



Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica

TESIS DOCTORAL

*Regulación funcional del receptor de quimiocinas CXCR4
por proteínas asociadas al citoesqueleto de actina*

Manuel Pérez Martínez

Madrid, 2010

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid



TESIS DOCTORAL

Regulación funcional del receptor de quimiocinas CXCR4 por proteínas asociadas al citoesqueleto de actina

Memoria presentada por el licenciado en Biología:

Manuel Pérez Martínez

para optar al grado de

Doctor en Biología

Director de tesis:

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 DIRECTOR DE TESIS

Francisco Sánchez Madrid, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Inmunología de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICA: que Manuel Pérez Martínez, licenciado en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral con el título: ***Regulación funcional del receptor de quimiocinas CXCR4 por proteínas asociadas al citoesqueleto de actina.***

Revisado este trabajo, el que suscribe considera el trabajo realizado satisfactorio y autoriza su presentación para ser juzgado.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Madrid a 3 de Marzo de 2010.

Fdo: Francisco Sánchez Madrid.

AGRADECIMIENTOS

A mi pareja.

A mi familia y amigos

RESUMEN

Durante la respuesta inmune los linfocitos T se salen del torrente sanguíneo y migran a zonas ricas en células presentadoras de antígeno (CPAs) en los órganos linfoides secundarios guiados por sus receptores quimiotácticos. La interacción entre linfocitos T y CPAs, denominada sinapsis inmune (SI), es fundamental para la activación y diferenciación de los linfocitos T a células efectoras. Se ha descrito que el citoesqueleto de actina es esencial para la correcta formación de la SI y la subsecuente activación de la célula T, así como para la migración quimiotáctica. Los receptores quimiotácticos inducen reordenamientos del citoesqueleto de actina para adaptarlo a los requerimientos funcionales de los linfocitos T, como la migración, la polarización y la activación durante la SI. El receptor de quimiocinas CXCR4 es esencial para la homeostasis, la migración celular, la inflamación, el desarrollo de células B y la metástasis tumoral. Sin embargo, no se conocen con precisión los conectores moleculares de CXCR4 con el citoesqueleto de actina.

En esta tesis hemos identificado y analizado nuevos componentes moleculares que se asocian con CXCR4 conectándolo con el citoesqueleto de actina. Así, hemos estudiado la implicación de la proteína motora miosina II A (MIIA) en la endocitosis de CXCR4 inducida por la quimiocina SDF-1 α en linfocitos T. Ambas proteínas colocalizan en la membrana plasmática de linfocitos T en reposo y durante las primeras etapas de la endocitosis de CXCR4 dependiente de SDF-1 α . La inhibición de la función de la MIIA bien mediante inhibidores químicos o bien mediante el silenciamiento con oligos interferentes reduce la endocitosis de CXCR4, lo que resulta en una mayor respuesta quimiotáctica frente a SDF-1 α .

Por otro lado, hemos descrito la expresión de la proteína de unión a F-actina, drebrina, en los linfocitos T. La drebrina colocaliza con CXCR4 y los filamentos de actina en el complejo supramolecular de activación periférico durante la SI. Además, la drebrina interacciona con CXCR4, y ambas proteínas se redistribuyen a la SI con cinéticas similares. Nuestros resultados indican que, en el linfocito, la drebrina y CXCR4 incrementan su interacción en la SI tras la estimulación antigénica. Por otra parte, el silenciamiento de la drebrina en linfocitos T inhibe la redistribución de CXCR4 y la polimerización de actina en la SI, así como la secreción de interleuquina 2. En resumen, nuestros resultados indican que la MIIA y la drebrina ejercen un papel funcional importante en linfocitos T durante la generación de la respuesta inmune.

SUMMARY

During the immune response T cells extravasate from the bloodstream and migrate to areas rich in antigen presenting cells (APCs) guided by chemotactic gradients. The interaction between T cells and APCs, called the immune synapse (IS), is essential for the activation and differentiation of T cells into effector cells. Chemotactic receptors induce actin cytoskeleton rearrangements to fit the functional requirements of T cells, such as migration, polarization and activation during the IS. Thus, it has been described that the actin cytoskeleton is essential for correct formation of the IS and the subsequent T cell activation, and for the endocytosis of chemokine receptors. The chemokine receptor CXCR4 is essential for homeostasis, cell migration, inflammation, B cell development and metastasis. However, it is not fully defined the molecular effectors linking CXCR4 to the actin cytoskeleton.

In this study we have identified and analyzed new molecular effectors associated with CXCR4 connecting it to the actin cytoskeleton. In this regard, it has been studied the involvement of the motor protein myosin II A (MIIA) in the CXCR4 endocytosis induced by the chemokine SDF-1 α in T cells. Both proteins colocalize in the plasma membrane of resting T cells and during the early stages of the SDF-1 α -dependent-CXCR4- endocytosis. Targeting MIIA either by chemical inhibitors or by silencing with siRNA impairs the CXCR4 endocytosis, resulting in increased migratory response to SDF-1 α .

On the other hand, we describe the expression of drebrin in T cells. Thus, drebrin colocalize with CXCR4 and actin filaments in the peripheral supramolecular activation cluster during IS. In addition, drebrina interacts with CXCR4, and both proteins redistribute to the IS with similar kinetics. Thus, our results indicate that in the T cells, drebrin and CXCR4 increase its interaction in the IS upon antigenic stimulation. Furthermore, drebrin silencing in T lymphocytes impairs CXCR4 localization and actin polymerization in the IS, and the secretion of interleukin 2.

In summary, our results indicate that drebrin and MIIA exerts a novel functional role in T lymphocytes during the generation of immune response.

ÍNDICE

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
INTRODUCCIÓN	1
1. La extravasación linfocitaria	1
1.1. La polaridad celular	2
1.1.1. El frente de avance	2
1.1.2. El urópodo	3
1.2. Presentación antigénica y sinapsis inmune	4
1.2.1. Estructura y formación de la sinapsis inmune	4
1.2.2. La función de la sinapsis inmune	6
2. Receptores de quimiocinas	7
2.1. CXCR4	9
3. El citoesqueleto de actina	10
4. Miosina no muscular de tipo IIA (MIIA)	11
5. Drebrina	13
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	21
RESULTADOS	29
1. Identificación de proteínas del citoesqueleto celular que se asocian con el receptor de quimiocinas CXCR4	29
2. Análisis de la función de la interacción del receptor de quimiocinas CXCR4 y la miosina IIA	30
2.1. El receptor CXCR4 y la miosina IIA se internalizan en linfocitos T de forma dependiente de SDF-1 α	30
2.2. La interferencia en linfocitos T de la miosina IIA inhibe la endocitosis del receptor CXCR4 dependiente de SDF-1 α e incrementa la respuesta	

quimiotáctica	32
3. Análisis de la función de la interacción del receptor de quimiocinas CXCR4 y la drebrina en la función inmune	33
3.1. La drebrina se expresa en linfocitos primarios y se asocia con el receptor de quimiocinas CXCR4 mediante su región amino terminal	33
3.2. La drebrina y el receptor de quimiocinas CXCR4 colocalizan en el SMAC periférico de la sinapsis inmune	36
3.3. La drebrina y el receptor CXCR4 siguen la misma cinética de relocalización y tras la estimulación antigénica incrementan su interacción en la zona de contacto de la SI	42
3.4. El silenciamiento de la drebrina impide el reclutamiento de CXCR4 a la SI	44
3.5. El silenciamiento de la drebrina disminuye la acumulación de actina en la SI	47
DISCUSIÓN	51
1. Asociación entre CXCR4 y miosina IIA, y función de dicha asociación en la endocitosis de CXCR4 dependiente de SDF-1 α en linfocitos T	52
2. Asociación entre CXCR4 y drebrina, y función de dicha asociación en la sinapsis inmune	53
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFÍA	65
ARTÍCULOS PUBLICADOS QUE FORMAN PARTE DE LA TESIS.....	81
ARTÍCULOS PUBLICADOS NO INCLUIDOS EN LA TESIS.....	82
ANEXO I (Leyendas de los vídeos)	85
ANEXO II (Artículos incluidos en la tesis)	87

LISTA DE 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)

AcM: Anticuerpo monoclonal
AcP: Anticuerpo policlonal
ADF-H: Dominio homólogo al factor depolimerizador de actina
ARNi: ARN interferente
ARNm: ARN mensajero
BSA: Albúmina de suero bovino
CFP: Proteína fluorescente cian
CKR: Receptores de quimiocinas
CNBr: Bromuro de cianógeno
CPA: Células presentadoras de antígeno
cSMAC: Complejo supramolecular de activación central
DAG: Diacilglicerol
dSMAC: Complejo supramolecular de activación distal
ECM: Matriz extra celular
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ERM: Familia de proteínas Ezrina-Radixina-Moesina
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
FN: Fibronectina
GFP: Proteína fluorescente verde
GPCR: Receptores acoplados a proteínas G
GRK: Quinasa asociada a receptor de proteínas G
GST: proteína Glutation S Transferasa
HRP: Peroxidasa de rábano
ICAM-1/3: Molécula de adhesión intercelular 1/3
IL-2: Interleuquina 2
IP: Inmunoprecipitación
IP3: Inositol Trifosfato
kDa: Kilodalton
LFA-1: Antígeno asociado a la función linfocitaria 1
MAPK: MAP quinasa
MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

MII: Miosina no muscular de tipo II
MLC: Cadena ligera de miosina
MLCK: Quinasa asociada a la cadena ligera de la miosina
MTOC: Centro organizador de microtúbulos
PBL: Linfocitos de sangre periférica
PCR: Reacción de la polimerasa en cadena
PIP2: Fosfatidil inositol bifosfato
PKC: Proteína quinasa C
PLC: Fosfolipasa C
PLL: Poli-L-lisina
pSMAC: Complejo supramolecular de activación periférico
ROI: Región de interés
RT: Transcriptasa inversa
SDF -1 α : Factor derivado de células estromales 1 α
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SEE: Superantígeno bacteriano enterotoxina estafilocócica E
SI: Sinapsis inmune
SMAC: Complejo supramolecular de activación
TCR: Receptor de la célula T
VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana 1
WB: *Western Blot*
YFP: Proteína fluorescente amarilla

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1 La extravasación linfocitaria

La adhesión y migración linfocitaria son fundamentales para la organización del sistema inmune y el desarrollo de la respuesta efectora. Ambos procesos se desarrollan tanto en condiciones fisiológicas, durante la recirculación normal de los linfocitos entre la sangre y los órganos linfoides (denominada “homing”), como durante la respuesta inmune efectora, donde los linfocitos, una vez activados y diferenciados, migran desde el torrente sanguíneo hasta los tejidos diana para llevar a cabo sus funciones efectoras [1, 2]. Para ello se sirven de un citoesqueleto de actina enormemente dinámico y regulado muy finamente por un conjunto de señales que emanan de receptores de membrana y moléculas de adhesión, que actúan conjuntamente con proteínas reguladoras y adaptadoras del citoesqueleto de actina [3-5].

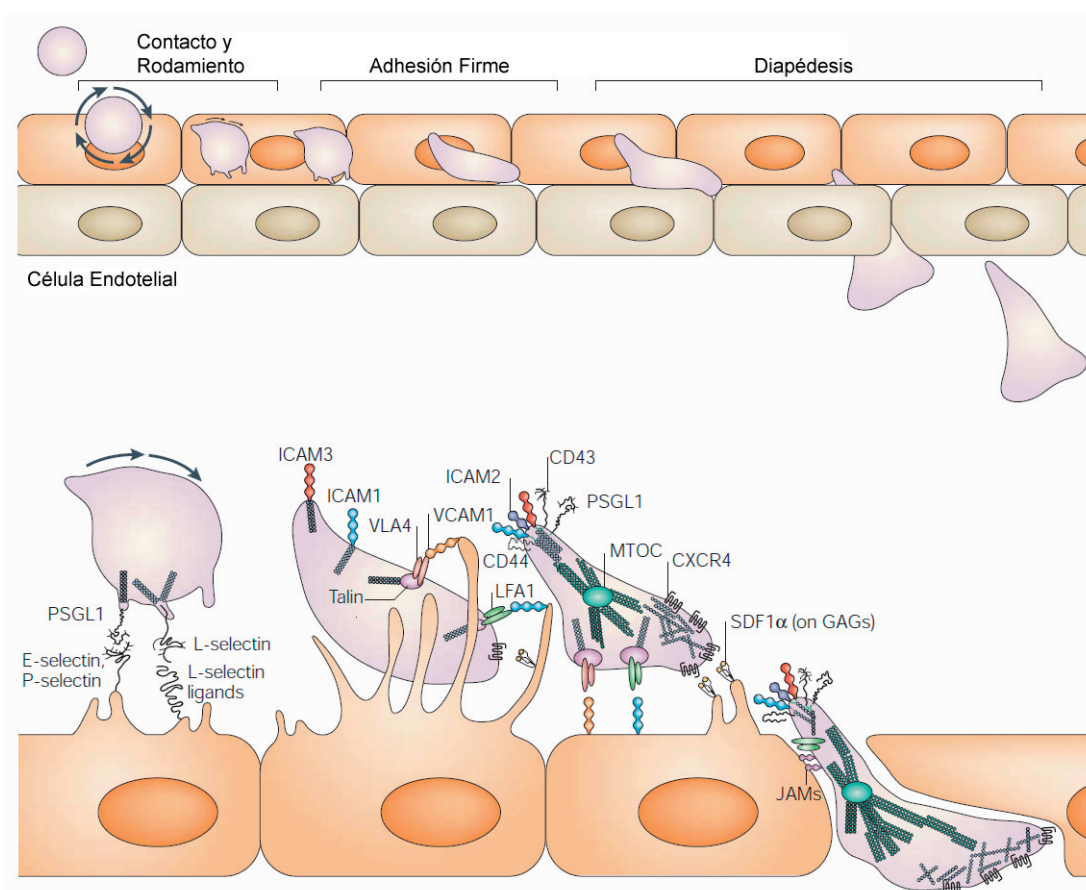


Fig. 1. La adhesión y migración linfocitaria. La figura representa la secuencia de etapas de la extravasación linfocitaria. Modificado de Vicente-Manzanares, M. and Sanchez-Madrid, F., 2004.

Los linfocitos T migran guiados por los receptores quimiotácticos que inducen cambios en el citoesqueleto de actina, adaptándolo para sustentar la adhesión y las tensión mecánica al pasar a través de las barreras celulares (Fig. 1). Las células T circulantes son reclutadas a los órganos linfoides secundarios o los sitios de inflamación debido a que reconocen gradientes

de sustancias quimioatrayentes presentados en primer lugar por el endotelio vascular del vaso, y, tras extravasarse, por las células y las moléculas de la matriz extracelular (ECM) de los tejidos [2, 4]. De este modo, las quimiocinas transmiten señales que conducen a la activación de integrinas, la polarización, y la remodelación de la F-actina, que regula de forma coordinada la quimiotaxis de los linfocitos. Una vez activado por las señales de quimiocinas “de dentro hacia afuera”, las integrinas pueden también señalar “de fuera hacia dentro” para mantener conexiones físicas entre el substrato y el citoesqueleto durante la migración, facilitando así la compleja relación entre los receptores de quimiocinas y de adhesión [6]. Así, el reconocimiento de las quimiocinas por parte de los linfocitos origina de forma secuencial la activación de las integrinas linfocitarias, la detención del linfocito dentro del vaso sanguíneo, el colapso de los microvili, la polarización celular y la migración a través de la barrera endotelial (diapédesis) [4, 7, 8].

1.1 La polaridad celular

La polaridad necesaria para la migración dirigida está regulada a través del reconocimiento coordinado de quimioatrayentes y ligandos celulares de adhesión o componentes de la matriz extracelular, y depende en gran medida de los cambios morfológicos mediados por el citoesqueleto celular [8]. Las células T, al responder a quimioatrayentes, se polarizan rápidamente formando un lamelipodio frontal en el frente de avance y una estructura posterior denominada urópodo. La continua polimerización de la F-actina y la contracción basada en filamentos de actina y miosina (actomiosina) en el frente de avance dirige el movimiento y la adhesión, mientras que el urópodo experimenta ciclos repetidos de fijación, liberación, y retracción del sustrato [8]. Así pues, esta coordinación de adhesión y desunión, junto con la propulsión mediada por la actina, permite a las células T migrar a lo largo de las paredes de los vasos sanguíneos y transmigrar a través del endotelio vascular hacia los tejidos circundantes.

La asimetría morfológica de los linfocitos polarizados se plasma en la aparición de dos estructuras bien definidas: el frente de avance y el urópodo, que reflejan la distribución espacial diferencial de proteínas del citoesqueleto, receptores de membrana y moléculas de señalización intracelular (Fig. 2). La polarización de los linfocitos es esencial, no solo para la migración celular, sino también para otras funciones efectoras de los linfocitos como las interacciones de las células T cooperativas con células presentadoras de antígeno o el reconocimiento de las células diana por las células T citotóxicas [5, 9].

1.1.1 El frente de avance

El frente de avance concentra en su superficie diversas moléculas de adhesión y receptores; está especializado en detectar el gradiente de quimiocinas presente en el medio y dirigir la polimerización de actina para que la célula pueda avanzar (Fig. 2). En este sentido, en el frente de avance se acumulan los receptores de quimiocinas, incluyendo CXCR4, CCR2 y CCR5 [10,

11], que detectan el complejo gradiente de quimioatrayentes que inducen la migración dirigida, y en moléculas de adhesión que aportan el anclaje al sustrato desde el cual hacer tracción. Además de esta asimetría de moléculas de superficie existe una distribución diferencial de moléculas de señalización y proteínas del citoesqueleto. Así, la profilina promueve la adición de monómeros de actina a los filamentos de crecimiento rápido en el frente de avance, que dirigen la protrusión basada en actina y el anclaje de las integrinas [8]. Además, las integrinas (incluyendo LFA1) se concentran en el frente de las células T migradoras [12-14], junto con proteínas asociadas al citoesqueleto como la talina, la vinculina, y la quinasa de adhesiones focales (FAK) [10, 12, 15], donde unen la F-actina al sustrato de forma dinámica [16, 17]. Por otra parte, se ha demostrado que la miosina no muscular de tipo II A (MIIA) se asocia con los receptores de quimiocinas, proporcionando un vínculo importante entre la señalización mecánica necesaria para la tracción durante la locomoción y la endocitosis de los receptores de quimiocinas [18]. Asimismo, la cadena ligera de la miosina (MLC) y su quinasa asociada (MLCK) se mobilizan al frente de avance donde son necesarias para la activación de las integrinas y la extensión de la lamela rica en actina [19, 20].

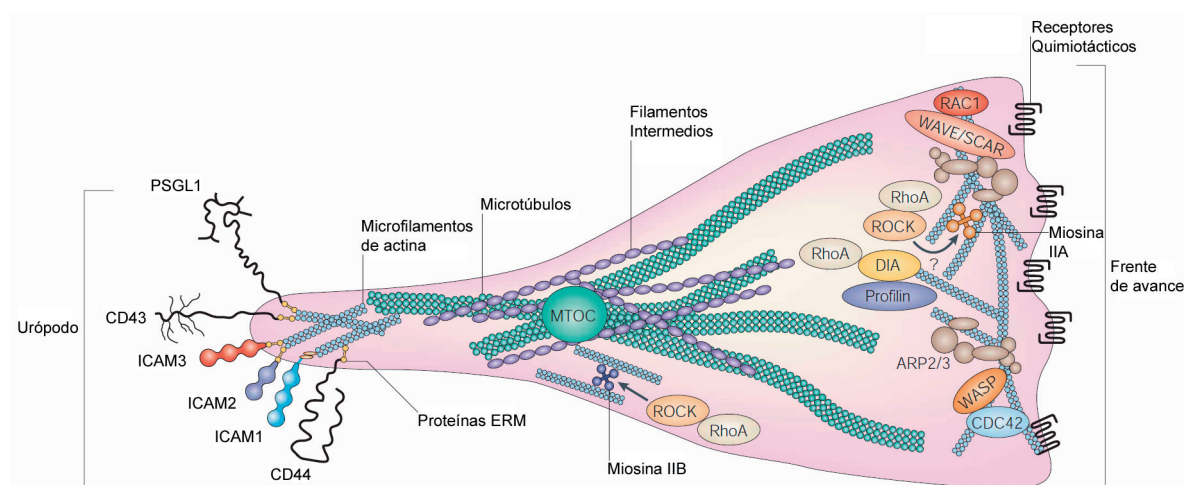


Fig. 2. Polarización linfocitaria. Durante la polarización celular los linfocitos desarrollan una asimetría morfológica y funcional mediante la relocalización de los receptores de membrana, de proteínas citoplásmicas que intervienen en la transducción de señales y del citoesqueleto. Modificado de Vicente-Manzanares, M. and Sanchez-Madrid, F., 2004.

1.1.2 El urópodo

A su vez, las células T con morfología polarizada y migradora forman una estructura posterior llamada urópodo que facilita la migración [21-23], y que está enriquecida en moléculas de adhesión, incluyendo CD43, CD44, PSGL1, ICAM1, ICAM2 y ICAM3 (Fig. 2) [24]. Por otra parte, el entrecruzamiento de estas moléculas de adhesión con anticuerpos monoclonales específicos induce por sí misma la polarización de las células T [12, 25-28]. Es importante resaltar el hecho de que las regiones intracelulares de CD43, CD44 e ICAM3 pueden unirse a proteínas adaptadoras de la familia de Ezrina-Radixina-Moesina (ERM) activas, que también se

relocalizan en el urópodo, indicando que estas moléculas se redistribuyen al urópodo a través de un transporte activo mediado por el citoesqueleto de actina [23, 27, 29]. En este sentido, se ha descrito la regulación de las ERMs por diferentes quinasas, como el efector de RhoA, ROCK o el fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) producido por la fosfatidilinositol-4-fosfato-5 quinasa [30-32]. Además, algunas integrinas $\beta 1$ son secuestradas en el urópodo durante la migración, lo que indica que el urópodo podría funcionar como un punto de anclaje al substrato mientras el frente de avance propulsa el cuerpo celular [14]. Por otra parte, la concentración de moléculas de adhesión y la capacidad de unir células T, sugiere una función cooperativa en el reclutamiento de células próximas hacia los sitios de inflamación [33, 34].

1.2 Presentación antigénica y sinapsis inmune

La presentación antigénica se produce generalmente en los órganos linfoides secundarios cuando una célula T interactúa con una célula presentadora de antígeno (CPA) que expresa un antígeno específico unido a sus moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La zona de interfase celular de dicha interacción se denomina sinapsis inmune (SI). La interacción inicial de la superficie de la CPA por la célula T implica contactos exploratorios que están mediados por integrinas, como LFA1, y sus ligandos, ICAM1 e ICAM3, y que culmina con el reconocimiento específico de las moléculas MHC de clase II cargadas con el antígeno por el receptor de la célula T (TCR) [1, 7, 35].

A los pocos minutos del reconocimiento de la célula CPA por la célula T, la señalización que emana del TCR induce una polarización rápida del citoesqueleto, que implica la polimerización de filamentos de actina (F-actina) [36-38], la reorientación del centro organizador de microtúbulos (MTOC) hacia la zona de interacción entre ambas células [39, 40], y la formación de una estructura rica en actina en el lado opuesto de la célula conocida como complejo de polo distal [41]. La reestructuración del citoesqueleto es esencial, ya que permite la redistribución de los receptores celulares, el ensamblaje de los complejos de señalización y la organización de una estructura adherente, que, en última instancia, da como resultado la formación de la sinapsis inmune madura y la activación del linfocito T [37, 42]. Sin embargo, aún se desconocen muchos de los mecanismos precisos que controlan esta reorganización del citoesqueleto.

1.2.1 Estructura y formación de la sinapsis inmune

Para que se produzca la activación de la célula T es necesaria su interacción con una CPA portadora de complejos péptido específico-MHC, formándose entre ambas células una unión muy organizada que se conoce como sinapsis inmunológica (SI) (Fig. 3). Los receptores implicados en el reconocimiento antigénico y los receptores de adhesión se agrupan de una forma muy regulada, tanto espacial como temporalmente, generando, pocos minutos después de la interacción T-CPA, dos estructuras concéntricas que se han denominado complejos supramoleculares de activación (SMAC) [43-46]. Así, en la zona central de la sinapsis madura,

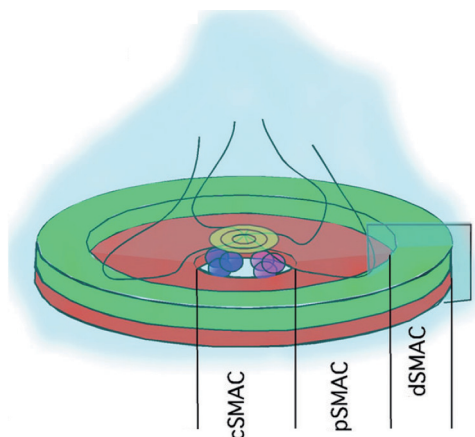


Fig. 3. Estructura de los SMACs en la sinapsis inmune. Modificado de Dustin, M.L., 2009.

denominada cSMAC (complejo supramolecular de activación central), se localiza el TCR y el complejo péptido-MHC de la célula presentadora junto a otras moléculas coestimuladoras como CD28 [47]. Otras moléculas señalizadoras como la proteína quinasa C- θ (PKC- θ), lck, fyn, LAT y ZAP-70 están también localizadas en el cSMAC en la cara interna de la membrana de la célula T. A su vez, el cSMAC está rodeado de dos anillos periféricos donde se concentran distintas moléculas de adhesión intercelular, integrinas y receptores de quimiocinas, que están anclados al citoesqueleto de actina mediante moléculas adaptadoras y/o reguladoras, como la talina, y que se denominan pSMAC y dSMAC (complejo supramolecular de activación periférico y distal respectivamente) [43-46]. Otras moléculas son excluidas activamente fuera de la SI, como la fosfatasa CD45 y la mucina CD43. Una vez formada, la sinapsis inmune de células T-APC permite una señalización sostenida del TCR y una adhesión estabilizada, así como la exocitosis y la endocitosis polarizadas, que permiten la secreción dirigida de citoquinas y/o de gránulos, y la internalización del receptor [43, 45, 48-52].

La velocidad de la redistribución del TCR al cSMAC después de la estimulación es superior a la prevista para la difusión simple [53], lo que indica que el citoesqueleto podría generar directamente la fuerza que se necesita para el movimiento rápido y dirigido del TCR durante la activación. De hecho, se ha demostrado que CD3 ζ en células T se asocia con la fracción del citoesqueleto de actina insoluble en detergente [54, 55]. Además, la interferencia de los filamentos de actina o el silenciamiento de los reguladores del citoesqueleto altera la formación de la sinapsis inmunológica y la activación de las células T [37, 38, 42, 56-59]. Asimismo, la activación de las integrinas en el pSMAC, que media la formación del conjugado estable entre la célula T y la CPA, depende del citoesqueleto [4]. Por lo tanto, la polarización del citoesqueleto es un requisito importante para el reconocimiento productivo de la CPA, que lleva a la formación de la sinapsis inmunológica y la posterior activación de la célula T.

La interacción del linfocito T con la CPA implica varios eventos celulares secuenciales (Fig. 4). Inicialmente, la célula T se adhiere transitoriamente a la CPA, explorando su superficie en busca de complejos péptido-MHC específicos. Esta primera etapa es independiente del reconocimiento antigénico [7, 44, 60]. Varios pares de receptores de adhesión/ligandos están implicados en las interacciones adherentes iniciales como CD2/LFA-3, LFA-1/ICAM-1,-3 [7, 61]. ICAM-1 e ICAM-3 actúan como moléculas coestimuladoras en los linfocitos T [62, 63], y ambas se localizan en la zona de contacto entre el linfocito T y la CPA [60, 64].

Tras el reconocimiento antigénico, se produce la estabilización del conjugado célula

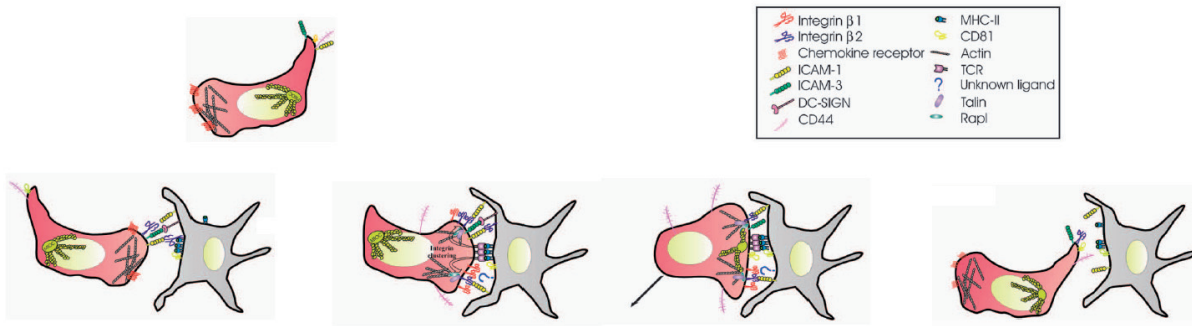


Fig. 4. Fases de la formación de la sinapsis inmune. Modificado de Barreiro, O. *et al.*, 2007.

T-CPA, y comienza una redistribución molecular muy dinámica en la zona de contacto, formándose los SMACs definitivos, con la acumulación central de TCR/MHC-péptido rodeado por LFA-1/ICAM-1. A continuación, la maquinaria de secreción, el aparato Golgi y el centro organizador de microtúbulos (MTOC) del linfocito T, son rápidamente translocados y reorientados a la zona de contacto [64]. A este estadio de la sinapsis inmunológica se le denomina sinapsis madura. La separación del linfocito T y la CPA ocurre entre 24-48 horas después [7].

La SI se produce entre distintos tipos celulares. De este modo, las células T vírgenes se activan mayoritariamente formando sinapsis con las células dendríticas, activándose y diferenciándose a células efectoras [65]. Por otro lado, las células T $CD4^+$ también forman SI con células B, produciéndose la activación de la célula B y la síntesis de anticuerpos [44, 66]. Además, las células T $CD8^+$ citotóxicas pueden formar sinapsis con las células dianas, y aunque estos contactos son de corta duración debido a la lisis de la célula diana, también se forman sinapsis inmunes maduras [49]. De manera similar, las células *natural killer* son capaces de formar SI con las células diana [67].

