz C. **Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination.** J Leukoc Biol. 2004 Aug;76(2):462-71.

