



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

# CARACTERIZACIÓN DE UNA RUTA FAGOCÍTICA MEDIADA POR EL TCR EN LINFOCITOS T

Tesis Doctoral  
**Nuria Martínez Martín**  
Diciembre, 2010



Tesis doctoral

**Caracterización de una ruta fagocítica mediada por el TCR en linfocitos T**

Esta memoria ha sido presentada por la licenciada **Nuria Martínez Martín** para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Director de la Tesis:

**Dr. Balbino Alarcón Sánchez**

Profesor Investigador del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

Universidad Autónoma de Madrid

VºBº del Director



**Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), bajo la dirección del Dr. Balbino Alarcón Sánchez y financiado con una beca de postgrado para la Formación de Profesorado Universitario (AP2005-1711)**



A mis padres, con cariño de su *investigadora*  
*de medicina*



---

De tres hermanos, el pequeño partió  
por la vereda a descubrir y a fundar.

Y para nunca equivocarse o errar,  
una pupila llevaba arriba  
y la otra en el andar.

Y caminó vereda adentro el que más  
ojo en camino y ojo en lo por venir.

Y cuando vino el tiempo de resumir,  
ya su mirada estaba extraviada  
entre el estar y el ir.

*Fábula de los tres hermanos*

Silvio Rodríguez

---

---

Y sí, seguiremos.

Si dicen perdido, yo digo buscando.

Si dicen no llegas, de puntillas alcanzamos.

Y sí, seguiremos.

Si dicen caíste, yo digo me levanto.

Si dicen dormido, es mejor soñando.

*Seguiremos*

Macaco

---



# Índice



# Índice

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>17</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>21</b>
Abreviaturas.....	22
<b>SUMMARY</b> .....	<b>25</b>
Summary.....	27
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>29</b>
<b>1. Un fugaz vistazo al sistema inmune</b> .....	<b>31</b>
<b>2. Desde la sinapsis inmunológica a los Nanoclusters</b> .....	<b>31</b>
2.1. La Sinapsis Inmunológica y su relevancia funcional .....	31
2.2. Microclusters y señalización proximal .....	33
<b>3. Regulación de la activación del linfocito T por el citoesqueleto de actina</b> .....	<b>34</b>
<b>4. La Superfamilia Ras</b> .....	<b>35</b>
4.1. La familia Ras .....	36
4.2. Familia Rho.....	37
<b>5. Internalización alrededor del TCR: ¿varios procesos, diferentes destinos?</b> .....	<b>39</b>
5.1. ¿Qué o quién controla el equilibrio? .....	39
5.2. Modulación negativa de los niveles totales de TCR en membrana tras la estimulación ..	41
5.3. Internalización del TCR: localización y función .....	43
<b>6. Fagocitosis y trogocitosis: adquisición de material ajeno</b> .....	<b>45</b>
6.1. Fagocitosis por células profesionales .....	45
6.2. Trogocitosis: expansión del proteoma celular .....	49
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>55</b>
Objetivos .....	57
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>59</b>
<b>1. Materiales</b> .....	<b>61</b>
1.1. Líneas celulares.....	61
1.2. Ratones .....	61
1.3. Reactivos y soluciones.....	62
1.4. Anticuerpos y sondas fluorescentes .....	65
1.5. Vectores .....	67
<b>2. Métodos</b> .....	<b>68</b>
2.1. Obtención de células primarias .....	68
2.2. Transfección de células .....	69

2.3. Transducción de células T vírgenes .....	71
2.4. Microscopia óptica y confocal.....	72
2.5. Tinción de células para citometría.....	75
2.6. Experimentos funcionales .....	76
2.7. Ensayo de downmodulación del TCR en células T .....	79
2.8. Ensayo de Pull-down .....	79
2.9. Microscopia Electrónica.....	81
2.10. Unión de anticuerpo a bolas de látex (1, 3 y 6 $\mu\text{m}$ ) .....	81
2.11. Ensayos cuantitativos de fagocitosis (citometría de flujo) .....	82
2.12. Ensayos de Trogocitosis.....	84
2.13. Ensayo de presentación por parte de las células T .....	85
2.14. Análisis estadísticos .....	87

## **RESULTADOS.....89**

### **1. El TCR es internalizado desde la sinapsis por un proceso dependiente de TC21 y RhoG.**

#### **..... 91**

1.1. El TCR se internaliza desde la sinapsis por un proceso TC21 dependiente .....	93
1.2. EL proceso de internalización del TCR mediado por TC21 es un proceso de internalización independiente de clatrina pero dependiente de RhoG .....	96
1.3. La ausencia de TC21 o RhoG en células primarias, bloquea la internalización del TCR desde la SI. ....	102