1.2.2 La función de la sinapsis inmune

Aunque parece bastante evidente que la interfase de contacto entre una célula T y una CPA se forma para facilitar la comunicación entre ambas células, se desconoce por qué las moléculas se reordenan formando los SMACs característicos de las SI maduras. Una posibilidad es que estos SMACs posibiliten la activación secuencial del linfocito T. En este sentido, se han observado distintas ondas de fosforilaciones, mediadas por quinasas como Lck y ZAP-70, inducidas secuencialmente [3, 68]. Así, se ha postulado que la señalización del TCR generada después de la formación de los SMACs es necesaria para una activación productiva de la célula T, de manera que sólo las CPA que presenten los niveles suficientes de péptidos agonistas inducirán la formación de SMACs y la señalización subsiguiente [69].

Otra posibilidad es que el reagrupamiento en SMACs sea requerido para una secreción polarizada por parte de las células T. Existen numerosas evidencias que apuntan a que ésta

es la principal función de la SI. Así, las células que forman sinapsis maduras (los linfocitos T y las células *natural killer*) inducen una secreción polarizada hacia la célula con la que están interaccionando, mientras que los timocitos y las células que no inducen una secreción polarizada hacia la CPA no desarrollan sinapsis maduras [70].

2 Receptores de quimiocinas

Las quimiocinas y sus receptores correspondientes regulan procesos fisiológicos críticos, como la recirculación y la activación leucocitaria, la migración celular, la hematopoyesis y la angiogénesis [71-74]. Además están implicados en procesos patológicos, como el rechazo de tumores [75, 76], enfermedades inflamatorias, las respuestas Th1/Th2, y la infección por VIH-1 [77-80]. Para ello, los receptores de quimiocinas traducen las señales quimiotácticas de las quimiocinas en profundos reordenamientos del citoesqueleto, logrando los cambios morfológicos adecuados a los requerimientos funcionales.

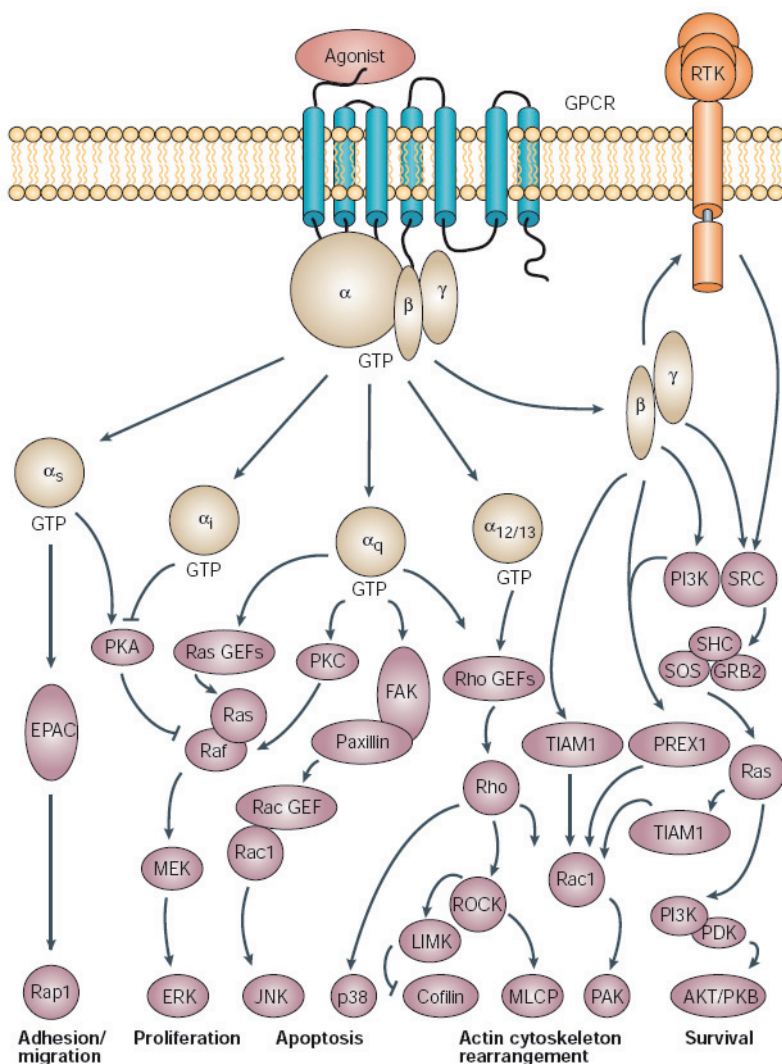


Fig. 5. Señalización de los receptores asociados a proteínas G. Modificado de Sodhi, A. *et al.*, 2004.

Las quimiocinas son una familia de citoquinas quimioatrayentes, generalmente de pequeño tamaño, que se dividen en cuatro grupos principales en función de su estructura: las quimiocinas CXC (α), CC (β), C (γ) y CX3C (δ) [5]. Para ejercer sus funciones, las quimiocinas se unen a sus receptores correspondientes (CKRs) en la membrana de las células diana, iniciando distintas cascadas de transducción de señales (Fig. 5) [81-84].

A su vez, los receptores de quimiocinas pertenecen a la familia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs), y se agrupan en cuatro subfamilias, denominadas CR, CCR, CXCR y CX3CR, que interaccionan

con las quimiocinas α , β , γ y δ , respectivamente. Su estructura consta de un dominio extracelular, compuesto por la región N-terminal y tres hélices extracelulares, que intervienen en la unión de la quimiocina al receptor; y un dominio intracelular compuesto por tres hélices intracelulares y la región C-terminal, que colabora en la transducción de señales [5, 81, 85].

Las funciones clásicas de los receptores de quimiocinas están relacionadas con la migración y la polarización celular. En este aspecto, la señalización de estos receptores dirige la polimerización y contracción de la actina, e induce cambios morfológicos dirigidos a adquirir un fenotipo migratorio polarizado, que permite convertir las fuerzas mecánicas en movimiento eficiente [86, 87]. Estas profundas reorganizaciones celulares se llevan a cabo actuando de forma coordinada sobre diferentes efectores moleculares del citoesqueleto celular y de las moléculas de adhesión. Para ello, los receptores de quimiocinas inician distintas vías de señalización como la de las proteínas $G_{\alpha\beta\gamma}$ heterotriméricas, donde, tras la activación del receptor, el complejo $G_{\alpha\beta\gamma}$ se disocia en el dímero funcional $\beta\gamma$ y la subunidad G_{α} que permanece unida al receptor y a GTP [5]. No obstante, aunque inicialmente se identificó la señalización de estos receptores con la cascada de las proteínas G_i , sensible a la toxina pertúsica [88, 89], recientemente se ha descrito que un mismo tipo de receptor de quimiocinas puede asociarse con distintas proteínas G diferentes de la G_i , como por ejemplo la proteína $G_{q/11}$ o la G_{16} [5]. Esto es debido a que los GPCRs pueden adoptar diferentes conformaciones en la membrana celular, exponiendo distintos residuos responsables para el reconocimiento del ligando y así poder acoplar diferentes proteínas G [90]. Adicionalmente, los GPCRs existen y funcionan como homodímeros o heterodímeros [91, 92]. Considerando que la heterodimerización es necesaria para la función de algunos GPCR, varios estudios han demostrado que los receptores que son perfectamente funcionales como homodímeros también pueden formar heterodímeros con otros GPCR [81, 91, 93-95]. Esto conlleva cambios fenotípicos importantes de los receptores, como alteraciones en su farmacología, acoplamiento a proteínas G y su correspondiente señalización, y la modificación de su regulación y tráfico [96]. Además, el entorno lipídico alrededor del receptor también puede modular la especificidad de los GPCR y el acoplamiento a las proteínas G_{α} [97, 98]. Como consecuencia de la activación del receptor se produce la asociación de la Janus kinasa (JAK) y fosforilación del receptor en tirosina [99]. La fosforilación del receptor con la activación de la ruta de JAK/STAT y la disociación de subunidades de la proteína G, inician respuestas de señalización independientes [5]. Se produce así la activación de la fosfolipasa C (PLC), mediante las subunidades $\beta\gamma$ [100]. Dicha activación de PLC produce la rotura de PIP2 (fosfatidilinositol bisfosfato), para formar IP3 (inositol trifosfato) y DAG (diacilglicerol). El IP3 producido se une a su receptor en el retículo endoplásmico, y como resultado se moviliza Ca^{+2} de depósitos intracelulares, que junto con el DAG activa varias isoformas de PKC (proteína kinasa C). La PKC activa a su vez una ruta de transducción de señales que implica tanto al citoplasma como al núcleo regulando la expresión génica [101]. Por otro lado, el complejo $G_{\beta\gamma}$ interacciona con quinasas de receptor acoplado a proteínas G

(GRKs). De esta forma, $\beta\gamma$, el receptor activado y GRK2 forman un complejo ternario necesario para que el receptor se fosforile correctamente [102]. La fosforilación en Ser/Thr del receptor de quimiocinas por GRKs en el extremo C-terminal y/o en hélices intracelulares (inducida por la quimiocina) es importante para la desensibilización rápida del receptor y su internalización, ya que aumenta su afinidad por proteínas tipo arrestina, que al unirse al GPCR impiden que el receptor siga acoplado a la proteína G [103]. Otras moléculas que intervienen en el “apagado” de los receptores de quimiocinas, además de las GRKs, y arrestinas, son la clatrina y la dinamina. Todo ello conduce a la internalización del receptor hacia el endosoma, donde es defosforilado y, o bien se recicla hacia la superficie de la célula o bien se degrada [5].

Por tanto, mediante la inducción de distintas cascadas de transducción de señales, los receptores de quimiocinas pueden iniciar distintas vías de transducción de señales dirigidas a remodelar el citoesqueleto de actina, y, de este modo, mediar distintas funciones biológicas, como la extravasación, la migración y la polarización de los linfocitos T. Sin embargo, aún se desconocen las moléculas reguladoras implicadas en la traducción de la señalización de los receptores de quimiocinas en reordenamientos del citoesqueleto de actina.

2.1 CXCR4

El receptor de quimiocinas CXCR4 es esencial para la homeostasis, la migración celular, la inflamación, el desarrollo de células B y la metástasis tumoral [104-106]. Como la mayoría de los receptores de quimiocinas, CXCR4 es un receptor de siete dominios transmembrana, que se une a la quimiocina SDF-1 α /CXCL12 (Fig. 6). El dominio extracelular contiene la región amino terminal de unión de quimiocinas, mientras

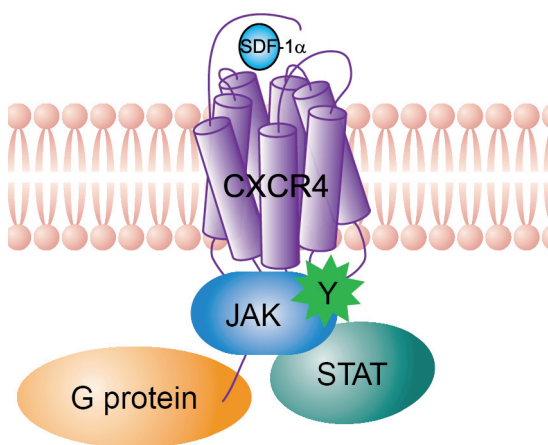


Fig. 6. Receptor de quimiocinas CXCR4.
Modificado de Rodríguez-Frade *et al.*, 2001.

que los bucles intracelulares son responsables de la interacción con proteínas G heterotriméricas [5, 107], que, cuando se activan, inician diferentes vías de señalización a través de la liberación de las subunidades $G\alpha$ y $\beta\gamma$. En este sentido, aunque estudios recientes sugieren que otras proteínas G, como por ejemplo $G_{12/13}$ [108], están implicadas en la transducción de señales de CXCR4, la proteína G que se une a CXCR4 mejor caracterizada es la proteína G_i heterotrimérica [109]. La estimulación de CXCR4 dependiente de SDF-1 α induce la disociación de la subunidad $\beta\gamma$ de la $G\alpha_i$ unida a GTP, que es capaz de difundir por la pared interna de la membrana plasmática para inhibir la función de la adenilato ciclasa, lo que origina la disminución en la concentración citosólica de AMP cíclico (AMPc) [5, 109]. Asimismo, se ha demostrado la señalización desde los receptores acoplados a proteínas G hacia la c-Jun kinasa, dependiente de Ras y Rac-1, también

con la participación de la subunidad $\beta\gamma$ [110, 111]. En este contexto, también se ha demostrado la participación directa del receptor de quimiocinas CXCR4 en las rutas de señalización de proteínas reguladoras de la polimerización de actina como PI3-kinasa [112], y dos efectores de la GTPasa Rho: Rho-kinasa [20], y mDia [113].

Por otro lado, el extremo C-terminal de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) participa en el tráfico intracelular y la regulación de dichos receptores, que entre otras funciones optimizarían la especificidad, la selectividad y la duración de la señal, además de minimizar la comunicación no deseada entre diferentes rutas de señalización [114]. En este sentido, se sabe que CXCR4 interacciona directamente a través de su extremo citoplásmico con quinasas de receptores asociados a proteínas G (GRKs), β -arrestinas [115] y proteínas de la familia JAK/STAT [116], que regulan su reciclaje.

Además, las quimiocinas también activan quinasas de tirosinas como FAK (kinasa de adhesiones focales) y ZAP-70 [117-119]. Otra ruta de señales intracelulares en la que intervienen las quimiocinas y sus receptores es la ruta de las MAP kinasas (MAPK) o ERKs, reguladas por señales extracelulares y activadas por fosforilación en Tyr/Thr. Dado que estas quinasas pueden fosforilar y activar factores de transcripción, esto explicaría la posible implicación de las quimiocinas en la regulación de la expresión génica. En este sentido, las quimiocinas pueden también regular la señalización del TCR, puesto que recientemente se ha descrito una asociación funcional entre CXCR4 y el complejo del TCR [120]. En este aspecto, se ha descrito que la redistribución de los CKRs a la sinapsis inmune mejora la adhesión entre la célula T y la CPA, la producción de citoquinas y la proliferación celular y disminuye la sensibilidad de las células T a otros gradientes de quimiocinas [121].

La relevancia de CXCR4 en la fisiología del sistema inmune nos llevó a plantearnos la búsqueda de efectores moleculares intracelulares de este receptor que medien los cambios del citoesqueleto de actina. Con este objetivo hemos identificado la interacción de CXCR4 con dos proteínas asociadas al citoesqueleto de actina: la miosina no muscular de tipo IIA (MIIA) y la drebrina.

3. El citoesqueleto de actina

La dinámica del citoesqueleto de actina está muy regulada y define las múltiples funciones de la actina celular. Los filamentos proporcionan apoyo mecánico interno, vías para transporte intracelular, y la fuerza necesaria para generar los movimientos de la célula. De este modo, el citoesqueleto determina la morfología celular, y regula las funciones celulares. Así, los filamentos de actina son esenciales para la locomoción celular y las estructuras de adhesión celular [4, 122, 123].

La actina celular existe en dos estados, la actina globular monomérica (G-actina) y los filamentos de actina polimérica (F-actina). Cada filamento de F-actina posee un extremo de crecimiento rápido y otro de crecimiento lento, distinguibles por sus características estructurales

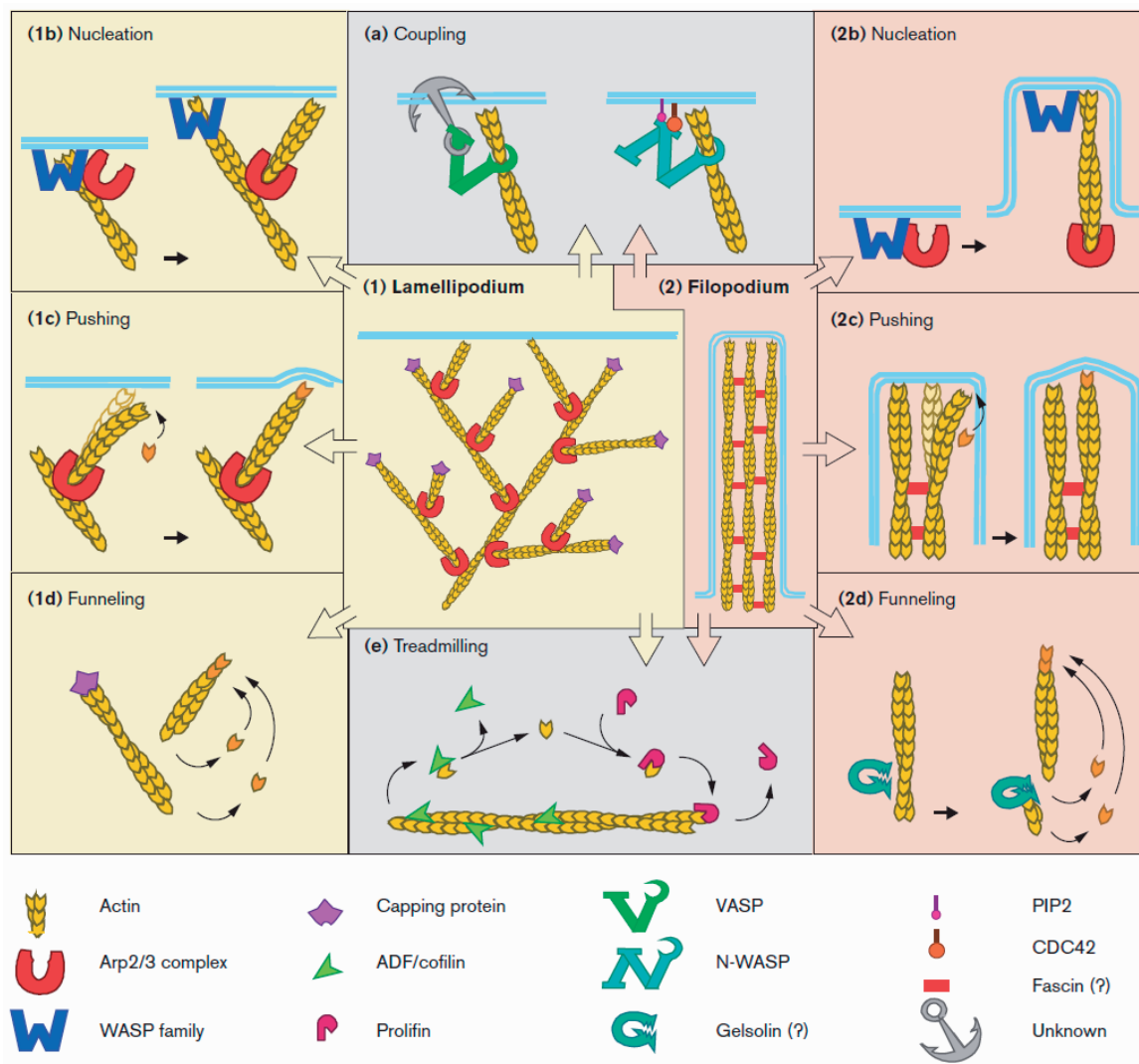


Fig. 7. Acciones del citoesqueleto de actina. Modificado de Borisy, G.G. and Svitkina, T.M., 2000.

y propiedades cinéticas. *In vitro*, la actina se puede autoensamblar (también llamado nucleación) espontáneamente en un proceso que requiere la hidrólisis de ATP, aunque este proceso es cinéticamente desfavorable, siendo varios órdenes de magnitud más lenta que la polimerización de actina observada intracelularmente [124, 125]. Por tanto, en las células, la nucleación y el alargamiento de filamentos de actina son catalizados por una variedad de proteínas nucleadoras y/o remodeladoras de actina, entre las que se incluyen el complejo Arp2/3, la familia de las forminas como mDia, α -actinina, gelsolina, profilina, tropomiosina y cofilina (Fig. 7) [9, 122, 125].

4. Miosina no muscular de tipo II A (MIIA)

Las miosinas constituyen una superfamilia de proteínas motoras que desempeñan un papel importante en varios procesos celulares que requieren fuerza y translocación. Las moléculas de miosina pueden desplazarse a lo largo de los filamentos de actina, impulsar su deslizamiento o

producir tensión en ellos, para lo que requieren de energía que obtienen de la hidrólisis del ATP. Así, las miosinas transportan vesículas celulares, ejercer tensión de los filamentos de actina o reclutar proteínas relacionadas con la adhesión, como integrinas, o moléculas de transducción

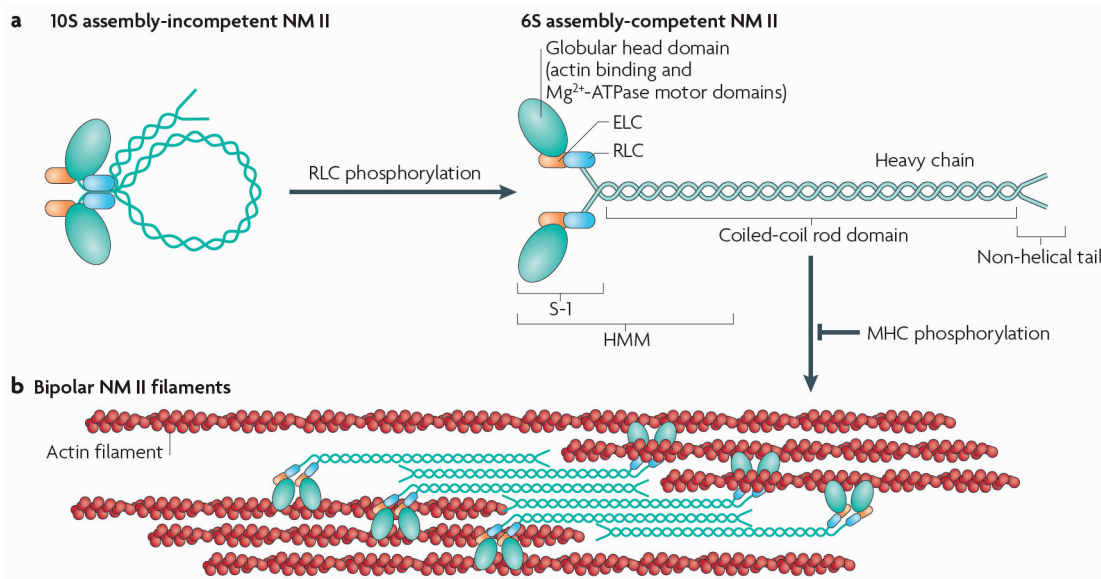


Fig. 8. Estructura de la miosina II A. Modificado de Vicente-Manzanares, M. *et al.*, 2009.

de señales [126].

La MIIA pertenece a la subfamilia de las miosinas no musculares de tipo II, implicadas en múltiples funciones celulares como la polarización celular, la migración, la adhesión, y la citoquinesis [126, 127]. Las moléculas de miosina no muscular de tipo II (MII) se componen de tres pares de péptidos: dos cadenas pesadas de 230 kDa, dos cadenas ligeras reguladoras de 20 kDa que regulan la actividad de la MII, y dos cadenas ligeras esenciales de 17 kDa que estabilizan la estructura de la cadena pesada (Fig. 8) [128, 129]. La MII tiene un papel fundamental en los procesos que requieren remodelación y movimiento celular, tales como la adhesión, la migración y la división celulares debido a que puede utilizar su capacidad entrecruzadora de actina y de contractibilidad, reguladas por fosforilación, y su capacidad de formar filamentos, para regular el citoesqueleto de actina. Las cadenas pesadas tienen un dominio globular que forma la cabeza y por donde se unen al ATP y la actina, seguido de la región del cuello, donde se unen las dos cadenas ligeras funcionalmente diferentes. Así, el dominio del cuello actúa como un brazo de palanca, mientras que la cabeza transforma la energía química del ATP en movimiento mecánico [126, 127]. Tras la región del cuello se dispone una región enrollada en α hélice, que permite la dimerización entre cadenas pesadas y termina en un extremo no enrollado relativamente corto.

Tres genes codifican las cadenas pesadas de las miosinas no musculares de tipo II en mamíferos, produciendo las isoformas MYH9 (MIIA), MYH10 (MIIB) y MYH14 (MIIC) [130, 131]. Sin embargo, el procesamiento alternativo de los ARNm de los distintos genes genera más isoformas [132, 133]. La isoforma MIIC se ha clonado recientemente y la información

disponible sobre ella es escasa [130, 134].

Las isoformas MIIA y MIIB, se descubrieron en humanos a principios de los años 90 [135], sin embargo, las funciones específicas de cada isoforma no están todavía claramente definidas. Algunos autores opinan que ambas proteínas son redundantes funcionalmente, mientras que otros sugieren que sus diferentes características indican diferentes funciones en la célula. La hipótesis más aceptada actualmente otorga funciones diferentes a ambas isoformas, y funciones comunes a ambas, que realizarían con distinta eficiencia, y que serviría de posible mecanismo compensatorio a falta de una de las mismas. La gran homología de la misma isoforma de cadena pesada entre distintas especies sugiere diferentes funciones para ambas proteínas [131]. En consonancia, hay una expresión diferencial de MIIA y MIIB en distintos tejidos y tipos celulares [136]. Asimismo, en células individuales se observa una distribución diferencial localizándose, preferentemente, la MIIA en el frente de avance de las células, mientras que la MIIB está enriquecida en el urópodo [8]. Una posible explicación para la dualidad funcional entre la MIIA y MIIB se basa en las distintas propiedades cinéticas entre ambas [137]. La MIIA se ha implicado en mantenimiento de la forma celular en células HeLa [138], en reparación de membranas [139], en transporte y estabilidad durante la SI [140, 141]. Por el contrario, la MIIB se ha relacionado en desarrollo de cerebro y corazón [142-144], la citoquinesis de miocitos cardiacos [145], motilidad del cono de crecimiento neuronal [146], quimiotaxis y migración de fibroblastos [147, 148] y neuronas [149]. Además, las isoformas MIIA y MIIB se han implicado recientemente en la regulación de la protrusión, la dinámica de la adhesión y la polaridad celular durante la migración de linfocitos [150].

Las interacciones entre MIIA y otras proteínas de la célula permanecen todavía poco explorado. Se ha descrito que MIIA interactúa con los receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR5 [18], Mts1 (proteína que interviene en la metástasis) [151], menina (supresor de tumores) [152] y anillina (proteína implicada en citoquinesis) [153].

5. Drebrina

La drebrina (**d**evelopmentally **r**egulated **b**rain **p**rotein) se describió inicialmente en neuronas y células neurales [154]. La expresión de esta proteína es muy elevada durante la embriogénesis, para luego decaer progresivamente [154, 155]. En concordancia, los niveles de drebrina en el cerebro de humanos adultos sanos sufren un descenso gradual con la edad, excepto en pacientes con Síndrome de Down o Enfermedad de Alzheimer, donde los niveles de drebrina caen drásticamente [156].

La drebrina es una proteína de unión a actina, expresada mayoritariamente en neuronas y células neuronales [155, 157], que ejerce un papel importante regulador en la dinámica de la actina. Un único gen se encarga de generar las dos isoformas mayoritarias: una isoforma adulta (drebrina A), presente principalmente en las espinas dendríticas del cerebro colocalizando con filamentos de actina, y una isoforma embrionaria de menor tamaño (drebrina E), abundante en

el cuerpo celular de las neuronas en desarrollo (Fig. 9) [158, 159]. Sin embargo, también se han descrito otras isoformas minoritarias de menor tamaño debido al procesamiento alternativo del ARNm [160]. Aunque, no se han descrito diferencias funcionales claras entre estas dos isoformas se ha relacionado a la drebrina E en funciones como la migración neuronal y la formación del axón y las dendritas en neuronas, y por otra parte, la posible implicación de la drebrina A en la plasticidad de las espinas dendríticas [161].

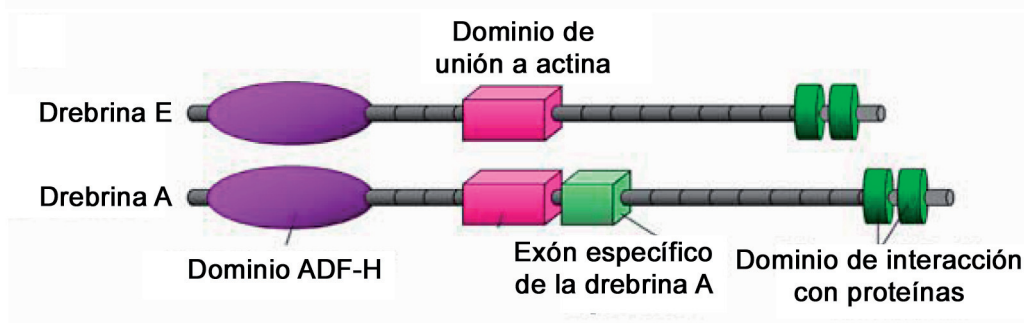


Fig. 9. Estructura de las isoformas de la drebrina. Modificado de Butkevich, E. *et al.*, 2004.

La drebrina regula la dinámica de la actina y la plasticidad neuronal [157, 162-164] uniéndose a la F-actina con una alta afinidad, y compitiendo con proteínas, tales como la fascina, la α -actinina y la tropomiosina [165, 166]. Asimismo, se ha descrito que la drebrina regula la actividad de la miosina [167], además de interactuar directamente con la proteína de unión a actina profilina [168]. Por otro lado, la unión de la drebrina a F-actina también facilita el reclutamiento de otras proteínas reguladoras, como la gelsolina. En consecuencia, la sobreexpresión de la drebrina disocia la tropomiosina de filamentos de actina, e induce cambios dramáticos en las fibras de estrés y la formación de protrusiones parecidas a las dendritas [158, 162, 167, 169], sugiriendo un importante papel para la drebrina en la morfogénesis neuronal [165, 169]. Por otra parte, recientemente se ha incluido a la drebrina dentro de la familia de proteínas ADF-H, que unen actina y comparten el factor de despolimerización de actina, y al menos un dominio SH3 [170].

Por otro lado, la descripción de la expresión de drebrina en otros tejidos no neuronales como el epitelio del estómago e hígado [171, 172], sugieren que esta proteína podría estar regulando la dinámica de la actina en otros sistemas celulares.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

En este estudio se han identificado y analizado funcionalmente distintas conexiones del receptor de quimiocinas CXCR4 con el citoesqueleto celular. El abordaje experimental se ha centrado en los siguientes objetivos específicos:

- Identificación y caracterización de proteínas intracelulares que se asocian con la región citoplásmica del receptor de quimiocinas CXCR4 en linfocitos T.

- Función inmune de la interacción entre el receptor de quimiocinas CXCR4 y la Miosina II A.

- Función inmune de la interacción entre el receptor de quimiocinas CXCR4 y la proteína de unión a actina, drebrina:
 - Análisis de la localización subcelular y dinámica de la interacción de CXCR4 con drebrina durante la formación de la sinapsis inmune.
 - Análisis de la relevancia funcional de la interacción CXCR4 y drebrina en el modelo de sinapsis inmune.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Células.

La línea celular T humana derivada de Jurkat V β 8⁺ J77 cl20, las células linfoblastoides B Raji y las células de epitelio de riñón humano 293T se han crecido en medio RPMI 1640 suplementado con suero de ternera fetal descomplementado al 10% (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células de feocromocitoma de rata PC12 se han obtenido de la ATCC (Número de ATCC CRL-1721TM) y se han crecido en medio F-12K suplementado con suero de ternera fetal al 10% y suero de caballo al 5% (Gibco). Los linfocitos T de sangre periférica y los linfoblastos T se han obtenido y se han cultivado como se ha descrito previamente [112].

Anticuerpos y reactivos.

El anticuerpo monoclonal (AcM) de ratón biotilado anti-CXCR4 es de Becton-Dickinson Pharmingen (B-D Pharmingen, San Diego, CA); los anticuerpos policlonales (AcP) dirigidos frente a la región N-terminal de CXCR4 y el anti-CXCR4 total son de Sigma (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, CA) respectivamente. Los AcP de conejo frente a MIIA y MIIB son de Covance (Princeton, NJ). El AcM de ratón anti-drebrina (clon M2F6) es de MBL (MBL, Santa Cruz Biotechnology, CA) y el AcP anti-drebrina es de Sigma. Los AcM de ratón anti- α -tubulina sin marcar o marcados con FITC se han obtenido de Sigma. El AcM de ratón anti-TCR V β 8 es de B-D Pharmingen. Los AcM de ratón: HP2/19 (anti-ICAM-3), TP1/55 (anti-CD69) [64], T3b (anti-CD3), HP2/1 (anti- α 4-integrin), y CD28.2 (anti-CD28) [173], HP2/6 (anti-CD4) [174] han sido descritos previamente; el Hu5/3 (anti-ICAM-1) ha sido proporcionado por la Dra. E. A. Wayner (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA); y el AcP de conejo 448 (anti-CD3zeta) ha sido proporcionado por el laboratorio del Dr. B. Alarcón (Centro de Biología Molecular, Madrid). El AcM L5.1 frente al receptor de transferrina y la transferrina han sido proporcionados por el laboratorio del Dr. M. Alonso (Centro de Biología Molecular, Madrid). Las sondas fluorescentes CMAC y CM-TMR, y todos los anticuerpos secundarios conjugados con diferentes fluorocromos son de Molecular Probes (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP se han comprado a Pierce (Rockford, Illinois).

La fibronectina humana, la poli-L-lisina y la γ -globulina humana se han obtenido de Sigma, y el superantígeno bacteriano enterotoxina estafilocócica E (SEE) se ha obtenido de Toxin Technology (Sarasota, FL). La quimiocina recombinante humana SDF-1 α /CXCL12 es de R&D (Minneapolis, MN). El inhibidor químico blebistatina se ha obtenido de Calbiochem (Darmstadt, Alemania). El reactivo de bloqueo TNB es de Boehringer Mannheim (Alemania). Las secuencias de oligonucleótidos (oligos) cebadores utilizadas para la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) semicuantitativa a tiempo real han sido las siguientes:

Oligos	Secuencia 5'-3' Directa	Secuencia 5'-3' Inversa
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC
IL-2	AAGTTTTACATGCCCAAGAAGG	AAGTGAAAGTTTTTGCTTTGAGC

Las construcciones fusionadas con la proteína verde fluorescente (EGFP) GFP-drebrina A wt, GFP-drebrina E wt, GFP-drebrina 1-271, GFP-drebrina 1-366, GFP-drebrina 319-707 [175], con la proteína fluorescente azul cyan (ECFP) CFP-drebrina [176] y con la proteína fluorescente amarilla (EYFP) CXCR4-YFP [93] han sido descritas previamente. La región citoplasmática del receptor CXCR4 fusionada a la proteína Glutation S Transferasa (GST) (GST-CXCR4Cyt) ha sido descrita previamente [18]. El vector vacío EGFP se ha obtenido de Clontech (Clontech, Invitrogen, Carlsbad, CA) y el vector vacío de la GST es de GE Healthcare Bio-Sciences AB (SE-751 84 Uppsala, Sweden). El ARNi control negativo se ha comprado a Eurogentec (Seraing, Bélgica) y el conjunto de ARNi específicos frente a la drebrina son de Dharmacon (Lafayette, CO). Las secuencias de oligos interferentes frente a la MIIA se han obtenido de Eurogentec y son las siguientes:

Oligos	ARNi MIIA 1	ARNi MIIA 2
Secuencia 5'-3'	GGCGACCUAUGAGCGGAUG	GGAGCGGAACACUGACCAG

Transfecciones celulares.

Las células J77 (2×10^7) han sido electroporadas en 400 μ l de medio Optimem frío (Gibco) a 240 V y 950 μ F con DNA (20 μ g) o con ARNi (1,25 μ M) utilizando un electroporador Gene Pulser II de BioRad (Hercules, CA). La expresión de las proteínas fluorescentes y el silenciamiento por ARNi han sido comprobados por citometría de flujo y *Western Blot* respectivamente a las 24, 48 y 72 h tras la transfección.

Inmunofluorescencia de la endocitosis.

Los PBLs o las células T J77 se adhirieron a cubreobjetos recubiertos de fibronectina a 25 μ g/ml o 50 μ g/ml respectivamente durante 30 min a 37°C, se trataron con SDF-1 α durante los tiempos indicados y se fijaron con paraformaldehído al 3%. Para los ensayos de inmunofluorescencia, las muestras se bloquearon con BSA al 1% durante 30 min a 37°C, tras lo cual se tñieron con los anticuerpos primarios específicos indicados durante 30 min a 37°C seguidos por anticuerpos secundarios específicos marcados con el correspondiente fluorocromo Alexa. Las muestras se han examinado con un microscopio confocal Leica TCS-SP2. Las imágenes se han analizado con los programas informáticos del confocal de Leica, el Adobe PhotoShop CS (Adobe Systems).

Ensayos de endocitosis.

Las células T J77, transfectadas o no, se tratan durante 1 h a 37°C con SDF-1 α (300 nM) o con transferrina (500 μ g/ml), tras lo cual se centrifugan y se resuspenden en 50 μ l de

tampón ácido (Glicina 150 mM a pH 2.3) durante 3 min. Después las células se fijan con paraformaldehído al 2%. Para los ensayos de endocitosis en cinética, las células T J77 se tratan con SDF-1 α (300 nM) durante 1 h a 37°C y tras lavarlas con PBS se dejan que se recuperen en medio de cultivo.

Las células se someten a los tratamientos indicados, y se comprueban mediante citometría de flujo con un citómetro FACScan (Becton Dickinson) que la expresión basal de los receptores no se afecta con los diferentes tratamientos utilizados. El análisis del porcentaje del receptor CXCR4 internalizado en relación con el nivel en reposo, se ha cuantificado usando o bien la citometría de flujo para estudiar la expresión en la membrana celular en células no permeabilizadas o bien la microscopía confocal, para estudiar la señal de los compartimentos de membrana o submembranosa en relación con la señal total en los cortes confocales mediante el programa informático del confocal de Leica (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania).

Ensayos de quimiotaxis.

Las células T J77 (3×10^5) tratadas según se indica, se resuspenden en 100 μ l de medio RPMI con albúmina de suero bovino al 0,2% en la cámara superior del *Transwell* (8 μ m, Costar). En la cámara inferior se añaden 600 μ l de medio RPMI con albúmina de suero bovino al 0,2% con o sin SDF-1 α 100nM según se indica, y se dejan transmigrar las células 3-4 h. El número de células transmigradas se determina mediante citometría de flujo.

Inmunofluorescencia y videomicroscopía de la formación de conjugados entre células T y B.

La formación de conjugados se ha realizado como se ha descrito previamente [64]. Para distinguir las CPA de las células J77, las células Raji se cargan previamente con la sonda fluorescente CMAC (10 μ M), tras lo cual se incuban con SEE (1 μ g/ml) durante 20 min a 37°C o sin superantígeno. A continuación, las células J77 se mezclan con las células Raji en proporción uno a uno y se incuban 15 min a 37°C. Los conjugados formados se plaquean en cubreobjetos recubiertos de PLL (50 μ g/ml), y se incuban 15 min a 37°C, tras lo cual se fijan en paraformaldehído al 4%. Para los ensayos de inmunofluorescencia, las muestras se bloquean con reactivo de bloqueo TNB y γ -globulina humana (100 μ g/ml) durante 30 min a 37°C, tras lo cual se tiñen con los anticuerpos primarios específicos indicados durante 30 min a 37°C seguidos por anticuerpos secundarios específicos marcados con el correspondiente fluorocromo Alexa. Las muestras se han examinado con un microscopio DMR de fluorescencia de campo ancho (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) usando el software Leica QFISH 1.0; o con un microscopio confocal Leica TCS-SP1 o Leica TCS-SP5. Las reconstrucciones 3D de las secciones confocales (de 0,118 μ m de separación en el eje vertical) han sido montadas con los programas informáticos del confocal de Leica, el Adobe PhotoShop CS (Adobe Systems) y el

ImageJ. En las cuantificaciones se han analizado un mínimo de 300 conjugados por condición y experimento. Los experimentos de videomicroscopía se han realizado como se ha descrito previamente [64]. Las células J77 transfectadas transitoriamente se adhieren en cubreobjetos recubiertos con FN (25 $\mu\text{g/ml}$), que se colocan en una cámara con medio HBSS suplementado con suero de ternera fetal al 2% (Gibco). Entonces se añaden a la cámara las células Raji cargadas previamente con la sonda fluorescente CM-TMR (5 μM) y con SEE (1 $\mu\text{g/ml}$). Las células se mantienen a 37°C y 5% de CO_2 y las imágenes se adquieren con un microscopio confocal Leica TCS-SP1 o con la estación de trabajo multidimensional de Leica.

Preparación de GST, ensayos de precipitación *Pull Down* y análisis proteómico.

El método de producción de la GST y de la GST-CXCR4Cyt, y el análisis proteómico han sido descritos previamente [18]. Para los ensayos de precipitación *Pull Down*, las células J77 (10^8) o las células 293T (10^7) se han lisado en un tampón TBS con Nonidet P-40 al 1,2% y una mezcla de inhibidores de proteasas, y se han centrifugado a 14.000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se ha incubado con microesferas de Sefarosa acopladas a Glutation (GE Healthcare) durante 2 h, y después con microesferas de Sefarosa acopladas a Glutation con la GST o con la GST-CXCR4 Cyt durante 1 h. Tras la precipitación, las microesferas de Sefarosa acopladas a la Glutation se lavan con tampón de lisis, y se resuspenden en tampón de carga Laemmli. Las muestras se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y, o bien se procesan para las técnicas de espectrometría de masas, o bien se transfieren a una membrana de nitrocelulosa para analizarlas con anticuerpos específicos anti-drebrina mediante *Western Blot*.

Inmunoprecipitación y *Western Blot*.

Los linfocitos J77 (6×10^7) se han lisado en tampón PBS con NP-40 al 1,2% o con CHAPS al 1,5% suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas. Los lisados se centrifugan a 14.000 g durante 10 min a 4°C, y los sobrenadantes de los lisados celulares se incuban durante 2 h a 4°C con microesferas CNBr (activadas con bromuro de cianógeno) bloqueadas con albúmina de suero bovino (BSA), tras lo cual, se incuban con los anticuerpos indicados acoplados covalentemente a microesferas CNBr. Los precipitados se lavan con tampón de lisis y se resuspenden en tampón de carga Laemmli. Las muestras se han separado mediante SDS-PAGE y se han transferido a membranas de nitrocelulosa para analizarlas mediante *Western Blot* con los anticuerpos específicos indicados. Los experimentos de cinética de asociación molecular mediante co-inmunoprecipitación se han realizadn preincubando las células J77 a 37°C con células Raji precargadas con SEE durante los tiempos indicados antes de la lisis.

Análisis de activación de las células T.

Las células J77 (10^5) se han transfectado transitoriamente con oligonucleótido de ARNi,

y después se han incubado con células Raji (10^5) en presencia o ausencia de SEE ($0,3 \mu\text{g/ml}$) durante 17 h a 37°C . La expresión de CD69 en membrana y la secreción de IL-2 se han determinado como se ha descrito previamente [64]. En los ensayos de PCR semicuantitativa a tiempo real para determinar los niveles de ARN mensajero de la IL-2, el ARN total ha sido aislado de lisados celulares mediante el reactivo Ultraspec RNA (Biotecx, Houston, Texas). Para sintetizar ADNc, la reacción de la transcriptasa inversa (RT) se ha realizado usando $2 \mu\text{g}$ de ARN tratado con DNasaI y la transcriptasa inversa ImProm-II (Roche Diagnostics Ltd, Lewes, UK). La expresión génica se ha analizado mediante PCR a tiempo real basada en SYBR Green con un termociclador rápido Lightcycler (Roche). Se han utilizado oligos específicos para la interleuquina IL-2, que generan productos de unas 200 pb de longitud. El resultado para la citoquina se normaliza en relación a los niveles de expresión de GAPDH, que se han medido en paralelo en cada muestra.

Citometría de flujo.

Las células han sido incubadas con γ -globulina humana ($100 \mu\text{g/ml}$) en PBS durante 30 min a 4°C para bloquear los receptores de inmunoglobulinas, y después con el AcM primario correspondiente durante 30 min a 4°C . Tras lavar, las células se han incubado con un anticuerpo secundario acoplado a FITC a 4°C y se han analizado un mínimo de 10.000 células por condición y experimento con un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Los resultados se analizan con el programa informático Cell-Quest Pro (Becton Dickinson).

Análisis de la polimerización de actina de la célula T en la zona de contacto con la CPA.

Los conjugados se forman entre las células J77 control o J77 silenciadas para drebrina y las CPAs cargadas o no con SEE. Los conjugados se han fijado con paraformaldehído al 4% y se han adquirido mediante visualización confocal como se ha indicado anteriormente. La actina polimerizada se detectada mediante la tinción con faloidina conjugada con un fluorocromo Alexa, y las imágenes se analizan con el programa informático imageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>). Utilizando regiones de interés (ROIs) del mismo área para todas las medidas, se ha cuantificado la señal generada en la zona de contacto T-CPA (SI), en un área de la membrana de la CPA no en contacto con la célula T (B), en un área de la membrana de la célula T no en contacto con la CPA (T), y en el fondo (Bg). Primero se resta la señal Bg de todas las demás medidas, y entonces se mide la acumulación de actina en la SI en relación al resto de la célula T, de acuerdo a la fórmula $[\text{SI}-\text{B}]/\text{T}$. Para los cálculos se ha asumido que la acumulación de actina era homogénea en la CPA, sin una acumulación adicional en la zona de contacto con la célula T.

Análisis por transferencia de energía resonante de fluorescencia (FRET).

Las células J77 (10^5) se han co-transfectado con CFP-drebrina y CXCR4-YFP. A las 24 h se han incubado 15 min a 37°C solas, o con células Raji cargadas con CMAC (en proporción uno a uno) presentando o no el SEE. Después, se han plaqueado en cubreobjetos recubiertos de PLL (50 $\mu\text{g/ml}$), y se han incubado 15 min a 37°C, tras lo cual se fijan en paraformaldehído al 4%. Las imágenes se han adquirido con un microscopio confocal láser de barrido TCS-SP5 y se han analizado con el programa informático ImageJ FRETcalc Versión 3.0 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fret/fret-calc.html>) para FRET mediante la técnica de quemado del aceptor y con el Adobe PhotoShop CS.

Análisis estadístico.

En primer lugar se ha comprobado la normalidad de los resultados utilizando la prueba de normalidad de *D'Angostino & Pearson*. Las diferencias entre medias han sido comprobadas mediante la prueba *t de Student* para los resultados con distribución normal, mientras que para los resultados que no cumplen la condición de normalidad se han analizado con la prueba *U de Mann Withney*. Los resultados de secreción de IL-2 han sido analizados con la prueba *Wilcoxon signed rank*. Se consideran diferencias significativas con un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Identificación de proteínas del citoesqueleto celular que se asocian con el receptor de quimiocinas CXCR4.

Tras unirse a su ligando, los receptores de quimiocinas inducen una serie de cascadas de señalización en el interior celular que desencadena una profunda reorganización del citoesqueleto celular. Esta reorganización permite adaptar el citoesqueleto a las necesidades funcionales de las células, y así reubicar los receptores de quimiocinas en aquellos lugares subcelulares donde ejercen su función. Sin embargo, aún se desconocen los efectores moleculares que regulan la actividad de estos receptores y que transmiten estos cambios al citoesqueleto celular.

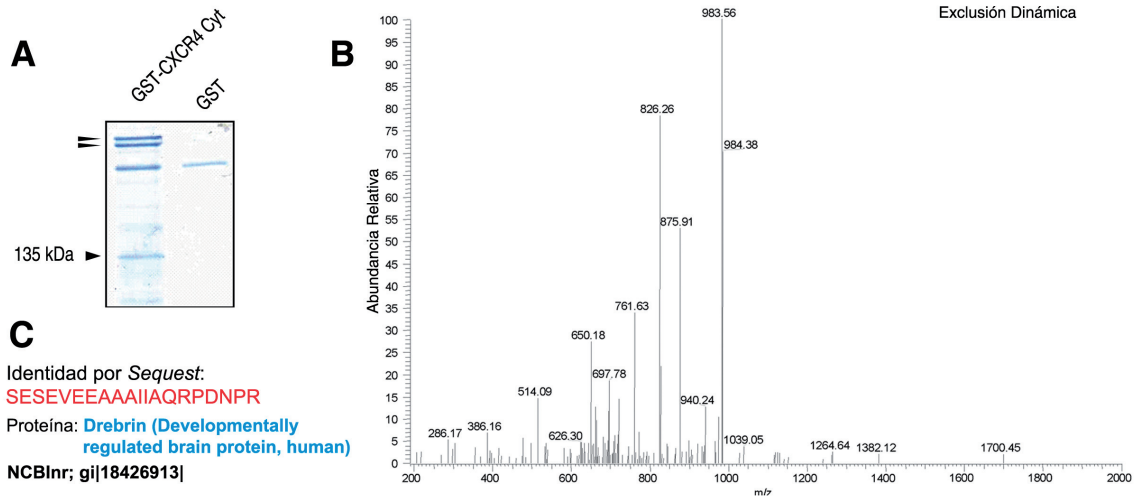


Fig. 10. El receptor de quimiocinas CXCR4 se asocia a la MIIA y a la drebrina. **A)** Identificación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de una banda específica de 135 kDa en el carril correspondiente al *Pull Down* precipitando con la construcción GST-CXCR4 Cyt en lisados de células T J77 en reposo. Se ha utilizado la construcción de la GST sola como control de especificidad. Las dos bandas de proteína de 220 y 230 kDa (cabezas de flecha estrechas) se corresponden a la cadena pesada de la MIIA. **B)** y **C)** El análisis proteómico de los péptidos digeridos en las bases de datos confirma la identidad de la banda específica de 135 kDa de las condiciones experimentales de A como drebrina.

Con objeto de identificar nuevas proteínas intracelulares que se asocien con el receptor de quimiocinas CXCR4 y que puedan regular su función durante la respuesta inmune, se ha estudiado la interacción de dicho receptor con otras moléculas intracelulares mediante un análisis proteómico. Para ello, se ha generado una proteína de fusión entre la Glutacion S Transferasa (GST) y la región citoplasmática del receptor CXCR4 (GST-CXCR4 Cyt), como se ha descrito previamente [18]. Con esta proteína se han realizado experimentos de precipitación *Pull-Down* utilizando lisados de linfocitos T J77 en reposo, en los que se han detectado tres bandas de proteínas, de 135, 220 y 230 kDa de peso molecular, unidas específicamente a la región citoplasmática de CXCR4 (Fig. 10A). El análisis proteómico ha identificado la banda

de 135 kDa de peso molecular como drebrina, una proteína de unión al citoesqueleto de actina descrita inicialmente en células neuronales [158, 160, 162, 165, 177] (Fig. 10B y C). Por otro lado, las dos bandas restantes de 220 y 250 kDa de peso molecular se corresponden a las cadenas pesadas de la miosina no muscular de tipo II A [18] (Fig. 10A).

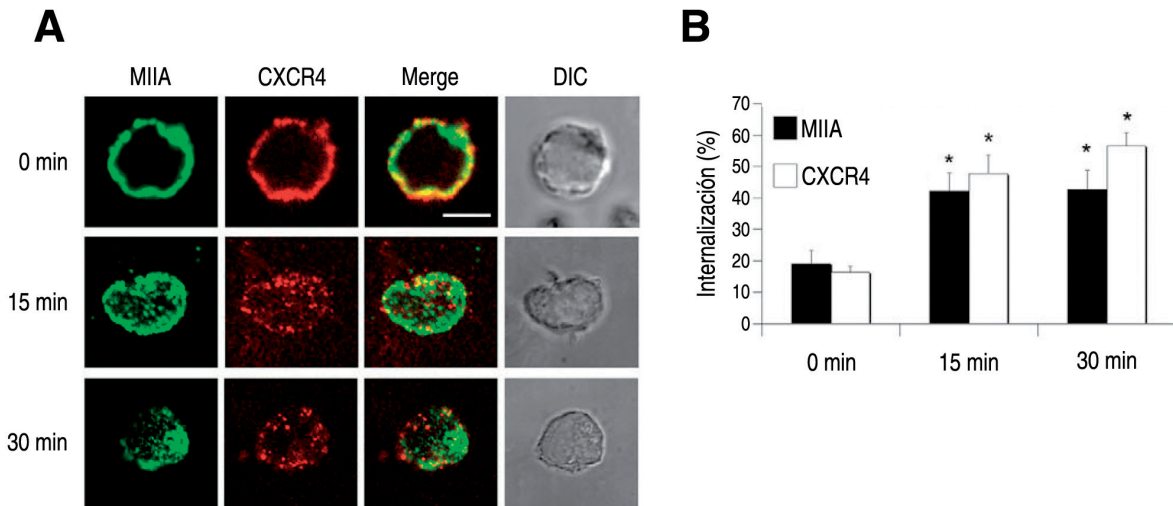


Fig. 11. Análisis de la endocitosis de CXCR4 y MIIA inducida por SDF-1 α en PBLs. **A)** Análisis mediante microscopía confocal de la localización subcelular del receptor CXCR4 (rojo) y la MIIA (verde) en PBLs sin tratamiento (0 min) o tratados con SDF-1 α 300 nM durante los tiempos indicados (15 y 30 min). La barra representa 5 μ m. **B)** Análisis de la internalización del receptor CXCR4 y la MIIA, para las condiciones experimentales de A. Los resultados representan la media del porcentaje de internalización \pm s.d. en 10 células distintas de 2 experimentos independientes. $p < 0,05$ (*).

2. Análisis de la función de la interacción del receptor de quimiocinas CXCR4 y la miosina II A.

2.1 El receptor CXCR4 y la miosina II A se internalizan en linfocitos T de forma dependiente de SDF-1 α .

Se ha evaluado el posible papel de la interacción entre CXCR4 y la proteína motora MIIA en la internalización del receptor inducida por SDF-1 α en células T. Puesto que el análisis proteómico revela que tanto el receptor CXCR4 como la MIIA están interaccionando basalmente en células T en reposo, se ha planteado analizar la localización de ambas moléculas en células sin estimular y estimuladas con SDF-1 α . En este sentido, los experimentos de inmunofluorescencia mediante microscopía confocal muestran que tanto CXCR4 como la MIIA se encuentran a lo largo de la membrana celular y en compartimentos submembranosos respectivamente en PBLs en reposo (Fig. 11A). Tras estimular las células con SDF-1 α durante 15 min, se observa que la mayor parte de la señal de ambas moléculas colocaliza en vesículas citoplasmáticas. Sin embargo, después de la internalización temprana, tras estimular las células con SDF-1 α durante 30 min, apenas hay colocalización entre ambas señales (Fig. 11A). El análisis cuantitativo ha

mostrado que ambas moléculas se internalizan con una eficiencia similar a los 15 min, mientras que a los 30 min el receptor se internaliza con una mayor eficiencia (Fig. 11B).

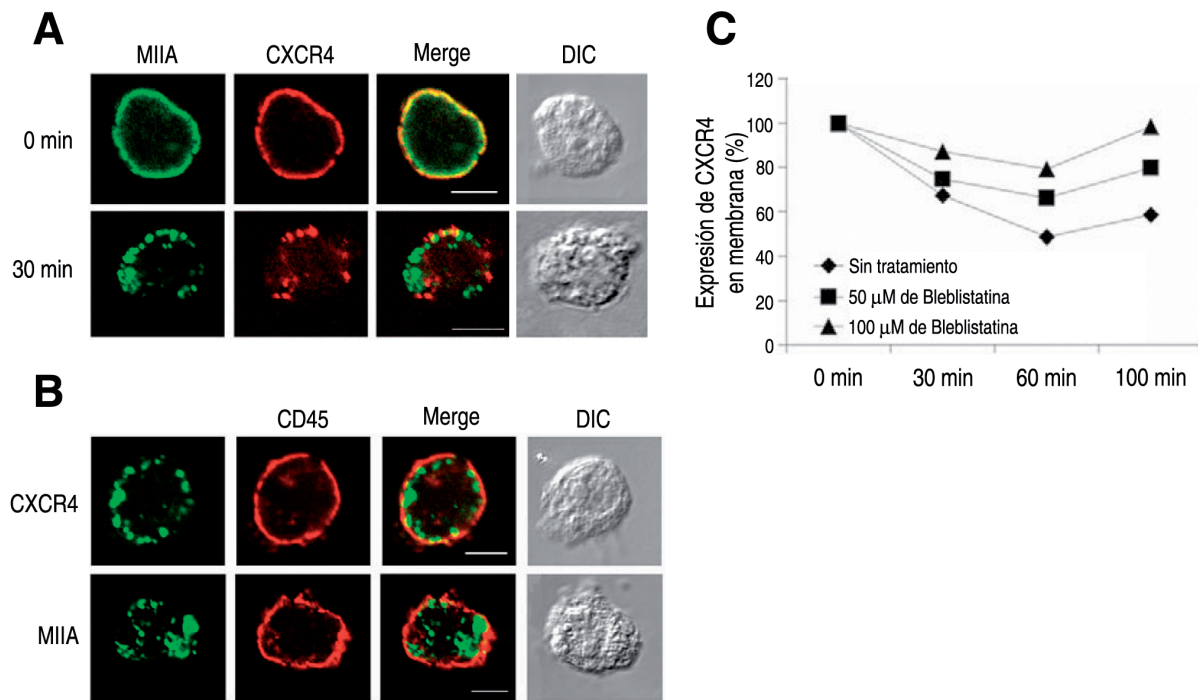


Fig. 12. Análisis de la endocitosis de CXCR4 y MIIA inducida por SDF-1 α en células J77. **A)** Análisis mediante microscopía confocal de la localización subcelular del receptor CXCR4 (rojo) y la MIIA (verde) en células T J77 sin tratamiento (0 min) o tratadas con SDF-1 α 300 nM durante 30 min. **B)** Análisis mediante microscopía confocal de la localización subcelular del receptor CXCR4 y la MIIA (ambos en verde) en relación a la tinción de CD45 (rojo) en células T J77 tratadas con SDF-1 α 300 nM durante 30 min. CD45 se usa como control de una molécula de membrana que no se internaliza en respuesta a SDF-1 α . La barra representa 5 μ m. **C)** Análisis de la internalización del receptor CXCR4 mediante citometría de flujo. La gráfica representa el porcentaje de expresión de CXCR4 en membrana en relación a las células T J77 sin estimulación (0 min), sin pretratar (Sin tratamiento) o pretratadas con blebbistatina 50 μ M o 100 μ M, y estimuladas con SDF-1 α 300 nM durante los tiempos indicados (0, 30, 60 y 100 min). Los niveles de expresión de CXCR4 en membrana previos a la estimulación con SDF-1 α no se vieron afectados por el pretratamiento con blebbistatina, estando comprendidos entre 80-100 unidades relativas de fluorescencia. Se muestra un experimento representativo de 6 experimentos independientes.

Estos experimentos se han repetido en células T J77 corroborando los resultados de los experimentos realizados en los PBLs. Mientras que en reposo ambas moléculas colocalizan en la membrana plasmática, a los 30 min de tratamiento con SDF-1 α se observa una internalización de ambas proteínas (Fig. 12A). Como control de tinción de membrana, se ha analizado la localización de un receptor de membrana no relacionado con este fenómeno, CD45, en relación a la tinción de CXCR4 y de la MIIA, observando que permanece en la membrana y no se internaliza tras el tratamiento con SDF-1 α (Fig. 12B). Además, los experimentos de internalización de CXCR4 realizados con blebbistatina, un inhibidor específico de la actividad motora de miosinas no musculares, confirman la implicación de la MIIA en la endocitosis de este receptor inducida por ligando (Fig. 12C). Por el contrario, la blebbistatina no altera la endocitosis de otro receptor de membrana como el de transferrina (resultados no mostrados).

2.2 La interferencia en linfocitos T de la miosina II A inhibe la endocitosis del receptor CXCR4 dependiente de SDF-1 α e incrementa la respuesta quimiotáctica.