### **2. La modulación negativa del TCR es defectuosa en células carentes de TC21 (RRas2 -/-) y RhoG (RhoG -/-) .....**

#### **104**

### **3. Las células T fagocitan a través del TCR por un proceso dependiente de TC21 y RhoG.**

#### **..... 106**

3.1. Las células T fagocitan partículas a través del TCR. ....	107
3.2. El proceso fagocítico mediado por el TCR presenta características de una fagocitosis clásica. ....	110
3.3. La fagocitosis iniciada por el TCR requiere de la correcta actividad de TC21 y RhoG... ..	114

### **4. La ausencia de TC21 y RhoG se traduce en un sostenimiento de las señales tempranas .....**

#### **117**

### **5. RhoG se activa tras la estimulación del TCR por un mecanismo dependiente de TC21 y PI3K.....**

#### **121**

### **6. TC21 y RhoG median el proceso conocido como Trogocitosis .....**

#### **124**

6.1. La adquisición de fragmentos de membrana de la CPA está mediado por TC21 y RhoG .....	124
6.2. El proceso de trogocitosis requiere la correcta polimerización de actina y la actividad de PI3K.....	126

6.3. En el proceso de trogocitosis/fagocitosis, TC21 y RhoG también median la adquisición y reexpresión de CPH-II .....	126
<b>7. Células T como células presentadoras .....</b>	<b>129</b>
7.1. La capacidad de presentación del antígeno por parte de la célula T está dificultado en ausencia de TC21 y RhoG.....	129
7.2. La capacidad presentadora de las células T .....	131
7.3. La trogocitosis como factor limitante de la expansión clonal.....	131
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>135</b>
<b>1. Fagocitosis en células T: La forma y los modos .....</b>	<b>137</b>
1.1. De la Sinapsis inmunológica al “Trogosoma” .....	137
1.2. Ruta trogocítica: TCR-TC21-RhoG .....	141
<b>2. Modulación negativa del TCR: dependiente de clatrina vs trogocitosis (clatrina independiente) .....</b>	<b>143</b>
<b>3. Destino y función del material trogocitado .....</b>	<b>145</b>
3.1. Del “trogosoma” a los cuerpos multivesiculares.....	146
3.2. Función del cSMAC: degradación y reutilización mediados por el trogosoma .....	146
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>153</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>155</b>
A) Las células T presentan una capacidad fagocítica remanente, mostrada por la utilización de bolas de látex recubiertas de anticuerpo específico para el TCR.....	155
B) TC21 y RhoG controlan la internalización de los TCR contactados desde la SI. ....	155
C) TC21 y RhoG controlan el proceso trogocítico.....	155
D) Función de la formación de la SI.....	155
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>157</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>158</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>191</b>
<b>Anexo 1. Videomicroscopía .....</b>	<b>193</b>
<b>Anexo 2. Artículos.....</b>	<b>195</b>



# **Agradecimientos**

## Agradecimientos

Ahora que el principio de todo es un Enero lejano, ahora que ya soy lo que quería ser de mayor, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que, desde la cercanía o lejanía, han hecho esto posible.

Gracias a Balbino Alarcón, por un día coger el teléfono y llamar para darme una oportunidad. Por enseñarme a ser persistente y mirar más allá de lo obvio, por mostrarme a no quedarme con lo fácil y soñar con lo que vendrá después, con la siguiente pregunta y la siguiente respuesta. Bal, gracias por conseguir que siempre me considere una Balbina.

Gracias a Juan V. Esplugues, quien me abrió la puerta de este mundo científico, enseñándome que si algo fuese fácil ya lo habría hecho alguien.

Gracias a Ana, Irene y Paco por entender que no mirase atrás cuando dejé Valencia, por apoyarme en mi decisión y por estar ahí en ese invierno duro recién llegada a Madrid, con sus llamadas que me hacían ver que realmente lo que me importaba no lo había perdido.

Gracias a la gente del laboratorio, a mi pequeña familia, a los que forman parte de las 3 U, a los que han sufrido toda esta etapa sin quejarse ni un momento y que han hecho este camino mucho más fácil. Gracias a las super técnicas Tania y Valentina, porque lo que a vosotras os parece una tontería para mi es una gran ayuda y porque sin vuestro trabajo esta tesis sería la mitad. A Cristina, por no lanzarme los ratones a la cabeza e intentar siempre hacerme las cosas lo más fáciles posibles, demostrando

una alta dosis de paciencia. A Hisse, por sus sabías palabras y su humor holandés, a Raquel, por su tranquilidad y por sus palabras justas en los momentos indicados. A Alicia y Pilar M, por vuestra ilusión y risas. A Enrique, por su ayuda imprescindible en muchos momentos. A Maria... ay Maria... no cambies nunca, gracias por ser capaz de arrancarnos una sonrisa a todos en cualquier momento y hacer el día mucho más alegre.