Para evaluar el papel de la MIIA en el proceso de endocitosis del receptor CXCR4, se han transfectado células J77 con dos oligos interferentes diseñados para inhibir la expresión la MIIA, y se ha analizado la endocitosis de CXCR4 inducida por SDF-1 α mediante citometría de flujo. Tal como se ha comprobado mediante *Western-Blot*, cada uno de los oligos interferentes inducen un silenciamiento parcial de la MIIA en células J77 entorno al 30% - 50%, sin afectar a la expresión de la MIIB, mientras que en las células transfectadas con un oligo interferente control no se ve disminuida su expresión (Fig. 13A). Aunque el silenciamiento de la MIIA es parcial, se han detectado mayores cantidades de CXCR4 en la superficie celular tras el

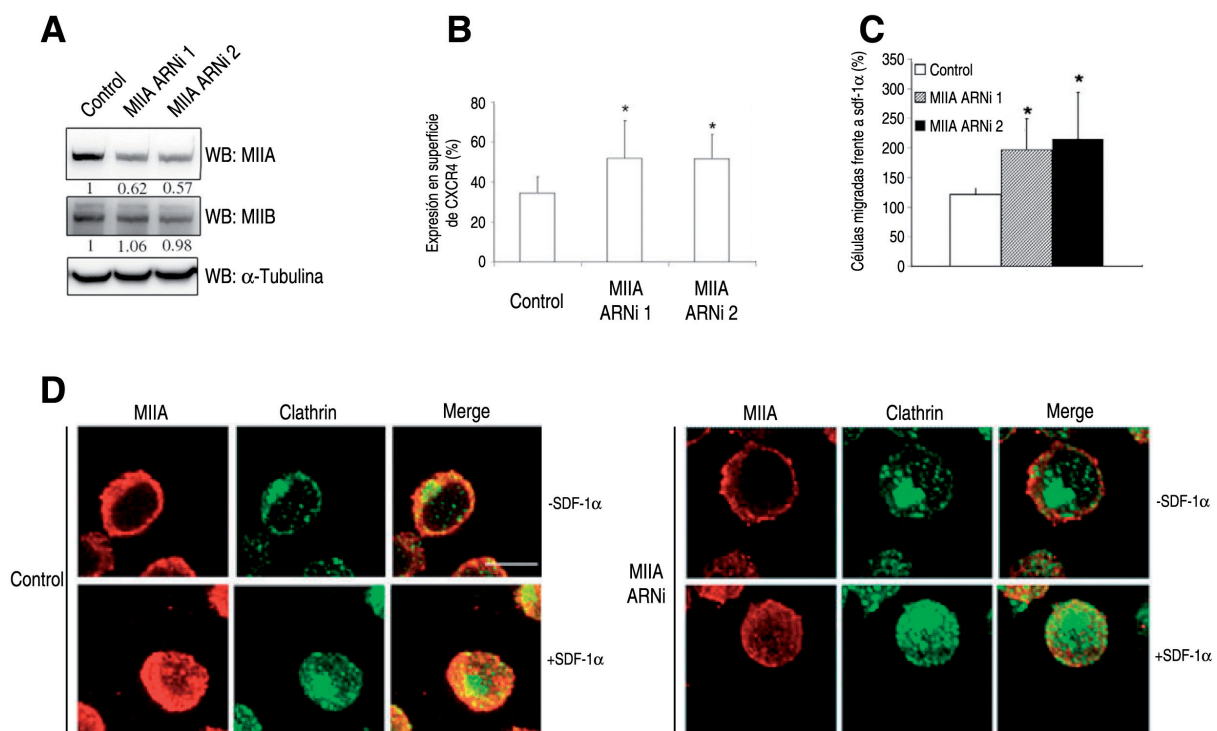


Fig. 13. El silenciamiento de la MIIA inhibe la endocitosis de CXCR4 mediada por SDF-1 α . **A)** Análisis mediante *Western Blot* de la expresión de la MIIA y la MIIB en células T J77 transfectadas con ARN interferentes control o dirigidos frente a la MIIA (MIIA1 y MIIA2). Se ha utilizado el marcaje de α -tubulina como control de carga. Los números indican la cuantificación de las cargas de la MIIA y la MIIB, corregidas con la carga de tubulina y normalizadas frente a las células control. WB: anticuerpo usado en la inmunodetección mostrada. **B)** Análisis mediante citometría de flujo de la internalización del receptor CXCR4 en células T J77 transfectadas con ARN interferentes control o dirigidos frente a la MIIA (MIIA1 y MIIA2). Los resultados representan la media \pm s.d. del porcentaje de expresión de CXCR4 en membrana después de 30 min de tratamiento con SDF-1 α 300 nM de 6 experimentos independientes. Los niveles de expresión de CXCR4 en la membrana plasmática en las muestras sin tratar no se afectaron con la transfección de los distintos ARN interferentes, estando comprendidos entre 90-120 unidades relativas de fluorescencia. $p < 0,05$ (*). **C)** Incremento de la respuesta migratoria frente a SDF-1 α 100nM en células T J77 transfectadas con ARN interferentes control o dirigidos frente a la MIIA (MIIA1 y MIIA2). Los resultados representan la media \pm s.d. del porcentaje de células migradas en respuesta a SDF-1 α normalizado frente a células sin tratar con SDF-1 α de 3 experimentos independientes. $p < 0,05$ (*). **D)** Análisis mediante microscopía confocal de la localización subcelular de la MIIA (rojo) y la clatrina (verde) en células T J77 transfectadas con ARN interferente control o dirigido frente a la MIIA y estimuladas o no con SDF-1 α 300nM durante 30 min. La barra representa 5 μ m.

tratamiento con SDF-1 α , sugiriendo que la interferencia de la MIIA bloquea la endocitosis del receptor CXCR4 (Fig. 13B).

En otro aspecto, al estudiar la relación funcional entre el receptor CXCR4 y la MIIA, se ha observado que las células T transfectadas con los oligos interferentes frente a la MIIA tienen una mayor respuesta migratoria hacia SDF-1 α en comparación con las células control (Fig. 13C). Además, la interferencia de la expresión de la MIIA endógena no parece alterar la formación de las vesículas de clatrina, puesto que en el análisis mediante microscopía confocal no se observan diferencias en el patrón de tinción de la clatrina tanto en células transfectadas con el oligo control como en células transfectadas con el oligo interferente específico frente a la MIIA (Fig. 13D). Estos resultados revelan una implicación funcional de la MIIA sobre la función del receptor CXCR4.

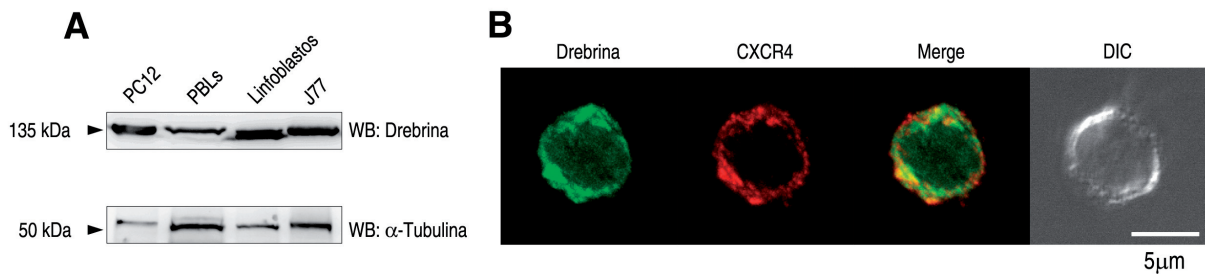


Fig. 14. La drebrina se expresa en linfocitos T y colocaliza con CXCR4 en la membrana de células en reposo. **A)** Análisis mediante *Western Blot* de la expresión de drebrina en lisados totales de una línea celular neural (PC12), linfocitos primarios de sangre periférica (PBLs), linfoblastos T primarios y en la línea celular T J77. Se ha utilizado el marcaje de α -tubulina como control de carga. WB: anticuerpo usado en la inmunodetección mostrada. **B)** Análisis mediante microscopía confocal de la localización subcelular de la drebrina (verde) y el receptor CXCR4 endógeno (rojo) en células T J77 en reposo. Se muestra la proyección máxima. La barra representa 5 μ m.

3. Análisis de la función de la interacción del receptor de quimiocinas CXCR4 y la drebrina en la función inmune.

3.1 La drebrina se expresa en linfocitos primarios y se asocia con el receptor de quimiocinas CXCR4 mediante su región amino terminal.

A continuación se ha analizado la expresión de la drebrina en células linfoides primarias, y así descartar que pudiera ser una particularidad de la línea celular J77 utilizada en el análisis proteómico. Se ha confirmado la presencia de drebrina mediante análisis por *Western Blot* en lisados celulares de linfocitos de sangre periférica (PBLs) y de linfoblastos T diferenciados, obtenidos de varios donantes distintos, así como en lisados celulares de la línea de linfocitos T J77 utilizada en el análisis proteómico, y en células neurales PC12, donde previamente se había descrito su expresión (Fig. 14A). De forma paralela, se ha analizado la expresión y la localización subcelular del receptor CXCR4 y la drebrina en células J77 en reposo mediante visualización por microscopía confocal de fluorescencia, comprobando que ambas proteínas

colocalizan en la región de la membrana plasmática (Fig. 14B).

De forma complementaria se ha llevado a cabo un estudio bioquímico para comprobar la identidad de la proteína de 135 kDa asociada a la región citoplasmática del receptor CXCR4. Con este fin, se han realizado experimentos de precipitación *Pull Down* usando la construcción GST-CXCR4 Cyt en lisados de células J77 en reposo, y se han analizado mediante *Western Blot* con anticuerpos dirigidos frente a la drebrina. La proteína de 135 kDa es reconocida específicamente por el anticuerpo anti-drebrina (Fig. 15A). Además, se ha confirmado la asociación entre ambas proteínas endógenas mediante ensayos de coimmunoprecipitación utilizando lisados de células J77 en reposo y análisis mediante *Western Blot*. En este sentido, tanto en los experimentos en los que se ha coimmunoprecipitado con anticuerpos dirigidos frente al receptor CXCR4 endógeno, como en los experimentos inversos, en los que se ha coimmunoprecipitado con anticuerpos dirigidos frente a la drebrina endógena, se detecta una asociación basal entre ambas proteínas (Fig. 15B y C). Como control de especificidad se ha comprobado la ausencia de asociación inmunoprecipitando en las mismas condiciones experimentales con vimentina, una molécula citoesquelética no relacionada con el receptor CXCR4 (Fig. 15C). En dichos ensayos, el anticuerpo policlonal (AcP) usado para revelar la drebrina en la precipitación con anti-CXCR4 detecta dos bandas en los precipitados, correspondientes a las isoformas A y E de esta proteína, mientras que en los ensayos inversos en los que se ha inmunoprecipitado con el anticuerpo monoclonal (AcM) M2F6 dirigido frente a la drebrina, sólo se precipita y se detecta una banda correspondiente a la isoforma A.

Tras comprobar mediante distintos aproximaciones experimentales la presencia de la

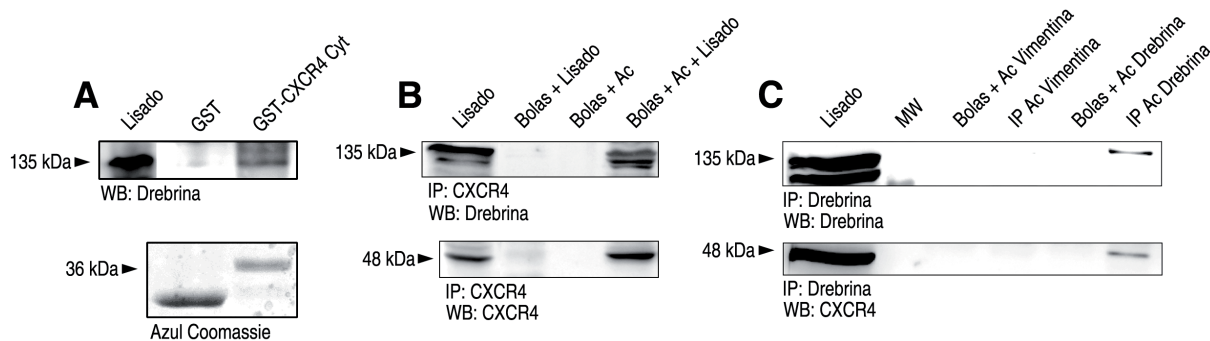


Fig. 15. Las moléculas endógenas de drebrina y CXCR4 se asocian basalmente en linfocitos T. A) Análisis mediante *Western Blot* de la asociación entre la drebrina y CXCR4 precipitando con las construcciones GST sola y GST-CXCR4 Cyt en lisados de células T J77 en reposo. Se ha utilizado la construcción de la GST sola como control de especificidad. Se muestra la carga de las construcciones GST y GST-CXCR4 Cyt mediante la tinción de proteínas con azul coomassie. WB: anticuerpo usado en la inmunodetección mostrada. Tras la substracción de la señal de fondo y la normalización de acuerdo con su nivel de carga, la densitometría en el carril de la GST es de 0,06 y en el carril de GST-CXCR4 Cyt es de 1,0. B) Análisis mediante *Western Blot* de la asociación entre la drebrina y CXCR4 en experimentos de inmunoprecipitación con anticuerpo anti-CXCR4. WB: anticuerpo usado en la inmunodetección mostrada. IP: anticuerpo usado en la inmunoprecipitación. C) Análisis mediante *Western Blot* de la asociación entre la drebrina y CXCR4 en experimentos de inmunoprecipitación con anticuerpo anti-drebrina. WB: anticuerpo usado en la inmunodetección mostrada. IP: anticuerpo usado en la inmunoprecipitación.

drebrina en linfocitos T, y su asociación basal con el receptor de quimiocinas CXCR4, se ha planteado determinar con mayor precisión la región de interacción entre ambas moléculas. Para ello, se han llevado a cabo experimentos de precipitación *Pull Down* utilizando la construcción GST-CXCR4 Cyt en lisados de células 293T transfectadas con diferentes construcciones truncadas de la drebrina (Fig. 16A). La expresión de las distintas construcciones se ha analizado mediante *Western Blot*, y se han seleccionado niveles equivalentes de transfección para realizar

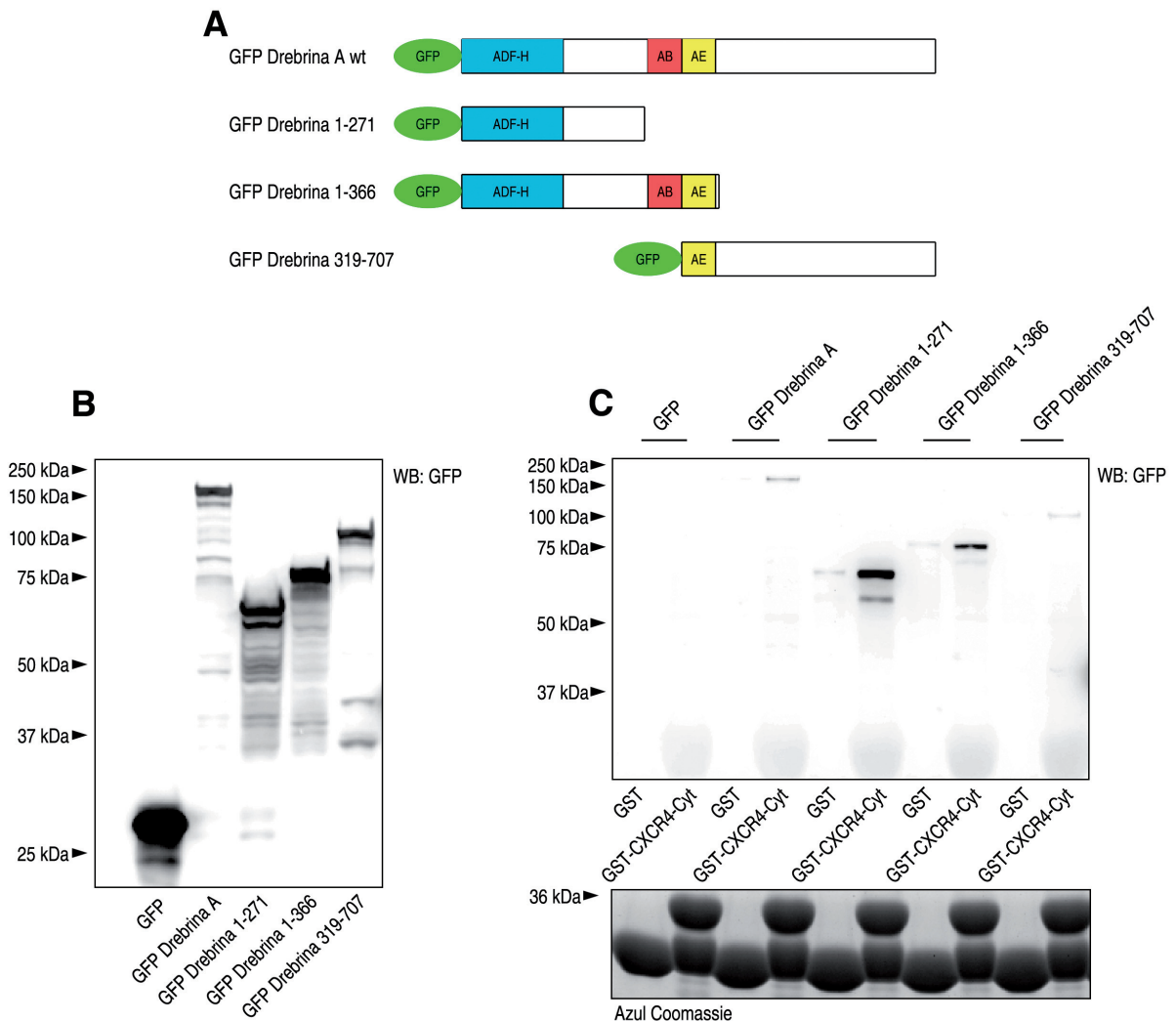


Fig. 16. La drebrina y CXCR4 se asocian por sus región N y C terminal respectivamente. A) El esquema muestra las distintas construcciones truncadas de la drebrina y sus dominios funcionales. ADF-H: Dominio de homología ADF. AB: Dominio de unión a actina de alta afinidad. AE: Exón específico de la isoforma de adulto. B) Análisis mediante *Western Blot* de la expresión de las construcciones de drebrina, en lisados totales de células 293T, utilizadas en los experimentos de precipitación *Pull Down*. Se muestra la expresión de las diferentes construcciones mediante la inmunodetección del módulo GFP en un experimento representativo. C) Análisis mediante *Western Blot* de la interacción entre las distintas construcciones truncadas de drebrina y CXCR4. Se muestra un experimento representativo de *Pull Down* precipitando lisados totales de células 293T transfectadas transitoriamente con las diferentes construcciones truncadas de la drebrina que se indican con la GST sola y con GST-CXCR4 Cyt. Se ha utilizado la construcción de la GST sola como control de especificidad. Se muestra la carga de las construcciones GST y GST-CXCR4 Cyt mediante la tinción de proteínas con azul coomassie. Panel superior: Inmunodetección del módulo GFP. Panel inferior: Se muestra la carga de las construcciones GST y GST-CXCR4 Cyt mediante la tinción de proteínas con azul coomassie.

los ensayos de precipitación (Fig. 16B). Así, se ha observado que en la construcción de la drebrina silvestre completa se detecta una interacción significativa con la región citoplasmática de CXCR4, mientras que con las construcciones truncadas de drebrina 1-271 y 1-366 se detecta una asociación más fuerte (Fig. 16C). En contraste, la forma truncada de la drebrina 319-707 apenas se asocia con la región citoplasmática de CXCR4 siendo la interacción menor que con la forma silvestre completa (Fig. 16C). Estos resultados indican que la drebrina se asocia con la región citoplasmática del receptor CXCR4 por su región N-terminal, y que su extremo C-terminal podría regular negativamente dicha interacción.

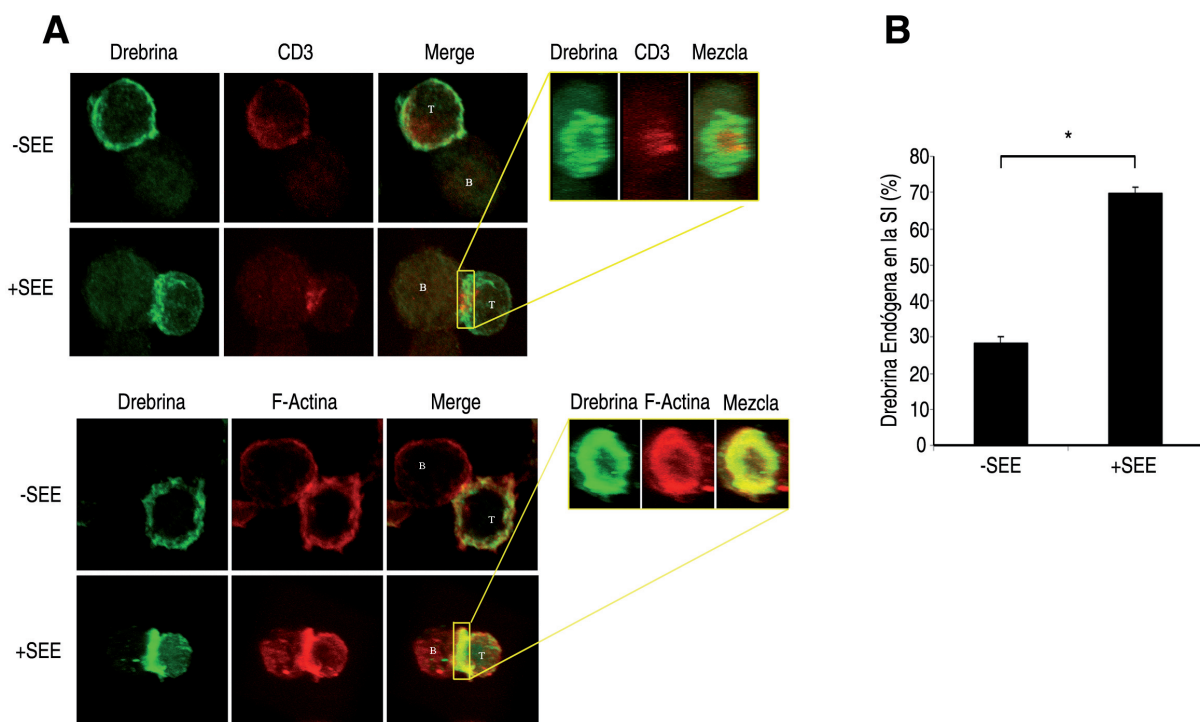


Fig. 17. La drebrina se recluta a la zona de contacto entre la célula T y la CPA durante la formación de la SI. A) Análisis mediante microscopía confocal de la localización subcelular de la drebrina endógena en células T J77 (T) conjugadas con células Raji cargadas (+SEE) o no (-SEE) con SEE. El conjunto de paneles superiores muestran la tinción para la drebrina (verde) y CD3 (rojo). El conjunto de paneles inferiores muestran la tinción para la drebrina (verde) y la F-actina (rojo). En los paneles magnificados de la derecha se muestra la reconstrucción 3D de las estructuras de los correspondientes SMACs. **B)** Cuantificación de la relocalización de la drebrina a la SI en conjugados formados con células Raji cargadas (+SEE) o no (-SEE) con SEE. Los resultados representan la media \pm s.d. del porcentaje de conjugados celulares con la drebrina endógena relocalizada a la SI de 4 experimentos independientes ($p < 0,05$ (*), Prueba *U de Mann Whitney*).

3.2 La drebrina y el receptor de quimiocinas CXCR4 colocalizan en el SMAC periférico de la sinapsis inmune.

Recientemente, se ha descrito la presencia de diferentes receptores de quimiocinas en la sinapsis inmune SI [121], por tanto, el siguiente paso que se ha planteado es estudiar el papel de la asociación entre la drebrina y CXCR4 durante el establecimiento y formación de la SI. Con este propósito hemos seleccionado el modelo humano de SI basado en las líneas celulares

Raji y J77. Las células B Raji expresan en su superficie celular moléculas de clase II capaces de unir y presentar el superantígeno bacteriano enterotoxina estafilocócica E (SEE), y en el modelo de SI actúan como células presentadoras de antígeno activando a las células T. En este sentido, las células T J77 expresan la cadena V β 8 del TCR [64] y son capaces de reconocer el superantígeno bacteriano enterotoxina estafilocócica E (SEE) cuando se la presentan las células B Raji y activarse en consecuencia.

En primer lugar, se ha visualizado, mediante microscopía confocal, la localización subcelular de la drebrina endógena en nuestro modelo de SI. En conjugados formados en ausencia de superantígeno E (SEE), tanto la drebrina como la F-actina se distribuyen uniformemente por todas las regiones subcorticales de la membrana de la célula T y el citoplasma, así como el marcaje de CD3 que se distribuye uniformemente por toda la membrana de la célula T (Fig. 17A). En contraste, en presencia de células Raji cargadas con SEE, la drebrina se acumula en la zona de contacto de los conjugados entre la célula T y la CPA, al igual que la F-actina y el CD3 (Fig. 17A). Un análisis tridimensional del contacto muestra que la localización de la drebrina claramente solapa con la de la F-actina, mostrando un patrón de tinción típico del SMAC periférico y/o distal, rodeando a la tinción de CD3 en el SMAC central (Fig. 17A). El análisis cuantitativo muestra que, en los conjugados formados con células Raji cargadas con SEE, se induce un aumento significativo en las células que relocalizan la drebrina endógena hacia la SI (Fig. 17B).

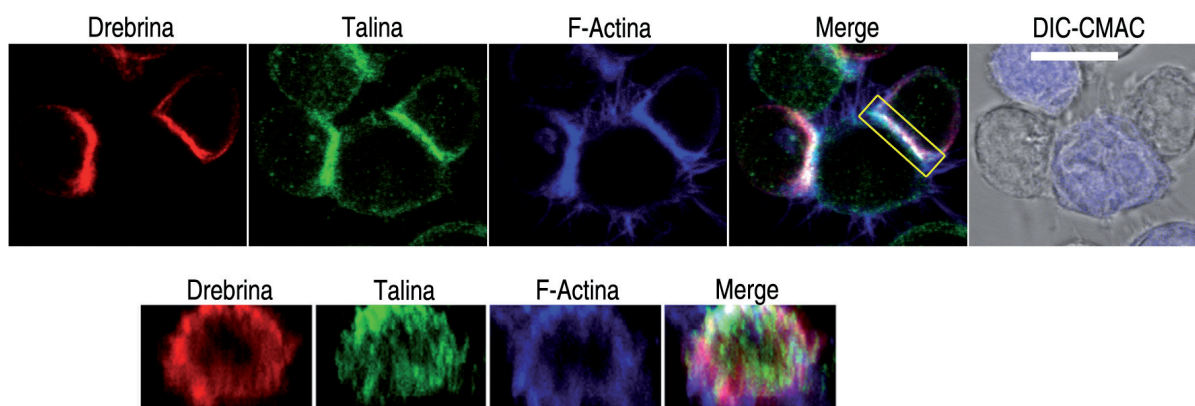


Fig. 18. La drebrina colocaliza con el marcador de SMAC periférico talina. Análisis mediante microscopía confocal de la localización subcelular de la drebrina endógena en células T J77 (T) conjugadas con células Raji cargadas con SEE en relación al marcador de SMAC periférico, talina. El conjunto de paneles superiores muestra la proyección máxima de la inmunodetección de las moléculas endógenas de drebrina (rojo), talina (verde) y F-actina (azul). Los paneles magnificados inferiores muestran la proyección coronal de la zona del contacto recuadrado. Las células Raji se muestran en el panel DIC-CMAC en color azul. La barra representa 5 μ m.

A fin de determinar con mayor detalle la distribución subcelular de la drebrina en la SI, se ha evaluado mediante microscopía confocal la localización de la drebrina endógena en relación con varios marcadores de los SMACs periférico y distal. Hemos observado que la drebrina colocaliza parcialmente con la integrina VLA-4 y con la talina en el SMAC periférico (Fig.

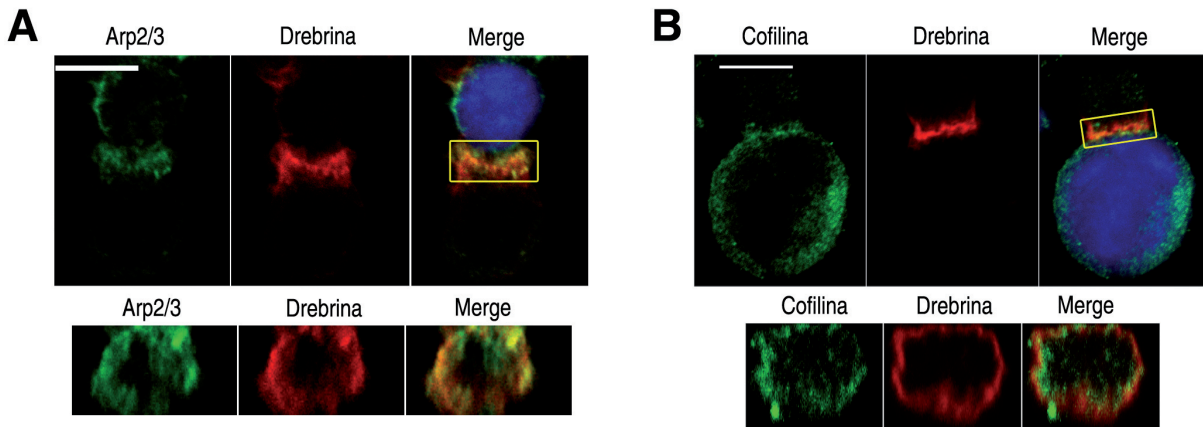


Fig. 19. La drebrina colocaliza con los marcadores de SMAC distal Arp2/3 y cofilina. **A)** Análisis mediante microscopía confocal de la localización subcelular de la drebrina endógena en células T J77 conjugadas con células Raji cargadas con SEE en relación al marcador de SMAC distal, Arp2/3. El conjunto de paneles superiores muestra la proyección máxima de la inmunodetección de las moléculas endógenas del complejo Arp2/3 (verde) y de drebrina (rojo). Los paneles magnificados inferiores muestran la proyección coronal de la zona del contacto recuadrado. Las células Raji se muestran en azul. **B)** Análisis mediante microscopía confocal de la localización subcelular de la drebrina endógena en células T J77 conjugadas con células Raji cargadas con SEE en relación al marcador de SMAC distal, cofilina. El conjunto de paneles superiores muestra la proyección máxima de la inmunodetección de las moléculas endógenas de cofilina (verde) y de drebrina (rojo). Los paneles magnificados inferiores muestran la proyección coronal de la zona del contacto recuadrado. Las células Raji se muestran en azul. La barra representa 5 μm .

18 y resultados no mostrados), y, sin embargo, solapa mayoritariamente con los marcadores Arp2/3 y cofilina en el SMAC distal (Fig. 19A y B) corroborando los resultados de la tinción de la F-actina.

A continuación, se ha comprobado que las construcciones de drebrina acopladas a proteínas fluorescentes tienen el mismo comportamiento en nuestro modelo de SI que la proteína endógena. Para ello se han conjugado células Raji, cargadas o no con SEE, y células J77 transfectadas con GFP-drebrina A silvestre (GFP-drebrina A) o con GFP-drebrina E silvestre (GFP-drebrina E). Estos experimentos muestran que ambas construcciones colocalizan completamente con la tinción de la drebrina endógena en ambas condiciones (Fig. 20 y resultados no mostrados). Los análisis bioquímicos y cuantitativos muestran que la GFP-drebrina A, se expresa con su tamaño esperado (Fig. 21A), y se concentra en la SI en el 75% de los conjugados

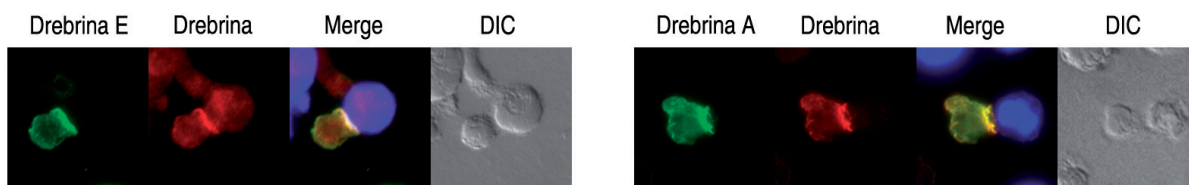


Fig. 20. Las isoformas A y E de drebrina fusionadas a la GFP se comportan como la drebrina endógena. Análisis mediante microscopía de fluorescencia de la localización subcelular de las isoformas A y E silvestres de drebrina fusionadas a la GFP. Los conjugados entre células Raji cargadas con SEE y células T J77 transfectadas transitoriamente con la GFP-drebrina E o con la GFP-drebrina A (ambas en verde) muestra que ambas construcciones se acumulan en la SI colocalizando con la inmunodetección de la drebrina endógena (rojo). Las células Raji se muestran en azul.

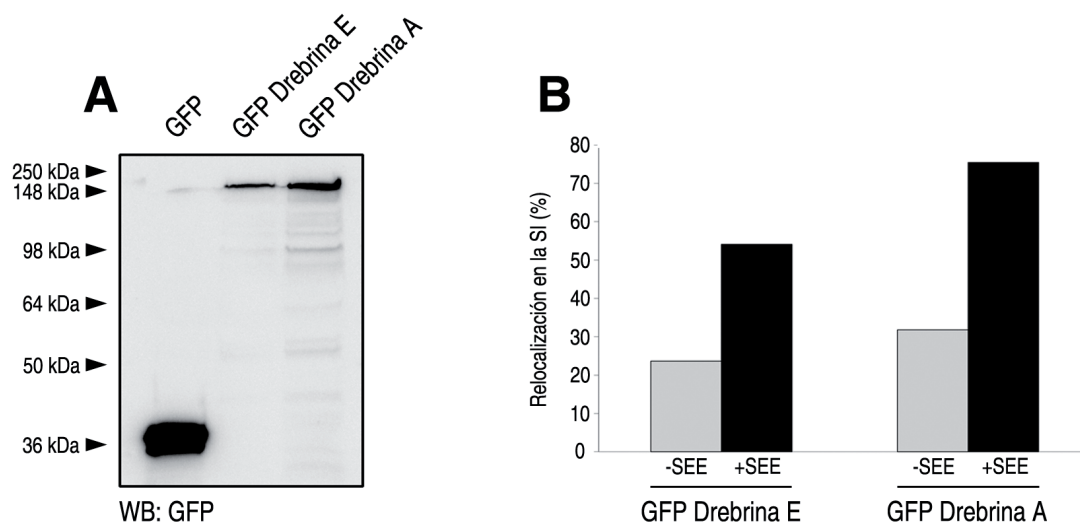


Fig. 21. Las isoformas A y E de drebrina fusionadas a la GFP se comportan como la drebrina endógena. A) Análisis mediante *Western Blot* de lisados de células T J77 transfectadas transitoriamente con las construcciones GFP sola, GFP-drebrina E, o GFP-drebrina A. Se muestra la expresión de las construcciones indicadas mediante la inmunodetección del módulo GFP. **B)** Análisis de la relocalización de la GFP-drebrina E y la GFP-drebrina A en la SI. Las células T J77 se han transfectado con la GFP-drebrina E y la GFP-drebrina A y se han conjugado con células Raji sin cargar (-SEE) o cargadas (+SEE) con SEE. Los resultados representan el porcentaje de conjugados con la GFP drebrina E o la GFP drebrina A relocalizada a la SI de un experimento representativo.

celulares formados en presencia del superantígeno, mientras que en la ausencia del superantígeno sólo el 28% de los conjugados celulares muestra la relocalización de la drebrina a la zona de contacto (Fig. 21B). Asimismo, se han observado resultados similares cuando las células J77 se han transfectado con GFP-drebrina E, la isoforma embrionaria de esta proteína (Fig. 21A y B). Puesto que ambas isoformas presentan el mismo comportamiento, se ha decidido utilizar la construcción con la proteína GFP acoplada a la forma adulta de la drebrina en los siguientes

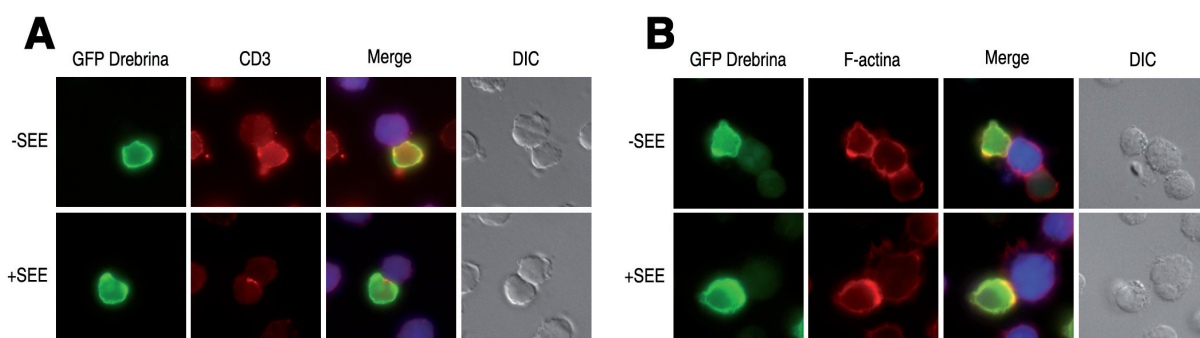


Fig. 22. La GFP-drebrina se relocaliza en la SI igual que la drebrina endógena. A) Análisis mediante microscopía de fluorescencia de conjugados formados entre células T J77 transfectadas con GFP-drebrina (verde) y células Raji (azul) cargadas (+SEE) o no (-SEE) con SEE. El análisis de la localización subcelular de la GFP-drebrina en relación al marcador de SMAC central, CD3 (rojo), no muestra diferencias con la localización de la drebrina endógena. **B)** Análisis mediante microscopía de fluorescencia de conjugados formados entre células T J77 transfectadas con GFP-drebrina (verde) y células Raji (azul) cargadas (+SEE) o no (-SEE) con SEE. El análisis de la localización subcelular de la GFP-drebrina en relación al marcador de SMAC periférico y distal, F-actina (rojo), no muestra diferencias con la localización de la drebrina endógena.

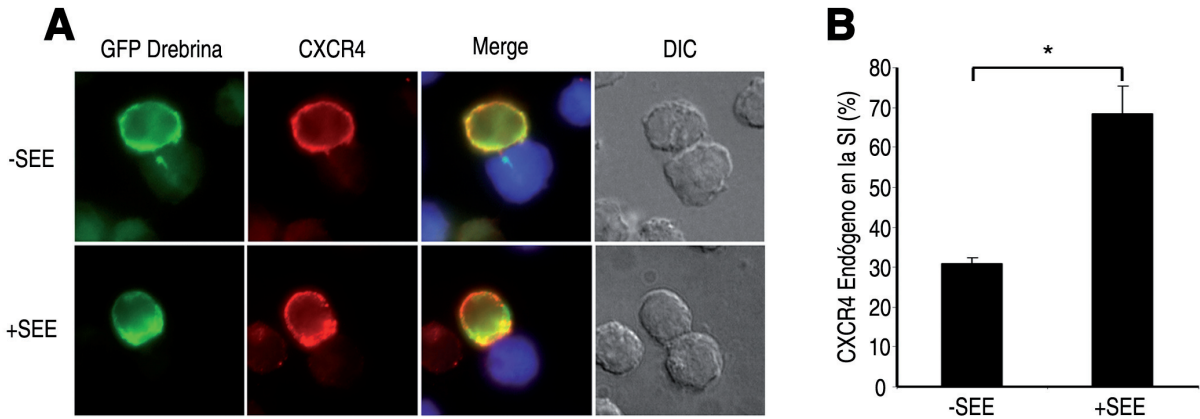


Fig. 23. El receptor CXCR4 endógeno se acumula en la SI junto con la drebrina. **A)** Análisis mediante microscopía de fluorescencia de la localización subcelular del receptor CXCR4 endógeno (rojo) y la GFP-drebrina (verde) en conjugados entre células T J77 transfectadas con la construcción indicada y células Raji (azul) cargadas (+SEE) o no (-SEE) con SEE. **B)** Cuantificación de la relocalización del receptor CXCR4 endógeno a la SI en conjugados formados con células Raji cargadas (+SEE) o no (-SEE) con SEE. Los resultados representan la media \pm s.d. del porcentaje de conjugados celulares con el receptor CXCR4 endógeno relocalizado a la SI de 4 experimentos independientes ($p < 0,05$ (*), Prueba *U de Mann Whitney*).

experimentos. En consecuencia, los conjugados formados con células J77 transfectadas con la forma adulta y Raji cargadas con SEE muestran la acumulación de la GFP-drebrina en la zona de contacto entre las células T y B, colocalizando con las tinciones de la F-actina y el CD3 (Fig. 22A y B).

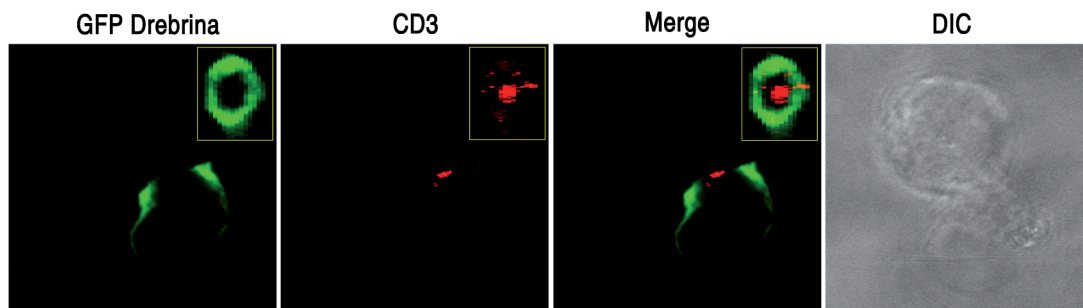


Fig. 24. La GFP-drebrina se localiza en la misma estructura de la SI que la drebrina endógena. Análisis mediante microscopía confocal de la estructura de los SMACs en conjugados de células T J77 transfectadas con GFP-drebrina (verde) y células Raji cargadas con SEE. Los paneles principales muestran un corte confocal del contacto. La inmunodetección de CD3 se muestra en rojo. Los paneles magnificados muestran la proyección coronal de la zona del contacto en la SI.

El siguiente paso ha sido estudiar la localización de la drebrina en relación al receptor CXCR4 en nuestro modelo de SI. Para ello, se han formado conjugados de células J77 transfectadas con GFP-drebrina y células Raji cargadas o no con SEE, y se ha teñido el CXCR4 endógeno para analizar su localización. En ausencia de estímulo con SEE, tanto la drebrina como CXCR4 muestran una distribución uniforme a lo largo de la membrana celular. En claro

contraste, en los conjugados celulares formados en presencia de estimulación con SEE, la GFP-drebrina y el CXCR4 se redistribuyen y colocan en la SI (Fig. 23A). El análisis cuantitativo muestra que el CXCR4 endógeno se concentra en el contacto en el 70% de los conjugados celulares formados en presencia de superantígeno, mientras que en la ausencia de superantígeno sólo el 30% de los conjugados acumulan el receptor en la SI (Fig. 23B).

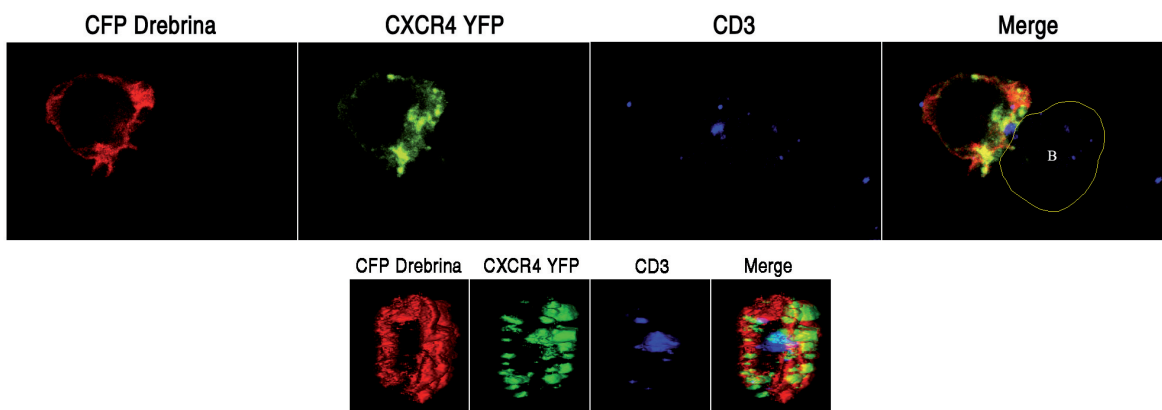


Fig. 25. El receptor CXCR4 se relocaliza en el SMAC periférico colocalizando con la drebrina. Análisis mediante microscopía confocal de un conjugado entre células T J77 coexpresando CFP-drebrina (red) y CXCR4-YFP (verde) conjugadas con células Raji (B) cargadas con SEE. La inmunodetección de CD3 se muestra en azul. Se muestra un corte confocal. El perímetro de la célula Raji está subrayado en amarillo. El conjunto de paneles inferiores muestra la reconstrucción tridimensional de la zona del contacto.

Tras comprobar que tanto el receptor de CXCR4 como la drebrina co-localizan en la zona de contacto de la SI, se ha decidido estudiar en mayor profundidad la localización de CXCR4 y la drebrina en la arquitectura de la SI. La reconstrucción 3D del contacto formado entre células J77 transfectadas con GFP-drebrina y células Raji cargadas con SEE, revela que el marcador CD3 se distribuye en el SMAC central de la SI, como se ha descrito previamente [44], mientras que la GFP-drebrina, al igual que la proteína endógena, muestra la distribución típica en forma de anillo del SMAC periférico (Fig. 24). El análisis adicional de los conjugados formados entre células Raji cargadas con SEE y células J77 cotransfectadas con CXCR4-YFP y CFP-drebrina muestra que ambas moléculas colocalizan en el SMAC periférico (Fig. 25). Sin embargo, mientras que CXCR4 muestra una distribución punteada en el SMAC periférico, la drebrina muestra un anillo continuo.

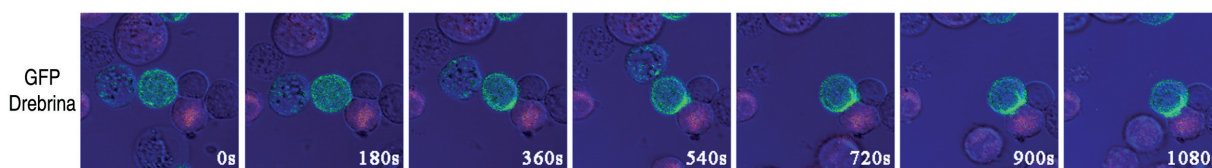


Fig. 26. Dinámica de relocalización de la drebrina. Serie de imágenes analizadas mediante videomicroscopía confocal (imágenes adquiridas cada 30s) estudiando la dinámica de relocalización de la drebrina durante la formación de conjugados entre células T J77 transfectadas transitoriamente con GFP-drebrina (verde), y células Raji (rojo) cargadas con SEE. El tiempo se muestra en segundos.

3.3 La drebrina y el receptor CXCR4 siguen la misma cinética de relocalización y tras la estimulación antigénica incrementan su interacción en la zona del contacto de la SI.

Los experimentos de videomicroscopía con células vivas *in vitro* han confirmado la relocalización de la GFP-drebrina durante la formación de la SI, y muestran un claro incremento de la GFP-drebrina en el sitio de contacto de las células T con las Raji, comenzando alrededor de 5 min, alcanzando un máximo a los 10 min, y permaneciendo en la SI durante al menos 18 min (Fig. 26). A continuación se ha comparado la dinámica de relocalización de la drebrina con la de CXCR4 durante la formación de la SI. Los estudios de videomicroscopía revelan que las cinéticas de relocalización de la CFP-drebrina y el CXCR4-YFP son paralelas, siendo ambas moléculas reclutadas rápidamente al sitio de contacto entre la célula T y la CPA tras la formación del conjugado, alcanzando un máximo alrededor de 11 min después del contacto célula-célula y permaneciendo en el SMAC periférico durante al menos 45 min (Fig. 27).

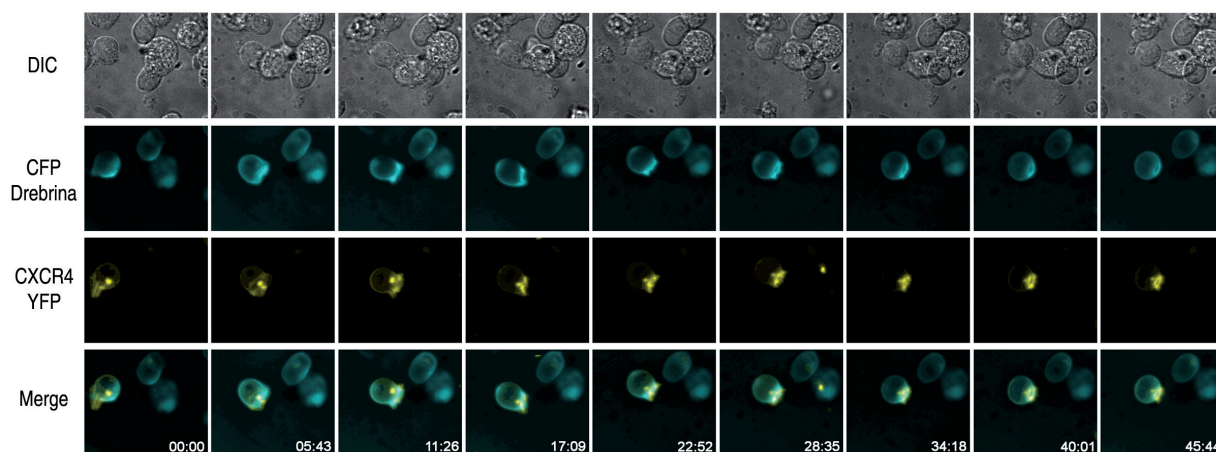


Fig. 27. Dinámica de relocalización del receptor CXCR4 y la drebrina. Serie de imágenes analizadas mediante microscopía de fluorescencia de deconvolución (imágenes adquiridas cada 5 min 43s) estudiando la dinámica de relocalización de la drebrina y el receptor CXCR4 durante la formación de conjugados entre células T J77 transfectadas transitoriamente con CFP-drebrina y CXCR4-YFP, y células Raji cargadas con SEE. El tiempo en min y s se indica en la parte inferior.

Para profundizar en el estudio de la interacción entre la drebrina y el receptor CXCR4 durante el establecimiento de la SI, se han realizado experimentos de cinética de asociación molecular CXCR4-drebrina mediante coimmunoprecipitación, utilizando lisados de células J77 estimuladas a distintos tiempos con células Raji cargadas con SEE. Estos ensayos han mostrado que, si bien la interacción entre el receptor CXCR4 y la drebrina ocurre de forma basal en conjugados con células Raji no estimuladas, como se había observado en experimentos mostrados anteriormente (Fig. 15), dicha interacción se incrementa significativamente en los conjugados formados con células Raji estimuladas con SEE, alcanzando un máximo en aproximadamente 10 min tras el contacto de las células T con las CPA (Fig. 28A y B).

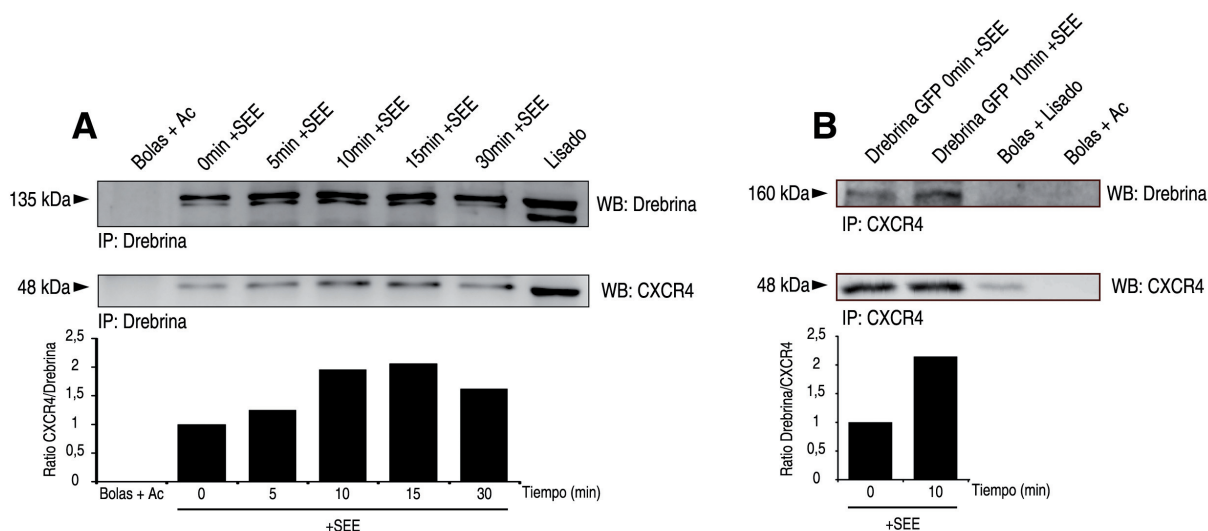


Fig. 28. La interacción de CXCR4 y drebrina se incrementa tras la estimulación con SEE. **A)** Análisis mediante *Western Blot* de la cinética de asociación molecular del receptor CXCR4 y la drebrina coimmunoprecipitando con anti-drebrina en conjugados entre células T J77 estimuladas con células Raji cargadas con SEE durante los tiempos indicados. La cuantificación de la relación CXCR4/drebrina se muestra en el panel inferior. WB: anticuerpo usado en la inmunodetección mostrada. IP: anticuerpo usado en la inmunoprecipitación. **B)** Análisis mediante *Western Blot* de la cinética de asociación molecular del receptor CXCR4 y la drebrina coimmunoprecipitando con anti-CXCR4 en conjugados entre células T J77 transfectadas transitoriamente con GFP-drebrina estimuladas con células Raji cargadas con SEE durante los tiempos indicados. La cuantificación de la relación drebrina/CXCR4 se muestra en el panel inferior. WB: anticuerpo usado en la inmunodetección mostrada. IP: anticuerpo usado en la inmunoprecipitación.

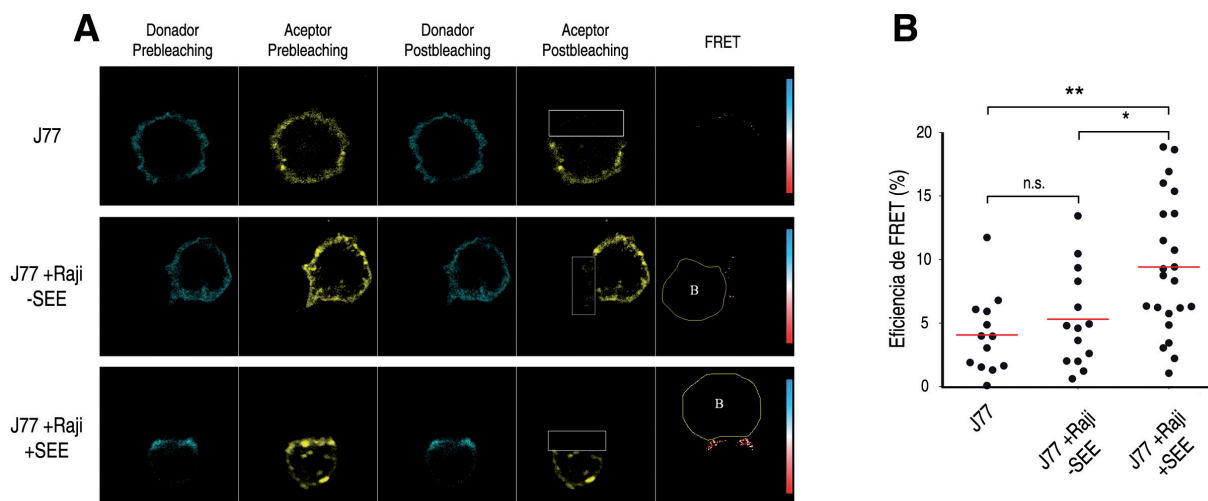


Fig. 29. La interacción entre CXCR4 y la drebrina se incrementa en la zona de contacto de la SI. **A)** Análisis mediante FRET de la interacción molecular del receptor CXCR4 y la drebrina. Las células T J77 cotransfectadas con CFP-drebrina y CXCR4-YFP se dejaron sin estimular (J77) o se conjugaron con células Raji sin cargar (J77 +Raji -SEE) o cargadas (J77 +Raji +SEE) con SEE. La eficiencia de FRET se analizó en la zona de contacto. Las regiones de interés del análisis de FRET están recuadradas en blanco. El perímetro de las células Raji (B) está subrayado en amarillo en los paneles de “FRET”. **B)** Análisis estadístico de las eficiencias de FRET de las condiciones experimentales del panel A. Las barras rojas horizontales se corresponden a la media aritmética. Los datos se han analizado mediante el test paramétrico de la ANOVA con múltiples comparaciones de Bonferroni. ($p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), n.s.: no significativo. Valor p de la ANOVA = 0.0019).

Mediante experimentos de FRET con células J77 cotransfectadas con CFP-drebrina y CXCR4-YFP se ha estudiado si la drebrina y el receptor CXCR4 interactúan directamente, y se ha determinado la localización subcelular de esta interacción. Confirmando los resultados bioquímicos mostrados anteriormente (Fig. 28), se ha encontrado que la transferencia de energía entre las dos moléculas aumenta por la estimulación con superantígeno E. Además, la señal de FRET es máxima en el área de contacto de la célula T con la B, demostrando que la interacción directa entre la drebrina y el receptor CXCR4 aumenta en la SI (Fig. 29A y B).

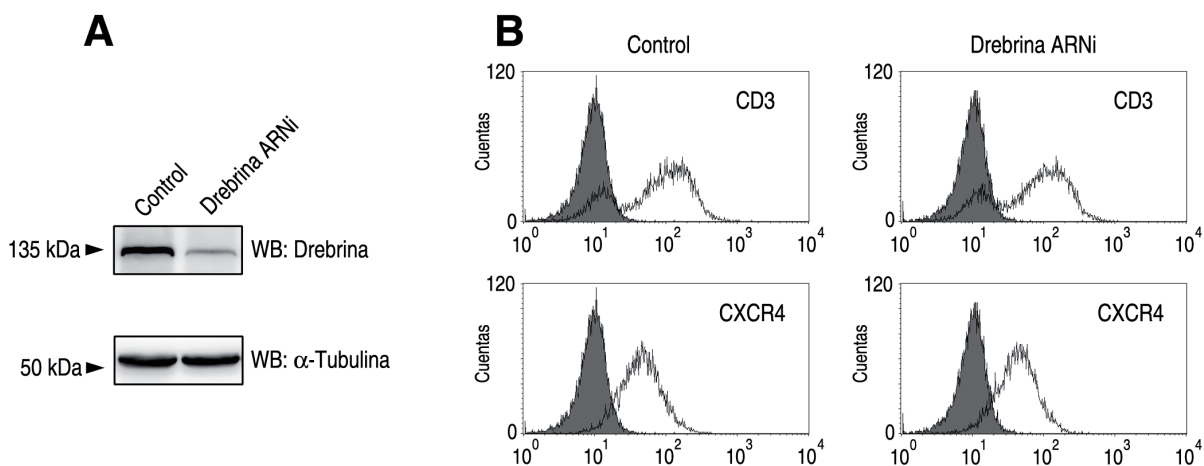


Fig. 30. El silenciamiento de la drebrina no altera la expresión de CXCR4 ni de CD3 en membrana. **A)** Análisis mediante *Western Blot* de la expresión de drebrina en células T J77 control o interferidas para la drebrina en un experimento representativo. Se ha utilizado el marcaje de α -tubulina como control de carga. WB: anticuerpo usado en la inmunodetección mostrada. **B)** Análisis mediante citometría de flujo de la expresión en membrana de CD3 y CXCR4 en células T J77 transfectadas con oligos control (control) o interferentes frente a la drebrina (Drebrina ARNi). Se muestra un experimento representativo. La curva sombreada representa el control negativo de tinción.

3.4 El silenciamiento de la drebrina impide el reclutamiento de CXCR4 a la SI.

A continuación se ha examinado el papel de la drebrina en la localización subcelular del receptor CXCR4 durante la formación de la SI. Para ello, se ha silenciado la expresión de la drebrina en células J77 y se han conjugado con células B Raji cargadas o no con SEE. Se ha observado que el silenciamiento de la drebrina (Fig. 30A) no modifica el nivel de expresión de CXCR4 en la superficie celular, ni de otras moléculas que participan en la formación de la SI, incluyendo CD3, CD4, TCR ($V\beta 8$), VLA-4, ICAM-3 e ICAM-1 (Figs. 30B y 31). Sin embargo, las células J77 silenciadas para drebrina, al contrario que las células J77 control, no son capaces de relocalizar correctamente CXCR4 a la SI cuando se conjugan con células Raji cargadas con SEE (Fig. 32). El análisis cuantitativo de estos experimentos muestra que CXCR4 se relocaliza a la SI en el 75% de los conjugados entre células Raji y células J77 transfectadas con el oligo interferente control, sólo en el 46% de los conjugados formados entre células Raji y células J77 transfectadas con la mezcla de oligos interferentes frente a la drebrina (Fig. 33A). Por el

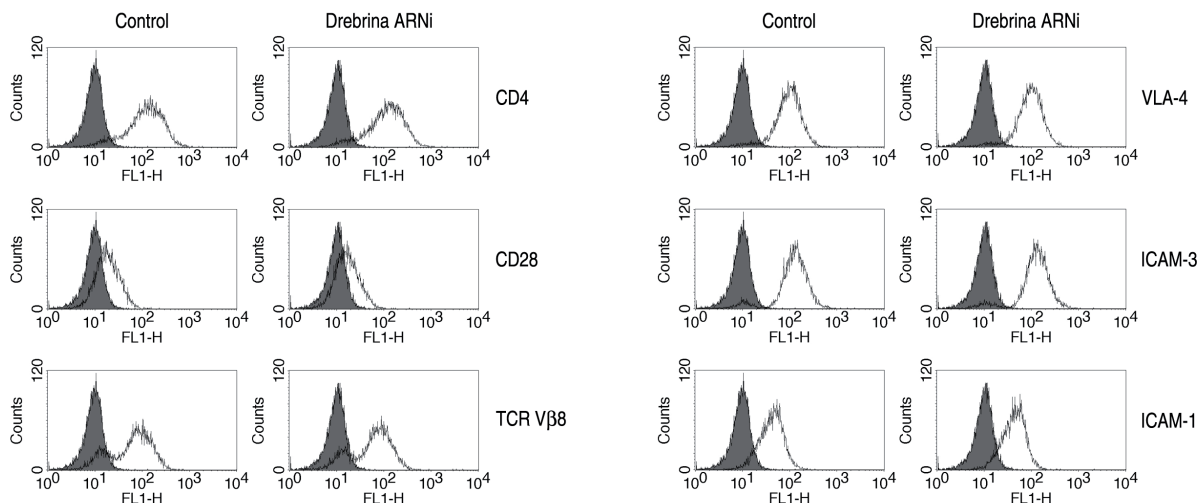


Fig. 31. El silenciamiento de la drebrina no altera la expresión en membrana de las principales moléculas implicadas en la formación de la SI. Análisis mediante citometría de flujo de la expresión en membrana de CD4, CD28, TCR (Vβ8), VLA-4, ICAM-3 e ICAM-1 en células T J77 transfectadas con oligos control (control) o interferentes frente a la drebrina (Drebrina ARNi). Se muestra un experimento representativo. La curva sombreada representa el control negativo de tinción.

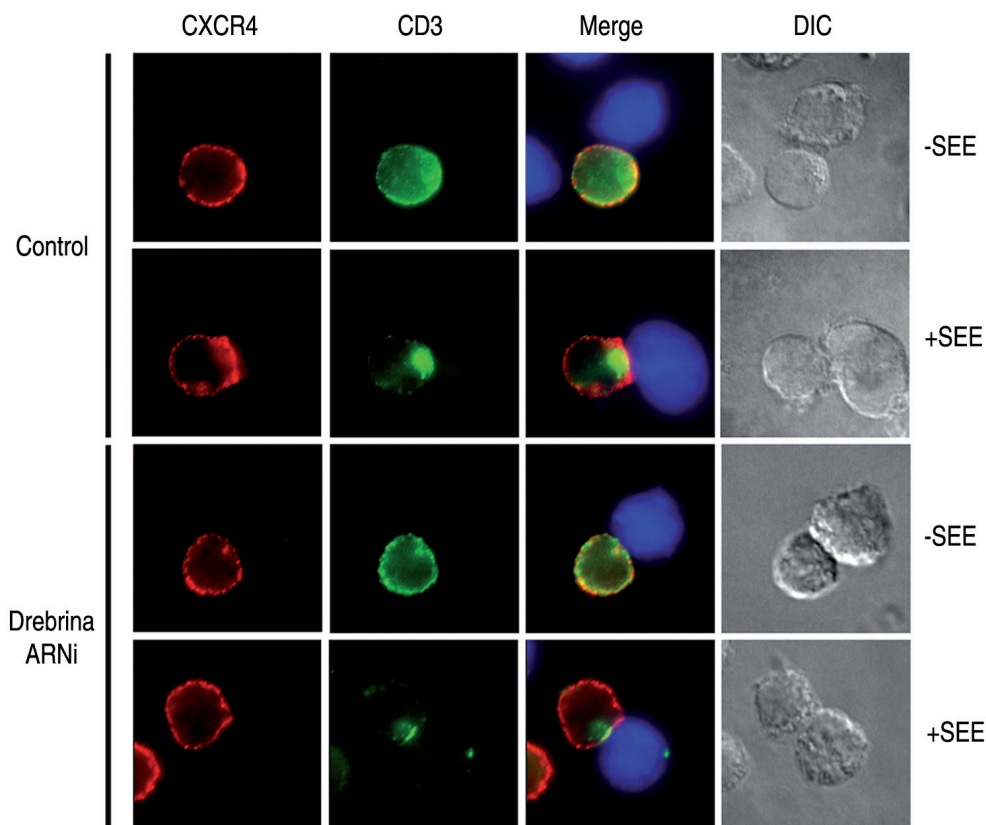


Fig. 32. El silenciamiento de la drebrina altera la relocalización de CXCR4 en la SI. Análisis mediante microscopía de fluorescencia de la relocalización de CXCR4 (rojo) en conjugados formados entre células T J77 transfectadas con oligos control (control) o interferentes frente a la drebrina (Drebrina ARNi) y células Raji cargadas (+SEE) o no (-SEE) con SEE. La inmunodetección de CD3 se muestra verde. Se muestra un campo representativo de cada condición.

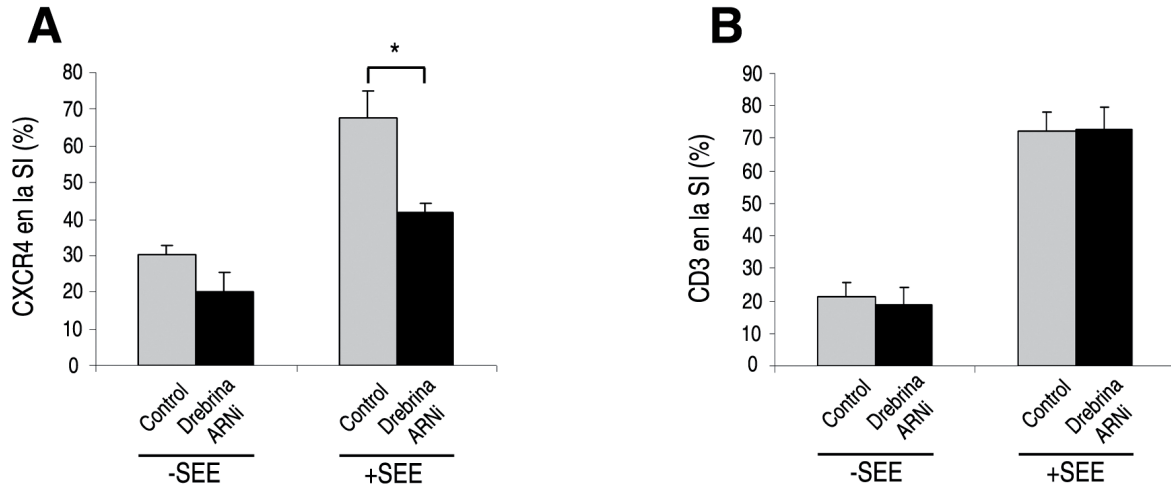


Fig. 33. El silenciamiento de la drebrina altera la relocalización de CXCR4 en la SI. **A)** Cuantificación de la relocalización de CXCR4 en conjugados entre células T J77 transfectadas con oligos control (control) o interferentes frente a la drebrina (Drebrina ARNi) y células Raji cargadas (+SEE) o no (-SEE) con SEE. Los resultados representan la media \pm s.d. del porcentaje de conjugados celulares con el receptor CXCR4 endógeno relocalizado a la SI de 4 experimentos independientes ($p < 0,05$ (*), Prueba *U de Mann Whitney*). **B)** Cuantificación de la relocalización de CD3 en conjugados entre células T J77 transfectadas con oligos control (control) o interferentes frente a la drebrina (Drebrina ARNi) y células Raji cargadas (+SEE) o no (-SEE) con SEE. Los resultados representan la media \pm s.d. del porcentaje de conjugados celulares con el receptor CXCR4 endógeno relocalizado a la SI de 3 experimentos independientes ($p < 0,05$ (*), Prueba *U de Mann Whitney*).

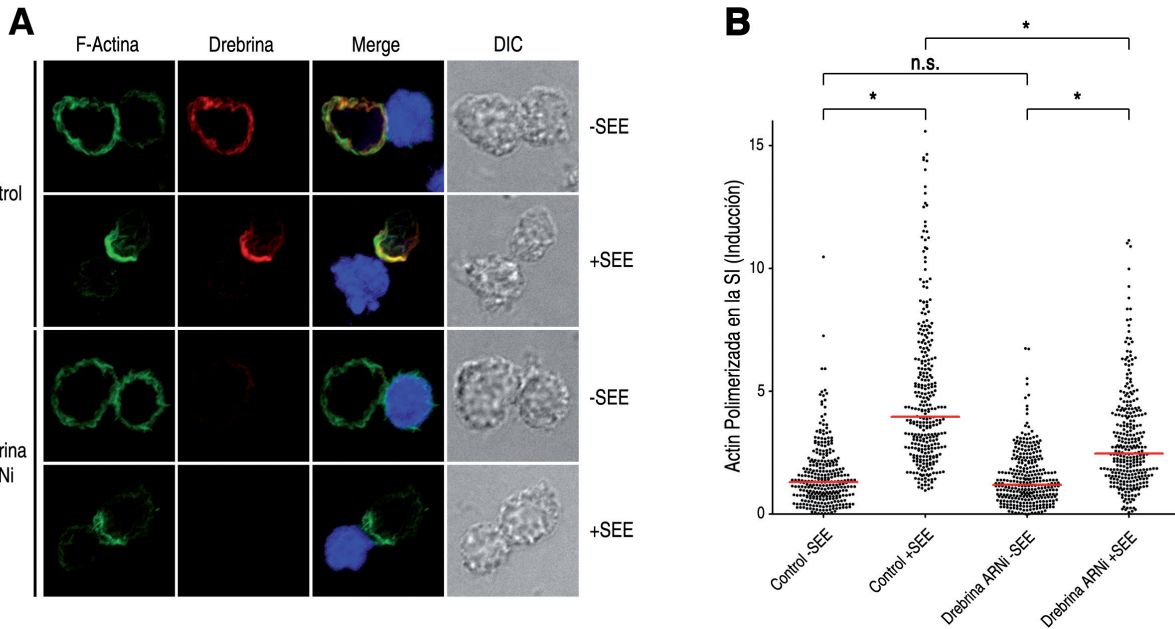


Fig. 34. El silenciamiento de la drebrina disminuye la polimerización de actina en la SI. **A)** Análisis mediante microscopía confocal de la acumulación de F-actina (verde) y drebrina (rojo) en conjugados entre células T J77 transfectadas con oligos control (control) o interferentes frente a la drebrina (Drebrina ARNi) y células Raji (azul) sin cargar (-SEE) o cargadas (+SEE) con SEE. **B)** Cuantificación de la acumulación de F-actina en la SI de las condiciones experimentales del panel A. Las barras rojas horizontales se corresponden a la mediana de 3 experimentos independientes ($p < 0,05$ (*), n.s.: no significativo, Prueba *U de Mann Whitney*).

contrario, la relocalización de CXCR4 cuando se conjugan con células Raji sin cargar con SEE es similar tanto en las células J77 control, como en las células J77 silenciadas para drebrina (Fig. 33A). En claro contraste, el silenciamiento de la drebrina no afecta a la acumulación de CD3 en la SI (Fig. 33B), lo que indica un efecto específico de la drebrina sobre el reclutamiento de CXCR4 a la SI dependiente de antígeno.

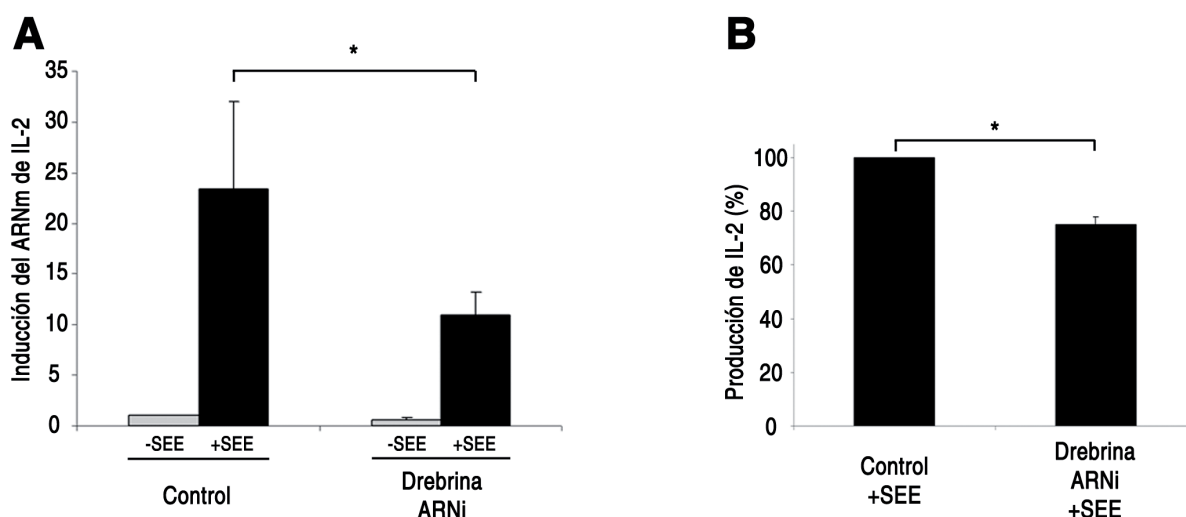


Fig. 35. El silenciamiento de la drebrina disminuye la producción de IL-2. **A)** Análisis mediante RT-PCR semicuantitativa de la expresión de ARNm de la IL-2 en conjugados entre células T transfectadas con oligos control (control) o interferentes frente a la drebrina (Drebrina ARNi) y células Raji sin cargar (-SEE) o cargadas (+SEE) con SEE. Los resultados representan la media \pm s.d. de los niveles de ARNm normalizados al nivel de las células control sin estimular de 4 experimentos independientes realizados por duplicado ($p < 0.05$ (*), Prueba *U de Mann Whitney*). **B)** Análisis mediante ELISA de la secreción de IL-2 en sobrenadante de cultivo de conjugados entre células T J77 transfectadas con oligos control (control) o interferentes frente a la drebrina (Drebrina ARNi) y células Raji cargadas con SEE. Los resultados representan la media \pm s.e.m. de la secreción normalizada a la secreción de las células control de 6 experimentos independientes realizados por duplicado ($p < 0.05$ (*), Prueba *Wilcoxon signed rank*).

3.5 El silenciamiento de la drebrina disminuye la acumulación de actina en la SI.

Dado que otros estudios previos demuestran que el citoesqueleto de actina es necesario para la correcta activación de las células T durante la SI [3], y que la drebrina está involucrada en la regulación de la polimerización de la actina en neuronas, [157, 167, 178], se ha decidido evaluar el efecto funcional del silenciamiento de la drebrina sobre la dinámica de la actina en células J77 estimuladas con células Raji cargadas con SEE. Los experimentos han mostrado que en los conjugados formados con células J77 silenciadas para la drebrina la acumulación de la actina polimerizada en el área de contacto de la SI disminuye significativamente (Fig. 34A y B). En consecuencia, las células J77 interferidas para la drebrina, muestran una reducción de los niveles de ARN mensajero codificante para la IL-2, y una disminución de la secreción de esta citoquina en comparación con las células tratadas con el oligo interferente control (Fig. 35A

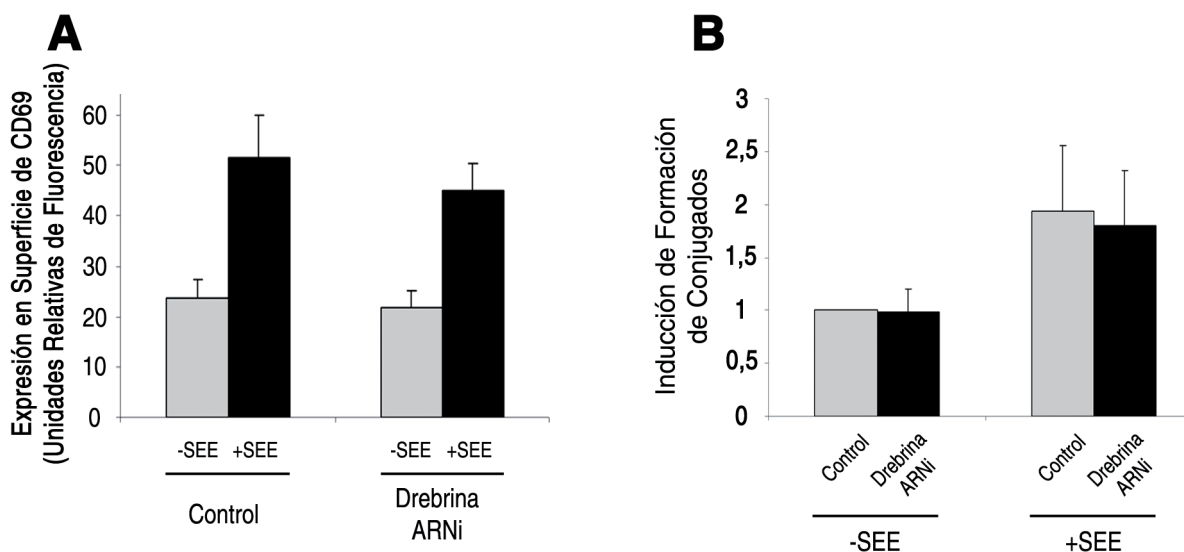


Fig. 36. El silenciamiento de la drebrina no afecta la inducción de CD69 ni la formación de conjugados. A) Análisis mediante citometría de flujo de la expresión en membrana de CD69 en conjugados entre células T J77 transfectadas con oligos control (control) o interferentes frente a la drebrina (Drebrina ARNi) y células Raji cargadas (+SEE) o no (-SEE) con SEE. Los resultados se representan en unidades relativas de fluorescencia y representan la media \pm s.d. de la expresión de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. No se aprecian diferencias significativas ($p < 0,05$ (*), Prueba *U de Mann Whitney*). B) Análisis de la inducción de formación de conjugados entre células T transfectadas con oligos control (control) o interferentes frente a la drebrina (Drebrina ARNi) y células Raji cargadas (+SEE) o no (-SEE) con SEE. Los resultados representan la media aritmética \pm s.d. de la inducción de formación de conjugados normalizada a la inducción de formación de conjugados de las células control sin estimular de 3 experimentos independientes. No se aprecian diferencias significativas ($p < 0,05$ (*), Prueba *U de Mann Whitney*).

y B). Sin embargo, la interferencia de la drebrina no afecta ni a la expresión de superficie de CD69, un marcador temprano de activación de células T, ni al número de conjugados formados (Fig. 36A y B).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los reordenamientos del citoesqueleto en los linfocitos T dirigen funciones celulares esenciales para el desarrollo de la respuesta inmune, como la polarización y migración celular, y la activación de los linfocitos durante la presentación antigénica. En estos procesos el citoesqueleto de actina ejerce un papel proporcionando un transporte intracelular y un soporte mecánico muy dinámicos [122, 125, 127]. Así, la interferencia de la F-actina, mediante inhibidores químicos o mediante la desregulación de moléculas asociadas al citoesqueleto de actina, afecta negativamente a la quimiotaxis y a la activación de los linfocitos T [8, 9].

La detección de un gradiente quimiotáctico por los linfocitos induce una morfología polarizada y la redistribución de sus receptores de quimiocinas y de adhesión mediante mecanismos de transporte activos dependientes del citoesqueleto de actina [4, 8]. Además, la redistribución de las moléculas involucradas durante la formación de la SI es más rápido de lo que cabría esperar por simple difusión [53], lo que sugiere que el citoesqueleto de actina dirige la reorganización rápida de los receptores y las moléculas de señalización a la SI. En este sentido, se ha descrito que los receptores de quimiocinas están implicados en las respuestas inmunes e inflamatorias, regulando procesos críticos como la activación y migración de los leucocitos mediante cambios en el citoesqueleto de actina [2, 5]. CXCR4 es un receptor de quimiocinas que desempeña un papel importante en homeostasis, migración celular, inflamación, desarrollo de linfocitos B y metástasis de tumores [104-106]. CXCR4 se une a la quimiocina SDF-1 α /CXCL12 y es uno de los correceptores principales para la entrada en la célula del VIH-1 [179]. Sin embargo, se desconocen los efectores moleculares que traducen esta señalización dependiente de los receptores de quimoquinas en reordenamientos del citoesqueleto de actina. En nuestro estudio, aportamos evidencias experimentales que demuestran que el receptor de quimiocinas CXCR4 interacciona con las proteínas asociadas al citoesqueleto de actina: MIIA y drebrina. Asimismo, demostramos que la MIIA juega un papel importante durante la migración de los linfocitos T regulando la internalización de CXCR4 y la duración de la señalización dependiente del citoesqueleto de actina. Por otro lado, aportamos evidencias que revelan que la drebrina se expresa en el sistema inmune y ejerce un papel novedoso en la activación de células T durante la formación de la SI. Además, nuestros resultados indican que la drebrina se asocia con CXCR4 y regula su relocalización a la SI. Así, demostramos que la drebrina regula el contenido de F-actina en la SI y la activación de la célula T. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que tanto la MIIA y como la drebrina conectan la señalización de los receptores de quimiocinas con la remodelación del citoesqueleto de actina, ejerciendo un papel funcional importante y regulador en los linfocitos T.

1 Asociación entre CXCR4 y miosina IIA, y función de dicha asociación en la endocitosis de CXCR4 dependiente de SDF-1 α en linfocitos T.

Nuestro grupo ha descrito anteriormente la interacción de la cadena pesada de la miosina no muscular de tipo II (MIIA) con CXCR4 [18]. Además, ambas proteínas se localizan preferentemente en el frente de avance de los linfocitos T polarizados junto con la F-actina [18]. De este modo nos planteamos estudiar el posible papel regulador de la MIIA sobre CXCR4 en el modelo de migración linfoide.

La internalización de los receptores de quimiocinas tras la unión con sus agonistas es esencial en las células inmunes, ya que este fenómeno actúa como un mecanismo regulador de la quimiotaxis y la activación de los leucocitos. Por otra parte, la internalización de los correceptores del VIH, como CXCR4 y CCR5 es un mecanismo potencialmente importante mediante el que se podría regular la infección por este virus a través de sus ligandos [180]. Sin embargo, los mecanismos que regulan la endocitosis de los receptores de quimiocinas no están aún completamente esclarecidos. Hemos demostrado la implicación de la proteína motora MIIA en la endocitosis de CXCR4. De hecho, la endocitosis de CXCR4 mediada por SDF-1 α se inhibe mediante la transfección con oligonucleótidos interferentes específicos de MIIA, y en células tratadas con blebistatina, un inhibidor específico de las miosinas no musculares, que inhibe su actividad motora. Varias evidencias experimentales apoyan la hipótesis de que diversas miosinas están implicadas en la internalización de los receptores de la superficie celular, ligando las vesículas endocíticas recubiertas de clatrina y la red cortical de actina. En este sentido, las miosinas I, V, VI y VII han sido directamente implicadas en el tráfico de membrana [181-185], aunque la miosina VI es la más estudiada [182, 186-192]. Pero hasta ahora no hay evidencias de la implicación de las miosinas de tipo II en procesos de endocitosis mediados por clatrina. Nuestros resultados revelan que la MIIA puede funcionar acoplando el receptor de quimiocinas CXCR4 de la membrana con la maquinaria de endocitosis de la célula. En contraste con otros tipos celulares, en linfocitos la endocitosis del receptor de transferrina aumenta mediante la exposición de la célula a su ligando, la transferrina, y a menudo se usa como modelo de endocitosis mediada por clatrina [193-195]. Sin embargo, nuestros resultados indican que la MIIA no está implicada en la internalización del receptor de transferrina, sugiriendo que este mecanismo molecular es específico para la endocitosis de receptores de quimiocinas. Estas observaciones, junto con la falta de inhibición de la endocitosis de CXCR4 inducida por PMA, excluyen la posibilidad de que la MIIA tenga un papel general en la endocitosis mediada por clatrina.

Los resultados contenidos en este estudio indican que la actividad funcional de la MIIA está regulada mediante la unión del ligando a CXCR4, actuando como un mecanismo de apagado de las señales inducidas por las quimiocinas. En concordancia con el hecho de que la quimiocina promueve una rápida internalización del receptor dependiente de la MIIA, puede hipotetizarse

que, durante la migración celular, a concentraciones de quimiocinas medias-bajas (en las que solamente una pequeña fracción del CXCR4 de la célula estaría activado), la mayor parte de la MIIA permanecería acoplada al receptor de quimiocinas, sin promover su internalización. En cambio, en el foco inflamatorio, donde la concentración de quimiocina es muy elevada, la MIIA mediaría la internalización del receptor CXCR4. En este sentido, se ha descrito que el nivel umbral de agonista necesario para promover la endocitosis de los receptores CXCR1 y CXCR2 (300-500 nM) es significativamente mayor que la requerida para una actividad quimiotáctica máxima (50-100 nM) [196]. Por tanto, parece evidente que al silenciar la expresión de la MIIA y/o inhibir su función, favorece la persistencia del receptor de quimiocinas en la superficie celular, y aumenta la señalización intracelular, produciendo una mayor respuesta quimiotáctica. Todas estas observaciones sostienen la hipótesis de que la MIIA actúa como un regulador de los procesos mediados por SDF-1 α , mediante la inducción de la internalización de CXCR4, apagando así la señalización intracelular desencadenada por la quimiocina. Por tanto, la mayor respuesta migratoria que observamos en las células interferidas frente a MIIA se debe a una exposición más prolongada del receptor en la membrana plasmática. Por el contrario, los mutantes de delección de CXCR4 muestran defectos tanto en la internalización como en la señalización intracelular, de ahí que se vea abolida la migración inducida por la quimiocina [197].

Esta parte de nuestro estudio postula una nueva ruta de endocitosis para CXCR4, inducida por ligando. Esta ruta implica a la proteína motora MIIA *via* su interacción con el receptor CXCR4. La MIIA podría actuar, por tanto, como una molécula adaptadora para CXCR4 y otras moléculas de la ruta endocítica, permitiendo un modo alternativo de interacción específico para el receptor de quimiocinas.

2 Asociación entre CXCR4 y drebrina, y función de dicha asociación en la sinapsis inmune.

En esta tesis se describe por primera vez la interacción entre la drebrina y el receptor de quimiocinas CXCR4 en linfocitos T mediante distintas estrategias experimentales. Los trabajos publicados hasta el momento se han centrado principalmente en la expresión y la función de la drebrina en neuronas y en tejidos neurales, donde se clonó e identificó por primera vez [154]. De este modo, se han descrito altos niveles de expresión de esta proteína en el córtex cerebral, el hipocampo, la amígdala, el tálamo, y el estriado [155, 167]. En el cerebro la drebrina parece regular la plasticidad neuronal de la sinapsis nerviosa [167, 198], y la morfología y el desarrollo de las neuritas [161, 199-201]. Así, se ha demostrado que la drebrina se acumula específicamente en las espinas dendríticas donde regula su morfología y su densidad, mediante el reordenamiento de los filamentos citoesqueléticos de actina [167, 169, 175]. La drebrina A se acumula en la sinapsis nerviosa y recluta la proteína PSD-95 a la sinapsis durante el desarrollo neuronal [202]. El uso de oligonucleótidos interferentes frente a la drebrina disminuye marcadamente la

densidad y la anchura de las espinas, y los filopodios en las neuronas hipocampales cultivadas [202]. La capacidad de la drebrina para remodelar rápidamente las membranas celulares explica por qué la drebrina está involucrada en el cambio dependiente de actividad de la morfología y la densidad de las espinas dendríticas [203, 204].

Varios estudios más recientes han descrito la drebrina en tejidos no neuronales, incluyendo el estómago, epitelio de riñón, vejiga urinaria, colon, queratinocitos y células mesangiales [171, 172, 205, 206] encontrándose enriquecida en las estructuras de protrusión y en las placas de las uniones adherentes [176, 207, 208]. Puesto que se ha descrito que la drebrina regula la plasticidad de la sinapsis nerviosa y la morfología de las dendritas, que son estructuras importantes para la polaridad celular, nos hemos planteado analizar su comportamiento en el modelo análogo de polarización celular de la SI. Nuestros resultados demuestran que la drebrina se expresa en linfocitos primarios, en reposo y en blastos diferenciados, y en la línea celular T derivada de Jurkat, J77, en consonancia con los trabajos que describen su expresión en tejidos no neurales. Así, se relocaliza a la zona de contacto entre el linfocito T y la CPA de forma específica y dependiente de la estimulación con superantígeno. Además, el análisis de la localización subcelular indica que la drebrina colocaliza con el anillo de F-actina en la SI, rodeando el agregado central de CD3 que marca el SMAC central, y colocalizando tanto con marcadores del SMAC periférico como del SMAC distal, tales como la talina, y el complejo Arp2/3 y la cofilina, respectivamente, de acuerdo con otros estudios que describen la colocalización de la drebrina con los filamentos de actina [167, 169, 175].

Se ha descrito recientemente que algunos receptores de quimiocinas se relocalizan a la zona de contacto durante la formación de la SI madura entre un linfocito T y una CPA [121]. Nuestros resultados de colocalización y asociación entre la drebrina y el receptor CXCR4 endógeno apoyan esta observación situando a ambas moléculas rodeando el agregado central de CD3. Además, las dinámicas de relocalización y de interacción indican que ambas moléculas siguen la misma cinética, sugiriendo que se reclutan de modo similar a la SI. El incremento de la interacción basal entre ambas moléculas a lo largo del tiempo y en la zona del contacto, podría sugerir que CXCR4 se recluta junto con la drebrina para mediar otros efectos añadidos al anclaje del receptor. En este sentido, se ha descrito que la drebrina estabiliza a los receptores de membrana a los que se une [176, 202], lo que sugiere que al incrementar su interacción con CXCR4 en la zona de contacto estabilizaría al receptor en dicha posición. En consonancia, los experimentos de silenciamiento de la expresión de drebrina con ARN interferente revelan una deslocalización parcial de CXCR4 en la SI. Sin embargo, este efecto observado no se debe a una alteración de la expresión de CXCR4 ni de otras moléculas relevantes en la formación de la SI, al contrario de lo que ocurre con HIP-55/Abp1, otro miembro de la familia de la drebrina que se relocaliza a la zona de contacto durante la formación de la SI [209]. Adicionalmente, nuestro laboratorio ha descrito previamente la asociación basal entre CXCR4 y MIIA. En esta

línea, se ha descrito que la drebrina puede regular la actividad motora de las miosinas [167, 210, 211], de modo que el incremento de la interacción entre la drebrina y CXCR4 podría proteger al receptor frente a la endocitosis, y así facilitar la acumulación y la señalización del receptor en la zona de contacto. Otra explicación para el enriquecimiento de CXCR4 en la SI podría deberse a la activación de otras rutas de señalización de proteínas G distintas de la G_i , como se ha descrito para la ruta G_q [121]. En este sentido, la heterodimerización de CXCR4 con otros receptores de quimiocinas, como CCR5 o CCR2, podría contribuir a la estabilización en la membrana induciendo la ruta de proteínas G_{11} o G_q [5, 81].

Por otra parte, los efectos observados sobre el citoesqueleto de actina al silenciar la drebrina, sugieren que la localización de CXCR4 en la SI refuerza la adhesión tal y como se ha propuesto anteriormente [121]. De este modo, la localización de CXCR4 en la zona de contacto entre el linfocito T y la CPA evitaría señales activadoras de la migración en otras zonas de la célula durante la SI. Además, CXCR4 puede regular la polimerización de actina mediante el reclutamiento y la activación de moléculas señalizadoras promotoras de la polimerización de actina, como Vav1, Rac1, Cdc42, PI3K, RhoA o mDia [9], con lo que estabilizando CXCR4 en la SI redundaría en un mayor enriquecimiento de F-actina en la zona del contacto. La adhesión más estable permite una correcta señalización y la activación del linfocito T [51, 121]. Adicionalmente, otros estudios recientes indican que CXCR4 se asocia al TCR y señala implicando las cascadas de señales de ZAP-70, SLP76, e ITK [120, 212], pudiendo contribuir a la señalización del TCR y al efecto sobre el contenido de F-actina en la SI. Recientemente se ha descrito que a los pocos segundos tras el contacto entre el linfocito y la CPA (sinapsis inmune inmadura), la señalización del TCR se inicia en microagregados de TCR periféricos en la zona de contacto [57, 213-215]. A los pocos minutos, la sinapsis inmune madura y se forman los SMACs [35, 44, 216]. Nuestros resultados, junto a los resultados de los grupos del Dr. Kumar y la Dra. Viola, que muestra la activación de los CKR a los dos minutos tras la estimulación del TCR, sugieren que CXCR4, que se asocia al TCR y a la MIIA [18, 120], podría asociarse a los microagregados del TCR durante las primeras etapas de la SI inmadura y participar en la señalización y el transporte centrípeto dependiente de MIIA y de actina [140]. Posteriormente, durante la maduración de la SI, el transporte de los microagregados del TCR iría enriqueciendo de CXCR4 los anillos encargados de la adhesión, con lo que CXCR4 abandonaría los agregados de TCR no señalizadores que se dirigen a la ruta endocítica en el SMAC central [213, 217], contribuyendo a estabilizar la interacción en el SMAC periférico. En esta línea se situarían los resultados que revelan el incremento de la interacción basal entre CXCR4 y drebrina en la zona del contacto, y los trabajos que describen el papel regulador de la drebrina sobre las miosinas [167, 210, 211]. Además, los CKR regulan la afinidad y la avidéz de las integrinas [4], por lo que la relocalización de los CKR en el SMAC periférico podría contribuir a la estimulación de la adhesión mediada por integrinas.

Sin embargo, no se puede descartar un efecto directo de la interferencia de la drebrina

sobre el citoesqueleto de actina en la SI, en consonancia con nuestros resultados que demuestran que la drebrina desempeña un papel fundamental en la regulación de la dinámica de actina en los linfocitos T durante el proceso clave de reconocimiento del antígeno. Varios estudios sugieren que la drebrina está implicada en la regulación de la dinámica de actina, aunque no se conocen los mecanismos precisos [158, 162, 169, 218, 219]. En este sentido, se ha descrito que la drebrina puede unirse directamente a la actina e interactuar con otras moléculas reguladoras del citoesqueleto de actina mediante su dominio ADF-H de la región N terminal [170]. Así, la drebrina compite por su unión a F-actina con la fascina, la α -actinina y la tropomiosina [165, 166]. A su vez, la drebrina es capaz de regular la actividad motora de algunas miosinas [167, 210, 211], además de interactuar directamente con la profilina, otra proteína promotora de la polimerización de actina, mediante su región rica en prolinas [168, 203]. Sin embargo, la unión de la drebrina a la F-actina también facilita el reclutamiento de otras proteínas remodeladoras de los filamentos de actina, como la gelsolina. Así, la sobreexpresión de la drebrina tiene como consecuencia, la disociación de la tropomiosina de los filamentos de actina induciendo cambios dramáticos en las fibras de estrés y la formación de protrusiones parecidas a las dendritas [158, 162, 167, 169]. Además presenta otra región de 85 aminoácidos centrales (residuos 233 al 317) necesaria y suficiente para unir y remodelar la F-actina, y un dominio en el extremo C-terminal, de interacción con otras proteínas, de tipo SH3 [175, 176], por el que puede reclutar a Cdc42, un efector fundamental para la polimerización de actina en la SI [9], a través de su interacción con Homer-2 [164]. En la misma línea se sitúan nuestros resultados de la interacción de CXCR4 y drebrina, mediante sus regiones C y N terminal respectivamente, y el efecto de la interferencia de la drebrina sobre el contenido de F-actina en la SI. Así, la drebrina puede utilizar el dominio de unión ADF-H de la región N-terminal, la región central de unión a actina con alta afinidad, la región rica en prolinas y el dominio de interacción con proteínas de su región C terminal para interactuar simultáneamente con las regiones citoplasmáticas de las proteínas transmembrana, proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina y los filamentos de actina [176]. Esto sitúa a la drebrina en la interfase entre las señales extracelulares y las posibles respuestas celulares que están mediadas mediante el reordenamiento del citoesqueleto de actina submembranoso [176]. Asimismo, la drebrina podría utilizar la capacidad para interactuar con receptores de adhesión en la membrana y de remodelación de la actina, para organizar las moléculas de adhesión en el SMAC periférico. En este sentido, nuestros resultados de silenciamiento de la drebrina revelan también una deslocalización parcial de ICAM1, durante la formación de la SI (resultados no mostrados), sin afectar a la acumulación de CD3 en el SMAC central.

El silenciamiento específico de la drebrina reveló que esta proteína es necesaria tanto para la acumulación masiva de F-actina que se produce en la SI, como para la posterior síntesis de IL-2. En este sentido, se ha demostrado que HIP-55/Abp1, otro miembro de la familia drebrina/Abp1, desempeña un papel en la activación y proliferación de células T a través de su interacción con las moléculas que participan en la señalización de TCR, como HPK1 y ZAP-70 [220]. Por

otra parte, HIP-55 también se redistribuye a la zona de contacto entre los linfocitos T y las CPA, jugando un papel regulador en la formación de la SI [209]. Sin embargo, a diferencia de la drebrina, HIP-55 no parece estar involucrado en la polimerización de la actina en la SI [209]. Por otra parte, la falta de estimulación de la ruta de las proteínas G_q por el receptor CXCR4 estabilizado en la SI, podría explicar el defecto en la activación del linfocito y en la secreción de IL-2 que observamos con el silenciamiento de la drebrina [221]. En la misma línea, un menor reclutamiento de Vav1 mediado por CXCR4 en el contacto junto a una menor polimerización de F-actina también podría explicar el descenso en la secreción de IL-2 [9]. Además, HIP-55 se ha implicado en la regulación de la transcripción génica inducida tras la activación del TCR [209], con lo que no se puede descartar un efecto similar por parte de la drebrina.

Finalmente, HIP-55 es sustrato de las quinasas Src y Syk, regulando su actividad mediante fosforilaciones [209, 222]. En esta línea, la drebrina también se fosforila en residuos de serina y treonina [223], sugiriendo un posible mecanismo regulador que explicaría su capacidad de interacción con las diferentes proteínas de la membrana y del citoesqueleto de actina.

En resumen nuestros resultados muestran a la drebrina y la MIIA como nuevos efectores moleculares, que conectan CXCR4 con el citoesqueleto de actina y afectan a los principales procesos fisiológicos durante el desarrollo de la respuesta inmune.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El receptor de quimiocinas CXCR4 y la proteína motora MIIA colocalizan en la membrana de las células T en reposo y durante las primeras etapas de la internalización de CXCR4 inducida por la quimiocina SDF-1 α . Además, la alteración de la función de la MIIA bien mediante la inhibición de su actividad motora con inhibidores químicos o bien mediante el silenciamiento con oligos interferentes afecta negativamente la endocitosis de CXCR4, originando una mayor respuesta quimiotáctica frente a SDF-1 α . Por tanto, la proteína motora MIIA modula la señalización de CXCR4 conectando al receptor con la ruta endocítica dependiente de la estimulación con SDF-1 α .
2. El receptor de quimiocinas CXCR4 y la proteína de unión a actina, drebrina, se asocian en células T en reposo mediante sus regiones citoplasmática y amino terminal, respectivamente. La región carboxilo terminal de la drebrina regula negativamente esta asociación.
3. La drebrina se relocaliza a la zona de contacto durante la formación de la SI colocalizando con marcadores de los SMAC, periférico y distal, y rodeando al SMAC central.
4. El receptor de quimiocinas CXCR4 endógeno se relocaliza a la zona de contacto durante la formación de la SI con la misma cinética de relocalización que la drebrina, colocalizando ambas moléculas en el SMAC periférico. Además la interacción entre el receptor CXCR4 y la drebrina se incrementa con la estimulación con superantígeno y es máxima en la zona de contacto entre la célula T y la célula presentadora de antígeno.
5. El silenciamiento de la drebrina con oligos interferentes inhibe la relocalización del receptor CXCR4 y la polimerización de actina en la zona de contacto durante la formación de la SI, desencadenando una menor secreción de IL-2. Sin embargo, estos efectos no son debidos a una alteración de la expresión en la membrana celular de las principales moléculas implicadas en la formación de la sinapsis inmune. Por tanto la drebrina es necesaria para una completa activación de la célula T.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Burkhardt, J.K., Carrizosa, E., and Shaffer, M.H. (2008). The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 26, 233-259.
2. Viola, A., Contento, R.L., and Molon, B. (2006). T cells and their partners: The chemokine dating agency. *Trends Immunol* 27, 421-427.
3. Billadeau, D.D., Nolz, J.C., and Gomez, T.S. (2007). Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol* 7, 131-143.
4. Kinashi, T. (2005). Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 5, 546-559.
5. Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Manes, S., and Martinez, A.C. (2001). Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol* 19, 397-421.
6. Kinashi, T. (2007). Integrin regulation of lymphocyte trafficking: lessons from structural and signaling studies. *Adv Immunol* 93, 185-227.
7. Barreiro, O., de la Fuente, H., Mittelbrunn, M., and Sanchez-Madrid, F. (2007). Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev* 218, 147-164.
8. Vicente-Manzanares, M., and Sanchez-Madrid, F. (2004). Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* 4, 110-122.
9. Gomez, T.S., and Billadeau, D.D. (2008). T cell activation and the cytoskeleton: you can't have one without the other. *Adv Immunol* 97, 1-64.
10. Gomez-Mouton, C., Abad, J.L., Mira, E., Lacalle, R.A., Gallardo, E., Jimenez-Baranda, S., Illa, I., Bernad, A., Manes, S., and Martinez, A.C. (2001). Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9642-9647.
11. Nieto, M., Frade, J.M., Sancho, D., Mellado, M., Martinez, A.C., and Sanchez-Madrid, F. (1997). Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis. *J Exp Med* 186, 153-158.
12. Campanero, M.R., Sanchez-Mateos, P., del Pozo, M.A., and Sanchez-Madrid, F. (1994). ICAM-3 regulates lymphocyte morphology and integrin-mediated T cell interaction with endothelial cell and extracellular matrix ligands. *J Cell Biol* 127, 867-878.
13. del Pozo, M.A., Sanchez-Mateos, P., Nieto, M., and Sanchez-Madrid, F. (1995). Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol* 131, 495-508.
14. Friedl, P., and Brocker, E.B. (2000). T cell migration in three-dimensional extracellular matrix: guidance by polarity and sensations. *Dev Immunol* 7, 249-266.
15. Entschladen, F., Niggemann, B., Zanker, K.S., and Friedl, P. (1997). Differential requirement of protein tyrosine kinases and protein kinase C in the regulation of T cell locomotion in three-dimensional collagen matrices. *J Immunol* 159, 3203-3210.
16. Burbach, B.J., Medeiros, R.B., Mueller, K.L., and Shimizu, Y. (2007). T-cell receptor signaling to integrins. *Immunol Rev* 218, 65-81.

17. Volkov, Y., Long, A., McGrath, S., Ni Eidhin, D., and Kelleher, D. (2001). Crucial importance of PKC-beta(I) in LFA-1-mediated locomotion of activated T cells. *Nat Immunol* 2, 508-514.
18. Rey, M., Vicente-Manzanares, M., Viedma, F., Yanez-Mo, M., Urzainqui, A., Barreiro, O., Vazquez, J., and Sanchez-Madrid, F. (2002). Cutting edge: association of the motor protein nonmuscle myosin heavy chain-IIA with the C terminus of the chemokine receptor CXCR4 in T lymphocytes. *J Immunol* 169, 5410-5414.
19. Smith, A., Bracke, M., Leitinger, B., Porter, J.C., and Hogg, N. (2003). LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J Cell Sci* 116, 3123-3133.
20. Vicente-Manzanares, M., Cabrero, J.R., Rey, M., Perez-Martinez, M., Ursa, A., Itoh, K., and Sanchez-Madrid, F. (2002). A role for the Rho-p160 Rho coiled-coil kinase axis in the chemokine stromal cell-derived factor-1alpha-induced lymphocyte actomyosin and microtubular organization and chemotaxis. *J Immunol* 168, 400-410.
21. Ratner, S., Sherrod, W.S., and Lichlyter, D. (1997). Microtubule retraction into the uropod and its role in T cell polarization and motility. *J Immunol* 159, 1063-1067.
22. Sanchez-Madrid, F., and del Pozo, M.A. (1999). Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* 18, 501-511.
23. Serrador, J.M., Alonso-Lebrero, J.L., del Pozo, M.A., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Calvo, J., Lozano, F., and Sanchez-Madrid, F. (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, 1409-1423.
24. Sanchez-Madrid, F., and Serrador, J.M. (2009). Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 353-359.
25. del Pozo, M.A., Nieto, M., Serrador, J.M., Sancho, D., Vicente-Manzanares, M., Martinez, C., and Sanchez-Madrid, F. (1998). The two poles of the lymphocyte: specialized cell compartments for migration and recruitment. *Cell Adhes Commun* 6, 125-133.
26. Fanning, A., Volkov, Y., Freeley, M., Kelleher, D., and Long, A. (2005). CD44 cross-linking induces protein kinase C-regulated migration of human T lymphocytes. *Int Immunol* 17, 449-458.
27. Serrador, J.M., Nieto, M., Alonso-Lebrero, J.L., del Pozo, M.A., Calvo, J., Furthmayr, H., Schwartz-Albiez, R., Lozano, F., Gonzalez-Amaro, R., Sanchez-Mateos, P., et al. (1998). CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* 91, 4632-4644.
28. Volkov, Y., Long, A., and Kelleher, D. (1998). Inside the crawling T cell: leukocyte function-associated antigen-1 cross-linking is associated with microtubule-directed translocation of protein kinase C isoenzymes beta(I) and delta. *J Immunol* 161, 6487-6495.
29. Lee, J.H., Katakai, T., Hara, T., Gonda, H., Sugai, M., and Shimizu, A. (2004). Roles of p-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation. *J Cell Biol* 167, 327-337.
30. Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K., and Tsukita, S. (1998). Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* 140, 647-657.
31. Matsui, T., Yonemura, S., and Tsukita, S. (1999). Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol* 9, 1259-1262.

32. Serrador, J.M., Vicente-Manzanares, M., Calvo, J., Barreiro, O., Montoya, M.C., Schwartz-Albiez, R., Furthmayr, H., Lozano, F., and Sanchez-Madrid, F. (2002). 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, 10400-10409.
33. Billadeau, D.D., and Burkhardt, J.K. (2006). Regulation of cytoskeletal dynamics at the immune synapse: new stars join the actin troupe. *Traffic* 7, 1451-1460.
34. del Pozo, M.A., Cabanas, C., Montoya, M.C., Ager, A., Sanchez-Mateos, P., and Sanchez-Madrid, F. (1997). ICAMs redistributed by chemokines to cellular uropods as a mechanism for recruitment of T lymphocytes. *J Cell Biol* 137, 493-508.
35. Dustin, M.L. (2009). The cellular context of T cell signaling. *Immunity* 30, 482-492.
36. Bunnell, S.C., Kapoor, V., Tribble, R.P., Zhang, W., and Samelson, L.E. (2001). Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity* 14, 315-329.
37. Tskvitaria-Fuller, I., Rozelle, A.L., Yin, H.L., and Wulfig, C. (2003). Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization. *J Immunol* 171, 2287-2295.
38. Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H., and Lanzavecchia, A. (1995). Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J Exp Med* 181, 577-584.
39. Kupfer, A., and Dennert, G. (1984). Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol* 133, 2762-2766.
40. Kupfer, A., Swain, S.L., and Singer, S.J. (1987). The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *J Exp Med* 165, 1565-1580.
41. Cullinan, P., Sperling, A.I., and Burkhardt, J.K. (2002). The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse. *Immunol Rev* 189, 111-122.
42. Krummel, M.F., Sjaastad, M.D., Wulfig, C., and Davis, M.M. (2000). Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science* 289, 1349-1352.
43. Cemerski, S., and Shaw, A. (2006). Immune synapses in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 18, 298-304.
44. Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
45. Saito, T., and Yokosuka, T. (2006). Immunological synapse and microclusters: the site for recognition and activation of T cells. *Curr Opin Immunol* 18, 305-313.
46. Sims, T.N., Soos, T.J., Xenias, H.S., Dubin-Thaler, B., Hofman, J.M., Waite, J.C., Cameron, T.O., Thomas, V.K., Varma, R., Wiggins, C.H., et al. (2007). Opposing effects of PKCtheta and WASp on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse. *Cell* 129, 773-785.
47. Irvine, D.J., Purbhoo, M.A., Krosgaard, M., and Davis, M.M. (2002). Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* 419, 845-849.
48. Dustin, M.L. (2005). A dynamic view of the immunological synapse. *Semin Immunol* 17, 400-410.
49. Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., and Griffiths, G.M. (2001). The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15, 751-

- 761.
50. Stinchcombe, J.C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S., and Griffiths, G.M. (2006). Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443, 462-465.
 51. Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T., and Dustin, M.L. (2006). T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* 25, 117-127.
 52. Wulfig, C., and Davis, M.M. (1998). A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* 282, 2266-2269.
 53. Moss, W.C., Irvine, D.J., Davis, M.M., and Krummel, M.F. (2002). Quantifying signaling-induced reorientation of T cell receptors during immunological synapse formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15024-15029.
 54. Caplan, S., and Baniyash, M. (2000). Searching for significance in TCR-cytoskeleton interactions. *Immunol Today* 21, 223-228.
 55. Rozdzial, M.M., Malissen, B., and Finkel, T.H. (1995). Tyrosine-phosphorylated T cell receptor zeta chain associates with the actin cytoskeleton upon activation of mature T lymphocytes. *Immunity* 3, 623-633.
 56. Badour, K., Zhang, J., and Siminovitch, K.A. (2003). The Wiskott-Aldrich syndrome protein: forging the link between actin and cell activation. *Immunol Rev* 192, 98-112.
 57. Campi, G., Varma, R., and Dustin, M.L. (2005). Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med* 202, 1031-1036.
 58. Turner, M., and Billadeau, D.D. (2002). VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2, 476-486.
 59. Wulfig, C., Bauch, A., Crabtree, G.R., and Davis, M.M. (2000). The vav exchange factor is an essential regulator in actin-dependent receptor translocation to the lymphocyte-antigen-presenting cell interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10150-10155.
 60. Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.
 61. Montoya, M.C., Sancho, D., Vicente-Manzanares, M., and Sanchez-Madrid, F. (2002). Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev* 186, 68-82.
 62. Campanero, M.R., del Pozo, M.A., Arroyo, A.G., Sanchez-Mateos, P., Hernandez-Caselles, T., Craig, A., Pulido, R., and Sanchez-Madrid, F. (1993). ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathway. *J Cell Biol* 123, 1007-1016.
 63. Juan, M., Vinas, O., Pino-Otin, M.R., Places, L., Martinez-Caceres, E., Barcelo, J.J., Miralles, A., Vilella, R., de la Fuente, M.A., Vives, J., et al. (1994). CD50 (intercellular adhesion molecule 3) stimulation induces calcium mobilization and tyrosine phosphorylation through p59fyn and p56lck in Jurkat T cell line. *J Exp Med* 179, 1747-1756.
 64. Montoya, M.C., Sancho, D., Bonello, G., Collette, Y., Langlet, C., He, H.T., Aparicio, P., Alcover, A., Olive, D., and Sanchez-Madrid, F. (2002). Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs. *Nat Immunol* 3, 159-168.
 65. Ingulli, E., Mondino, A., Khoruts, A., and Jenkins, M.K. (1997). In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *J Exp Med* 185, 2133-2141.
 66. Kupfer, H., Monks, C.R., and Kupfer, A. (1994). Small splenic B cells that bind to

- antigen-specific T helper (Th) cells and face the site of cytokine production in the Th cells selectively proliferate: immunofluorescence microscopic studies of Th-B antigen-presenting cell interactions. *J Exp Med* 179, 1507-1515.
67. Davis, D.M., Chiu, I., Fassett, M., Cohen, G.B., Mandelboim, O., and Strominger, J.L. (1999). The human natural killer cell immune synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15062-15067.
 68. Freiberg, B.A., Kupfer, H., Maslanik, W., Delli, J., Kappler, J., Zaller, D.M., and Kupfer, A. (2002). Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat Immunol* 3, 911-917.
 69. Kupfer, A., and Kupfer, H. (2003). Imaging immune cell interactions and functions: SMACs and the Immunological Synapse. *Semin Immunol* 15, 295-300.
 70. van der Merwe, P.A. (2002). Formation and function of the immunological synapse. *Curr Opin Immunol* 14, 293-298.
 71. Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242.
 72. Rottman, J.B. (1999). Key role of chemokines and chemokine receptors in inflammation, immunity, neoplasia, and infectious disease. *Vet Pathol* 36, 357-367.
 73. Salcedo, R., and Oppenheim, J.J. (2003). Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation* 10, 359-370.
 74. Springer, T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76, 301-314.
 75. Hancock, W.W., Wang, L., Ye, Q., Han, R., and Lee, I. (2003). Chemokines and their receptors as markers of allograft rejection and targets for immunosuppression. *Curr Opin Immunol* 15, 479-486.
 76. Rollins, B.J. (1997). Chemokines. *Blood* 90, 909-928.
 77. Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., et al. (1998). Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187, 129-134.
 78. D'Souza, M.P., and Harden, V.A. (1996). Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research. *Nat Med* 2, 1293-1300.
 79. Littman, D.R. (1998). Chemokine receptors: keys to AIDS pathogenesis? *Cell* 93, 677-680.
 80. Schluger, N.W., and Rom, W.N. (1997). Early responses to infection: chemokines as mediators of inflammation. *Curr Opin Immunol* 9, 504-508.
 81. Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Vila-Coro, A.J., Fernandez, S., Martin de Ana, A., Jones, D.R., Toran, J.L., and Martinez, A.C. (2001). Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J* 20, 2497-2507.
 82. Moser, B., and Willmann, K. (2004). Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis* 63 Suppl 2, ii84-ii89.
 83. Moser, B., Wolf, M., Walz, A., and Loetscher, P. (2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25, 75-84.
 84. Rot, A., and von Andrian, U.H. (2004). Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 22, 891-928.
 85. Kehrl, J.H. (2006). Chemoattractant receptor signaling and the control of lymphocyte migration. *Immunol Res* 34, 211-227.

86. Horuk, R. (2001). Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 313-335.
87. Hur, E.M., and Kim, K.T. (2002). G protein-coupled receptor signalling and cross-talk: achieving rapidity and specificity. *Cell Signal* 14, 397-405.
88. Goldman, D.W., Chang, F.H., Gifford, L.A., Goetzl, E.J., and Bourne, H.R. (1985). Pertussis toxin inhibition of chemotactic factor-induced calcium mobilization and function in human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 162, 145-156.
89. Shefcyk, J., Yassin, R., Volpi, M., Molski, T.F., Naccache, P.H., Munoz, J.J., Becker, E.L., Feinstein, M.B., and Sha'afi, R.I. (1985). Pertussis but not cholera toxin inhibits the stimulated increase in actin association with the cytoskeleton in rabbit neutrophils: role of the "G proteins" in stimulus-response coupling. *Biochem Biophys Res Commun* 126, 1174-1181.
90. Kenakin, T. (2003). Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci* 24, 346-354.
91. Bulenger, S., Marullo, S., and Bouvier, M. (2005). Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* 26, 131-137.
92. Prinster, S.C., Hague, C., and Hall, R.A. (2005). Heterodimerization of g protein-coupled receptors: specificity and functional significance. *Pharmacol Rev* 57, 289-298.
93. Hernanz-Falcon, P., Rodriguez-Frade, J.M., Serrano, A., Juan, D., del Sol, A., Soriano, S.F., Roncal, F., Gomez, L., Valencia, A., Martinez, A.C., et al. (2004). Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization. *Nat Immunol* 5, 216-223.
94. Rodriguez-Frade, J.M., Mellado, M., and Martinez, A.C. (2001). Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends Immunol* 22, 612-617.
95. Thelen, M., Munoz, L.M., Rodriguez-Frade, J.M., and Mellado, M. (2009). Chemokine receptor oligomerization: functional considerations. *Curr Opin Pharmacol* 10, 38-43.
96. Kroeger, K.M., Pflieger, K.D., and Eidne, K.A. (2003). G-protein coupled receptor oligomerization in neuroendocrine pathways. *Front Neuroendocrinol* 24, 254-278.
97. Oh, P., and Schnitzer, J.E. (2001). Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. *Mol Biol Cell* 12, 685-698.
98. Rimoldi, V., Reversi, A., Taverna, E., Rosa, P., Francolini, M., Cassoni, P., Parenti, M., and Chini, B. (2003). Oxytocin receptor elicits different EGFR/MAPK activation patterns depending on its localization in caveolin-1 enriched domains. *Oncogene* 22, 6054-6060.
99. Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., Aragay, A., del Real, G., Martin, A.M., Vila-Coro, A.J., Serrano, A., Mayor, F., Jr., and Martinez, A.C. (1998). The chemokine monocyte chemotactic protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J Immunol* 161, 805-813.
100. Jiang, H., Kuang, Y., Wu, Y., Smrcka, A., Simon, M.I., and Wu, D. (1996). Pertussis toxin-sensitive activation of phospholipase C by the C5a and fMet-Leu-Phe receptors. *J Biol Chem* 271, 13430-13434.
101. Wilcox, R.A., Challiss, R.A., Baudin, G., Vasella, A., Potter, B.V., and Nahorski, S.R. (1993). Stereoselectivity of Ins(1,3,4,5)P4 recognition sites: implications for the mechanism of the Ins(1,3,4,5)P4-induced Ca²⁺ mobilization. *Biochem J* 294 (Pt 1), 191-194.
102. Wu, G., Benovic, J.L., Hildebrandt, J.D., and Lanier, S.M. (1998). Receptor docking

- sites for G-protein betagamma subunits. Implications for signal regulation. *J Biol Chem* 273, 7197-7200.
103. Bohm, S.K., Grady, E.F., and Bunnett, N.W. (1997). Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem J* 322 (Pt 1), 1-18.
 104. Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.
 105. Proudfoot, A.E., Wells, T.N., and Clapham, P.R. (1999). Chemokine receptors--future therapeutic targets for HIV? *Biochem Pharmacol* 57, 451-463.
 106. Wells, T.N., Power, C.A., and Proudfoot, A.E. (1998). Definition, function and pathophysiological significance of chemokine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 19, 376-380.
 107. Bommakanti, R.K., Dratz, E.A., Siemsen, D.W., and Jesaitis, A.J. (1995). Extensive contact between Gi2 and N-formyl peptide receptor of human neutrophils: mapping of binding sites using receptor-mimetic peptides. *Biochemistry* 34, 6720-6728.
 108. Tan, W., Martin, D., and Gutkind, J.S. (2006). The Galpha13-Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4. *J Biol Chem* 281, 39542-39549.
 109. Hamm, H.E. (1998). The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273, 669-672.
 110. Coso, O.A., Teramoto, H., Simonds, W.F., and Gutkind, J.S. (1996). Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway. *J Biol Chem* 271, 3963-3966.
 111. Harhammer, R., Gohla, A., and Schultz, G. (1996). Interaction of G protein Gbetagamma dimers with small GTP-binding proteins of the Rho family. *FEBS Lett* 399, 211-214.
 112. Vicente-Manzanares, M., Rey, M., Jones, D.R., Sancho, D., Mellado, M., Rodriguez-Frade, J.M., del Pozo, M.A., Yanez-Mo, M., de Ana, A.M., Martinez, A.C., et al. (1999). Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis. *J Immunol* 163, 4001-4012.
 113. Vicente-Manzanares, M., Rey, M., Perez-Martinez, M., Yanez-Mo, M., Sancho, D., Cabrero, J.R., Barreiro, O., de la Fuente, H., Itoh, K., and Sanchez-Madrid, F. (2003). The RhoA effector mDia is induced during T cell activation and regulates actin polymerization and cell migration in T lymphocytes. *J Immunol* 171, 1023-1034.
 114. Bockaert, J., and Pin, J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18, 1723-1729.
 115. Orsini, M.J., Parent, J.L., Mundell, S.J., Marchese, A., and Benovic, J.L. (1999). Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *J Biol Chem* 274, 31076-31086.
 116. Liu, K.D., Gaffen, S.L., and Goldsmith, M.A. (1998). JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol* 10, 271-278.
 117. Glodek, A.M., Le, Y., Dykxhoorn, D.M., Park, S.Y., Mostoslavsky, G., Mulligan, R., Lieberman, J., Beggs, H.E., Honczarenko, M., and Silberstein, L.E. (2007). Focal adhesion kinase is required for CXCL12-induced chemotactic and pro-adhesive responses in hematopoietic precursor cells. *Leukemia* 21, 1723-1732.
 118. Le, Y., Honczarenko, M., Glodek, A.M., Ho, D.K., and Silberstein, L.E. (2005). CXC

chemokine ligand 12-induced focal adhesion kinase activation and segregation into membrane domains is modulated by regulator of G protein signaling 1 in pro-B cells. *J Immunol* 174, 2582-2590.

119. Okabe, S., Fukuda, S., Kim, Y.J., Niki, M., Pelus, L.M., Ohyashiki, K., Pandolfi, P.P., and Broxmeyer, H.E. (2005). Stromal cell-derived factor-1alpha/CXCL12-induced chemotaxis of T cells involves activation of the RasGAP-associated docking protein p62Dok-1. *Blood* 105, 474-480.
120. Kumar, A., Humphreys, T.D., Kremer, K.N., Bramati, P.S., Bradfield, L., Edgar, C.E., and Hedin, K.E. (2006). CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells. *Immunity* 25, 213-224.
121. Molon, B., Gri, G., Bettella, M., Gomez-Mouton, C., Lanzavecchia, A., Martinez, A.C., Manes, S., and Viola, A. (2005). T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 6, 465-471.
122. Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208-1212.
123. Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-1709.
124. Goley, E.D., and Welch, M.D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 713-726.
125. Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
126. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 778-790.
127. Conti, M.A., and Adelstein, R.S. (2008). Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci* 121, 11-18.
128. Niederman, R., and Pollard, T.D. (1975). Human platelet myosin. II. In vitro assembly and structure of myosin filaments. *J Cell Biol* 67, 72-92.
129. Tan, J.L., Ravid, S., and Spudich, J.A. (1992). Control of nonmuscle myosins by phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 61, 721-759.
130. Golomb, E., Ma, X., Jana, S.S., Preston, Y.A., Kawamoto, S., Shoham, N.G., Goldin, E., Conti, M.A., Sellers, J.R., and Adelstein, R.S. (2004). Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem* 279, 2800-2808.
131. Simons, M., Wang, M., McBride, O.W., Kawamoto, S., Yamakawa, K., Gdula, D., Adelstein, R.S., and Weir, L. (1991). Human nonmuscle myosin heavy chains are encoded by two genes located on different chromosomes. *Circ Res* 69, 530-539.
132. Jana, S.S., Kim, K.Y., Mao, J., Kawamoto, S., Sellers, J.R., and Adelstein, R.S. (2009). An alternatively spliced isoform of non-muscle myosin II-C is not regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* 284, 11563-11571.
133. Li, Y., Lalwani, A.K., and Mhatre, A.N. (2008). Alternative splice variants of MYH9. *DNA Cell Biol* 27, 117-125.
134. Buxton, D.B., Golomb, E., and Adelstein, R.S. (2003). Induction of nonmuscle myosin heavy chain II-C by butyrate in RAW 264.7 mouse macrophages. *J Biol Chem* 278, 15449-15455.
135. Saez, C.G., Myers, J.C., Shows, T.B., and Leinwand, L.A. (1990). Human non

- muscle myosin heavy chain mRNA: generation of diversity through alternative polyadenylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1164-1168.
136. Murakami, N., Mehta, P., and Elzinga, M. (1991). Studies on the distribution of cellular myosin with antibodies to isoform-specific synthetic peptides. *FEBS Lett* 278, 23-25.
 137. Kolega, J. (1998). Cytoplasmic dynamics of myosin IIA and IIB: spatial 'sorting' of isoforms in locomoting cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 15), 2085-2095.
 138. Wei, Q., and Adelstein, R.S. (2000). Conditional expression of a truncated fragment of nonmuscle myosin II-A alters cell shape but not cytokinesis in HeLa cells. *Mol Biol Cell* 11, 3617-3627.
 139. Togo, T., and Steinhardt, R.A. (2004). Nonmuscle myosin IIA and IIB have distinct functions in the exocytosis-dependent process of cell membrane repair. *Mol Biol Cell* 15, 688-695.
 140. Ilani, T., Vasiliver-Shamis, G., Vardhana, S., Bretscher, A., and Dustin, M.L. (2009). T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA. *Nat Immunol* 10, 531-539.
 141. Jacobelli, J., Chmura, S.A., Buxton, D.B., Davis, M.M., and Krummel, M.F. (2004). A single class II myosin modulates T cell motility and stopping, but not synapse formation. *Nat Immunol* 5, 531-538.
 142. Tullio, A.N., Accili, D., Ferrans, V.J., Yu, Z.X., Takeda, K., Grinberg, A., Westphal, H., Preston, Y.A., and Adelstein, R.S. (1997). Nonmuscle myosin II-B is required for normal development of the mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12407-12412.
 143. Tullio, A.N., Bridgman, P.C., Tresser, N.J., Chan, C.C., Conti, M.A., Adelstein, R.S., and Hara, Y. (2001). Structural abnormalities develop in the brain after ablation of the gene encoding nonmuscle myosin II-B heavy chain. *J Comp Neurol* 433, 62-74.
 144. Uren, D., Hwang, H.K., Hara, Y., Takeda, K., Kawamoto, S., Tullio, A.N., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Tresser, N., Grinberg, A., et al. (2000). Gene dosage affects the cardiac and brain phenotype in nonmuscle myosin II-B-depleted mice. *J Clin Invest* 105, 663-671.
 145. Takeda, K., Kishi, H., Ma, X., Yu, Z.X., and Adelstein, R.S. (2003). Ablation and mutation of nonmuscle myosin heavy chain II-B results in a defect in cardiac myocyte cytokinesis. *Circ Res* 93, 330-337.
 146. Bridgman, P.C., Dave, S., Asnes, C.F., Tullio, A.N., and Adelstein, R.S. (2001). Myosin IIB is required for growth cone motility. *J Neurosci* 21, 6159-6169.
 147. Ben-Ya'acov, A., and Ravid, S. (2003). Epidermal growth factor-mediated transient phosphorylation and membrane localization of myosin II-B are required for efficient chemotaxis. *J Biol Chem* 278, 40032-40040.
 148. Lo, C.M., Buxton, D.B., Chua, G.C., Dembo, M., Adelstein, R.S., and Wang, Y.L. (2004). Nonmuscle myosin IIB is involved in the guidance of fibroblast migration. *Mol Biol Cell* 15, 982-989.
 149. Ma, X., Kawamoto, S., Hara, Y., and Adelstein, R.S. (2004). A point mutation in the motor domain of nonmuscle myosin II-B impairs migration of distinct groups of neurons. *Mol Biol Cell* 15, 2568-2579.
 150. Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L., Choi, C.K., and Horwitz, A.F. (2007). Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J Cell Biol* 176, 573-580.
 151. Ford, H.L., Silver, D.L., Kachar, B., Sellers, J.R., and Zain, S.B. (1997). Effect of Mts1 on the structure and activity of nonmuscle myosin II. *Biochemistry* 36, 16321-16327.

152. Obungu, V.H., Lee Burns, A., Agarwal, S.K., Chandrasekharapa, S.C., Adelstein, R.S., and Marx, S.J. (2003). Menin, a tumor suppressor, associates with nonmuscle myosin II-A heavy chain. *Oncogene* 22, 6347-6358.
153. Straight, A.F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N.J., Sellers, J.R., and Mitchison, T.J. (2003). Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science* 299, 1743-1747.
154. Shirao, T., Kojima, N., Kato, Y., and Obata, K. (1988). Molecular cloning of a cDNA for the developmentally regulated brain protein, drebrin. *Brain Res* 464, 71-74.
155. Shirao, T., and Obata, K. (1985). Two acidic proteins associated with brain development in chick embryo. *J Neurochem* 44, 1210-1216.
156. Shim, K.S., and Lubec, G. (2002). Drebrin, a dendritic spine protein, is manifold decreased in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neurosci Lett* 324, 209-212.
157. Sekino, Y., Kojima, N., and Shirao, T. (2007). Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochem Int* 51, 92-104.
158. Shirao, T., Kojima, N., and Obata, K. (1992). Cloning of drebrin A and induction of neurite-like processes in drebrin-transfected cells. *Neuroreport* 3, 109-112.
159. Toda, M., Shirao, T., Minoshima, S., Shimizu, N., Toya, S., and Uyemura, K. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding human drebrin E and chromosomal mapping of its gene. *Biochem Biophys Res Commun* 196, 468-472.
160. Shirao, T., Kojima, N., Terada, S., and Obata, K. (1990). Expression of three drebrin isoforms in the developing nervous system. *Neurosci Res Suppl* 13, S106-111.
161. Hayashi, K., and Shirao, T. (1999). Change in the shape of dendritic spines caused by overexpression of drebrin in cultured cortical neurons. *J Neurosci* 19, 3918-3925.
162. Asada, H., Uyemura, K., and Shirao, T. (1994). Actin-binding protein, drebrin, accumulates in submembranous regions in parallel with neuronal differentiation. *J Neurosci Res* 38, 149-159.
163. Kobayashi, R., Sekino, Y., Shirao, T., Tanaka, S., Ogura, T., Inada, K., and Saji, M. (2004). Antisense knockdown of drebrin A, a dendritic spine protein, causes stronger preference, impaired pre-pulse inhibition, and an increased sensitivity to psychostimulant. *Neurosci Res* 49, 205-217.
164. Shiraishi-Yamaguchi, Y., Sato, Y., Sakai, R., Mizutani, A., Knopfel, T., Mori, N., Mikoshiba, K., and Furuichi, T. (2009). Interaction of Cupidin/Homer2 with two actin cytoskeletal regulators, Cdc42 small GTPase and Drebrin, in dendritic spines. *BMC Neurosci* 10, 25.
165. Ishikawa, R., Hayashi, K., Shirao, T., Xue, Y., Takagi, T., Sasaki, Y., and Kohama, K. (1994). Drebrin, a development-associated brain protein from rat embryo, causes the dissociation of tropomyosin from actin filaments. *J Biol Chem* 269, 29928-29933.
166. Sasaki, Y., Hayashi, K., Shirao, T., Ishikawa, R., and Kohama, K. (1996). Inhibition by drebrin of the actin-bundling activity of brain fascin, a protein localized in filopodia of growth cones. *J Neurochem* 66, 980-988.
167. Hayashi, K., Ishikawa, R., Ye, L.H., He, X.L., Takata, K., Kohama, K., and Shirao, T. (1996). Modulatory role of drebrin on the cytoskeleton within dendritic spines in the rat cerebral cortex. *J Neurosci* 16, 7161-7170.
168. Mammoto, A., Sasaki, T., Asakura, T., Hotta, I., Imamura, H., Takahashi, K., Matsuura, Y., Shirao, T., and Takai, Y. (1998). Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 86-89.

169. Shirao, T., Hayashi, K., Ishikawa, R., Isa, K., Asada, H., Ikeda, K., and Uyemura, K. (1994). Formation of thick, curving bundles of actin by drebrin A expressed in fibroblasts. *Exp Cell Res* 215, 145-153.
170. Lappalainen, P., Kessels, M.M., Cope, M.J., and Drubin, D.G. (1998). The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module. *Mol Biol Cell* 9, 1951-1959.
171. Keon, B.H., Jedrzejewski, P.T., Paul, D.L., and Goodenough, D.A. (2000). Isoform specific expression of the neuronal F-actin binding protein, drebrin, in specialized cells of stomach and kidney epithelia. *J Cell Sci* 113 Pt 2, 325-336.
172. Luna, E.J., Pestonjamas, K.N., Cheney, R.E., Strassel, C.P., Lu, T.H., Chia, C.P., Hitt, A.L., Fehheimer, M., Furthmayr, H., and Mooseker, M.S. (1997). Actin-binding membrane proteins identified by F-actin blot overlays. *Soc Gen Physiol Ser* 52, 3-18.
173. Mittelbrunn, M., Molina, A., Escribese, M.M., Yanez-Mo, M., Escudero, E., Ursa, A., Tejedor, R., Mampaso, F., and Sanchez-Madrid, F. (2004). VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11058-11063.
174. Barrero-Villar, M., Cabrero, J.R., Gordon-Alonso, M., Barroso-Gonzalez, J., Alvarez-Losada, S., Munoz-Fernandez, M.A., Sanchez-Madrid, F., and Valenzuela-Fernandez, A. (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, 103-113.
175. Hayashi, K., Ishikawa, R., Kawai-Hirai, R., Takagi, T., Taketomi, A., and Shirao, T. (1999). Domain analysis of the actin-binding and actin-remodeling activities of drebrin. *Exp Cell Res* 253, 673-680.
176. Butkevich, E., Hulsmann, S., Wenzel, D., Shirao, T., Duden, R., and Majoul, I. (2004). Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr Biol* 14, 650-658.
177. Kojima, N., Kato, Y., Shirao, T., and Obata, K. (1988). Nucleotide sequences of two embryonic drebrins, developmentally regulated brain proteins, and developmental change in their mRNAs. *Brain Res* 464, 207-215.
178. Shirao, T. (1995). The roles of microfilament-associated proteins, drebrins, in brain morphogenesis: a review. *J Biochem* 117, 231-236.
179. Dittmar, M.T., McKnight, A., Simmons, G., Clapham, P.R., Weiss, R.A., and Simmonds, P. (1997). HIV-1 tropism and co-receptor use. *Nature* 385, 495-496.
180. Venkatesan, S., Rose, J.J., Lodge, R., Murphy, P.M., and Foley, J.F. (2003). Distinct mechanisms of agonist-induced endocytosis for human chemokine receptors CCR5 and CXCR4. *Mol Biol Cell* 14, 3305-3324.
181. Allan, V. (1995). Membrane traffic motors. *FEBS Lett* 369, 101-106.
182. Buss, F., Arden, S.D., Lindsay, M., Luzio, J.P., and Kendrick-Jones, J. (2001). Myosin VI isoform localized to clathrin-coated vesicles with a role in clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J* 20, 3676-3684.
183. Fan, G.H., Lapierre, L.A., Goldenring, J.R., Sai, J., and Richmond, A. (2004). Rab11-family interacting protein 2 and myosin Vb are required for CXCR2 recycling and receptor-mediated chemotaxis. *Mol Biol Cell* 15, 2456-2469.
184. Soldati, T. (2003). Unconventional myosins, actin dynamics and endocytosis: a menage a trois? *Traffic* 4, 358-366.
185. Tuxworth, R.I., and Titus, M.A. (2000). Unconventional myosins: anchors in the

membrane traffic relay. *Traffic* 1, 11-18.

186. Buss, F., Luzio, J.P., and Kendrick-Jones, J. (2001). Myosin VI, a new force in clathrin mediated endocytosis. *FEBS Lett* 508, 295-299.
187. Buss, F., Luzio, J.P., and Kendrick-Jones, J. (2002). Myosin VI, an actin motor for membrane traffic and cell migration. *Traffic* 3, 851-858.
188. Frank, D.J., Noguchi, T., and Miller, K.G. (2004). Myosin VI: a structural role in actin organization important for protein and organelle localization and trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 16, 189-194.
189. Hasson, T. (2003). Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J Cell Sci* 116, 3453-3461.
190. Morris, S.M., Arden, S.D., Roberts, R.C., Kendrick-Jones, J., Cooper, J.A., Luzio, J.P., and Buss, F. (2002). Myosin VI binds to and localises with Dab2, potentially linking receptor-mediated endocytosis and the actin cytoskeleton. *Traffic* 3, 331-341.
191. Osterweil, E., Wells, D.G., and Mooseker, M.S. (2005). A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis. *J Cell Biol* 168, 329-338.
192. Spudich, G., Chibalina, M.V., Au, J.S., Arden, S.D., Buss, F., and Kendrick-Jones, J. (2007). Myosin VI targeting to clathrin-coated structures and dimerization is mediated by binding to Disabled-2 and PtdIns(4,5)P2. *Nat Cell Biol* 9, 176-183.
193. Batista, A., Millan, J., Mittelbrunn, M., Sanchez-Madrid, F., and Alonso, M.A. (2004). Recruitment of transferrin receptor to immunological synapse in response to TCR engagement. *J Immunol* 172, 6709-6714.
194. Das, V., Nal, B., Dujeancourt, A., Thoulouze, M.I., Galli, T., Roux, P., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. (2004). Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse; involvement of SNARE complexes. *Immunity* 20, 577-588.
195. Ponka, P., and Lok, C.N. (1999). The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 1111-1137.
196. Rose, J.J., Foley, J.F., Murphy, P.M., and Venkatesan, S. (2004). On the mechanism and significance of ligand-induced internalization of human neutrophil chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *J Biol Chem* 279, 24372-24386.
197. Haribabu, B., Richardson, R.M., Fisher, I., Sozzani, S., Peiper, S.C., Horuk, R., Ali, H., and Snyderman, R. (1997). Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J Biol Chem* 272, 28726-28731.
198. Kobayashi, S., Shirao, T., and Sasaki, T. (2001). Drebrin expression is increased in spinal motoneurons of rats after axotomy. *Neurosci Lett* 311, 165-168.
199. Ivanov, A., Esclapez, M., Pellegrino, C., Shirao, T., and Ferhat, L. (2009). Drebrin A regulates dendritic spine plasticity and synaptic function in mature cultured hippocampal neurons. *J Cell Sci* 122, 524-534.
200. Takahashi, H., Sekino, Y., Tanaka, S., Mizui, T., Kishi, S., and Shirao, T. (2003). Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci* 23, 6586-6595.
201. Toda, M., Shirao, T., and Uyemura, K. (1999). Suppression of an actin-binding protein, drebrin, by antisense transfection attenuates neurite outgrowth in neuroblastoma B104 cells. *Brain Res Dev Brain Res* 114, 193-200.
202. Takahashi, H., Mizui, T., and Shirao, T. (2006). Down-regulation of drebrin A expression suppresses synaptic targeting of NMDA receptors in developing hippocampal neurones. *J Neurochem* 97 Suppl 1, 110-115.

203. Majoul, I., Shirao, T., Sekino, Y., and Duden, R. (2007). Many faces of drebrin: from building dendritic spines and stabilizing gap junctions to shaping neurite-like cell processes. *Histochem Cell Biol* *127*, 355-361.
204. Shirao, T., and Sekino, Y. (2001). Clustering and anchoring mechanisms of molecular constituents of postsynaptic scaffolds in dendritic spines. *Neurosci Res* *40*, 1-7.
205. Peitsch, W.K., Hofmann, I., Bulkescher, J., Hergt, M., Spring, H., Bleyl, U., Goerdts, S., and Franke, W.W. (2005). Drebrin, an actin-binding, cell-type characteristic protein: induction and localization in epithelial skin tumors and cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* *125*, 761-774.
206. Peitsch, W.K., Hofmann, I., Endlich, N., Pratzel, S., Kuhn, C., Spring, H., Grone, H.J., Kriz, W., and Franke, W.W. (2003). Cell biological and biochemical characterization of drebrin complexes in mesangial cells and podocytes of renal glomeruli. *J Am Soc Nephrol* *14*, 1452-1463.
207. Peitsch, W.K., Grund, C., Kuhn, C., Schnolzer, M., Spring, H., Schmelz, M., and Franke, W.W. (1999). Drebrin is a widespread actin-associating protein enriched at junctional plaques, defining a specific microfilament anchorage system in polar epithelial cells. *Eur J Cell Biol* *78*, 767-778.
208. Peitsch, W.K., Hofmann, I., Pratzel, S., Grund, C., Kuhn, C., Moll, I., Langbein, L., and Franke, W.W. (2001). Drebrin particles: components in the ensemble of proteins regulating actin dynamics of lamellipodia and filopodia. *Eur J Cell Biol* *80*, 567-579.
209. Le Bras, S., Foucault, I., Foussat, A., Brignone, C., Acuto, O., and Deckert, M. (2004). Recruitment of the actin-binding protein HIP-55 to the immunological synapse regulates T cell receptor signaling and endocytosis. *J Biol Chem* *279*, 15550-15560.
210. Cheng, X.T., Hayashi, K., and Shirao, T. (2000). Non-muscle myosin IIB-like immunoreactivity is present at the drebrin-binding cytoskeleton in neurons. *Neurosci Res* *36*, 167-173.
211. Ishikawa, R., Katoh, K., Takahashi, A., Xie, C., Oseki, K., Watanabe, M., Igarashi, M., Nakamura, A., and Kohama, K. (2007). Drebrin attenuates the interaction between actin and myosin-V. *Biochem Biophys Res Commun* *359*, 398-401.
212. Patrussi, L., and Baldari, C.T. (2008). Intracellular mediators of CXCR4-dependent signaling in T cells. *Immunol Lett* *115*, 75-82.
213. Bunnell, S.C., Hong, D.I., Kardon, J.R., Yamazaki, T., McGlade, C.J., Barr, V.A., and Samelson, L.E. (2002). T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J Cell Biol* *158*, 1263-1275.
214. Bunnell, S.C., Singer, A.L., Hong, D.I., Jacque, B.H., Jordan, M.S., Seminario, M.C., Barr, V.A., Koretzky, G.A., and Samelson, L.E. (2006). Persistence of cooperatively stabilized signaling clusters drives T-cell activation. *Mol Cell Biol* *26*, 7155-7166.
215. Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K., Kobayashi, W., Hiroshima, M., Hashimoto-Tane, A., Tokunaga, M., Dustin, M.L., and Saito, T. (2005). Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat Immunol* *6*, 1253-1262.
216. Dustin, M.L., Olszowy, M.W., Holdorf, A.D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., Widder, P., Rosenberger, F., van der Merwe, P.A., Allen, P.M., et al. (1998). A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* *94*, 667-677.
217. Barr, V.A., Balagopalan, L., Barda-Saad, M., Polishchuk, R., Boukari, H., Bunnell, S.C., Bernot, K.M., Toda, Y., Nossal, R., and Samelson, L.E. (2006). T-cell antigen receptor-

induced signaling complexes: internalization via a cholesterol-dependent endocytic pathway. *Traffic* 7, 1143-1162.

218. Ikeda, K., Kaub, P.A., Asada, H., Uyemura, K., Toya, S., and Shirao, T. (1996). Stabilization of adhesion plaques by the expression of drebrin A in fibroblasts. *Brain Res Dev Brain Res* 91, 227-236.
219. Ikeda, K., Shirao, T., Toda, M., Asada, H., Toya, S., and Uyemura, K. (1995). Effect of a neuron-specific actin-binding protein, drebrin A, on cell-substratum adhesion. *Neurosci Lett* 194, 197-200.
220. Han, J., Shui, J.W., Zhang, X., Zheng, B., Han, S., and Tan, T.H. (2005). HIP-55 is important for T-cell proliferation, cytokine production, and immune responses. *Mol Cell Biol* 25, 6869-6878.
221. Boss, V., Talpade, D.J., and Murphy, T.J. (1996). Induction of NFAT-mediated transcription by Gq-coupled receptors in lymphoid and non-lymphoid cells. *J Biol Chem* 271, 10429-10432.
222. Han, J., Kori, R., Shui, J.W., Chen, Y.R., Yao, Z., and Tan, T.H. (2003). The SH3 domain-containing adaptor HIP-55 mediates c-Jun N-terminal kinase activation in T cell receptor signaling. *J Biol Chem* 278, 52195-52202.
223. Gronborg, M., Kristiansen, T.Z., Stensballe, A., Andersen, J.S., Ohara, O., Mann, M., Jensen, O.N., and Pandey, A. (2002). A mass spectrometry-based proteomic approach for identification of serine/threonine-phosphorylated proteins by enrichment with phospho-specific antibodies: identification of a novel protein, Frigg, as a protein kinase A substrate. *Mol Cell Proteomics* 1, 517-527.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

ARTÍCULOS PUBLICADOS QUE FORMAN PARTE DE LA TESIS

- Pérez-Martínez M, Gordón-Alonso M, Cabrero JR, Barrero-Villar M, Rey M, Mittelbrunn M, Lamana A, Morlino G, Calabia C, Yamazaki H, Shirao T, Vázquez J, González-Amaro R, Veiga E, and Sánchez-Madrid F. “F-Actin-Binding Protein Drebrin Regulates CXCR4 Recruitment to the Immune Synapse”. Aceptado en *Journal of Cell Science*.
- Rey M, Valenzuela-Fernández A, Urzainqui A, Yáñez-Mó M, Pérez-Martínez M, Penela P, Mayor F Jr, Sánchez-Madrid F. “Myosin IIA is involved in the endocytosis of CXCR4 induced by SDF-1alpha”. *J Cell Sci*. 2007,120:1126-33.

ARTÍCULOS PUBLICADOS NO INCLUIDOS EN LA TESIS

El trabajo desarrollado Manuel Pérez Martínez en el laboratorio del Dr. Francisco Sánchez Madrid en el Hospital Universitario de la Princesa ha servido para publicar una serie de artículos, fruto de colaboraciones con otros investigadores, que se exponen a continuación:

- Calabia-Linares C, Pérez-Martínez M, Martín-Cófreces NB, Alfonso-Pérez M, Gutierrez-Vazquez C, Mittelbrunn M, Ibiza S, Urbano-Olmos F, Aguado-Ballano C, Sánchez-Sorzano C, Sánchez-Madrid F, and Veiga E. “Clathrin drives actin accumulation at the immunological synapse”. Sometido en *EMBO Journal*.
- Sala-Valdés M, Gordón-Alonso M, Tejera E, Ibañez A, Mittelbrunn M, Pérez-Martínez M, Cabrero JR, Rey M, Ursa A, Gimferrer I, Serra-Pages C, Lozano F, Sánchez-Madrid F, and Yáñez-Mó M. “The PDZ protein Syntenin-1 polarizes Src-mediated Rac activation to induce actin polymerization during T-cell immune interactions and chemotaxis”. Sometido en *Plos Biology*.
- Muñoz P, Mittelbrunn M, de la Fuente H, Pérez-Martínez M, García-Pérez A, Ariza-Veguillas A, Malavasi F, Zubiaur M, Sánchez-Madrid F, Sancho J. “Antigen-induced clustering of surface CD38 and recruitment of intracellular CD38 to the immunological synapse”. *Blood*. 2008, 111:3653-64.
- Vicente-Manzanares M, Rey M, Pérez-Martínez M, Yáñez-Mó M, Sancho D, Cabrero JR, Barreiro O, de la Fuente H, Itoh K, and Sánchez-Madrid F. “The RhoA effector mDia is Induced during T cell activation and regulates actin polymerization and cell migration in T lymphocytes”. *J Immunol*. 2003, 171:1023-34.
- Vicente-Manzanares M, Cabrero JR, Rey M, Pérez-Martínez M, Ursa A, Itoh K, and Sánchez-Madrid F. “A role for the Rho-p 160 Rho coiled-coil kinase axis in the chemokine stromal cell-derived factor1alpha-induced lymphocyte actomyosin and microtubular organization and chemotaxis”. *J Immunol*. 2002, 168:400-10.

ANEXO I

Video S1. Dinámica de relocalización de la drebrina. Video analizado mediante videomicroscopía confocal (imágenes adquiridas cada 30s) estudiando la dinámica de relocalización de la drebrina durante la formación de conjugados entre células T J77 transfectadas transitoriamente con GFP-drebrina (verde), y células Raji (rojo) cargadas con SEE. El tiempo se muestra en segundos.

Video S2. Dinámica de relocalización del receptor CXCR4 y la drebrina. Video analizado mediante microscopía de fluorescencia de deconvolución (imágenes adquiridas cada 5 min 43s) estudiando la dinámica de relocalización de la drebrina y el receptor CXCR4 durante la formación de conjugados entre células T J77 transfectadas transitoriamente con CFP-drebrina y CXCR4-YFP, y células Raji cargadas con SEE. El tiempo en min y s se indica en la parte inferior.