Gracias a Elena, por ser como eres, un terremoto exponencial, por dar el brazo entero cuando solo te pido la mano, por estar ahí siempre, por los momentos en busca del Epsilon perdido y de las bolas comidas.. gracias por tu ayuda Elenita.

Aldo, gracias por ser mucho más que mi compañero de U, por convertirte en imprescindible en mi día a día, por hacer esta aventura increíble, porque conocerte y poder compartir tantos momentos contigo es una de las mejores cosas que me llevaré de Madrid. Gracias a José, por convertirte también en parte de mi familia, por tus besos y tus bromas.

Irenita... gracias por ser como eres, gracias por ser mi gigante cuando llegué a Madrid y subirme a tus hombros, gracias por preocuparte siempre por mi, y gracias por seguir soñando conmigo que algún día, el típico que salgamos pronto, haremos mil planes. Gracias porque se que siempre vas a estar ahí, y aunque suene egoísta, lo necesito.

Gracias a todas los exBalbinos, Pilar, Richard, Juanjo, Rashmi e Irene Z, por todo lo

que me habéis enseñado.

Gracias a los adoptados: a Alex por intentar sacarnos del laboratorio con actividades extraescolares y a Nadia por su ayuda (sister, gracias por implicarte y por preocuparte por mi, espero algún día poder devolverte todo lo que has hecho por mi).

Gracias a Esther, por convertirse en una de las pocas personas que me pone en mi sitio, por decirme las cosas claras cuando más lo necesito.

Gracias a mi Pavita favorita, Mireia, esto no habría sido lo mismo sin ti, desde el principio hace tantos años, riendo y llorando a la vez en una biblioteca, hasta ahora, con una boda exprés. Gracias por estar ahí siempre, por aparecerte detrás de las puertas cuando más lo necesito, gracias por los momentos pasados y por los planes futuros. Sergio, mi Mexican favorito, gracias por dejarlo todo y venir a Valencia, por tu tiempo invertido en esta tesis y por traernos un pedacito de México, que convierte vuestra casa en un agujero negro del cual nunca queremos salir.

Gracias a mi hermana, por convertirse en la hermana mayor que necesito tantas veces, quien sin darse cuenta me da los consejos y ánimos que necesito en cada momento. Gracias por enseñarme que las cosas las hacemos complicadas nosotros mismos, y que son mucho más fáciles de lo que parece. A mi hermano, por su risa y sus abrazos de oso, por no perder esa inocencia que tanto me gusta y me hace reír. Por crecer sin alejarse y seguir siendo ese enano cariñoso al que tanto quiero.

Gracias a mi Madre, por mandarme todos los besos que necesito por teléfono, por hacerme sentir que siempre esta ahí, feliz cuando las

cosas me salen bien y preocupada cuando no, dispuesta a coger el tren para pipetear ella si es necesario. Por hacer el esfuerzo de entender esta vida que llevo, y recordarme que si no se puede con todo, no significa ser peor.

Gracias a mi padre, por estar ahí, observando desde la esquina cada paso que doy y por preocuparse que lo doy bien. Gracias por tus palabras en los momentos más necesitados, por tus emails y por tu motivación enviada urgente.

Gracias a los dos, por enseñarme en esta vida, que lo importante es luchar por tus sueños.

Recordar a mi abuela Eugenia y a mi iaio Eladio, porque vuestra ausencia siempre ha sido un motivo para seguir buscando respuestas.

Gracias a mi otra familia, a Luz por sus cariños y por su piano, por mostrarme aquello que quiero recuperar cuando el tiempo me lo permita, a Juan, por sus abrazos y consejos. A Elena, Naira y Javi por su apoyo incondicional.

Guapetón... no se como agradecerte todo lo que has hecho. Esta tesis está acabada no solo por tu tiempo invertido (que ha sido mucho), sino porque un día dejaste el mar y convertiste esta experiencia Madrileña en algo maravilloso. Gracias por luchar siempre por nosotros y por hacerme sentir afortunada. Unas campanadas a las siete, un botánico, una carrera, una tesis... mil sensaciones pasadas maravillosas que espero que sean solo el principio de mil aventuras futuras. Porque... "cómo pasa el tiempo que de pronto son años"... pero pasarlos contigo es lo mejor que me ha pasado. Te quiero guapetón.



# **Abreviaturas**

## Abreviaturas

<b>AC</b>	Anticuerpo	<b>FcR</b>	Receptor para el fragmento Fc de inmunoglobulinas
<b>Ack</b>	Tampón de lisis de eritrocitos	<b>FITC</b>	Isocianato de fluoresceína
<b>BCR</b>	Receptor para el antígeno en células B	<b>Gads</b>	Adaptador de la familia Grb2
<b>BSA</b>	Albúmina de suero Bovino	<b>GAP</b>	Molécula potenciadora de la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas G
<b>CC</b>	Campo claro	<b>GDI</b>	Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina
<b>CCII</b>	Compartimentos de CPH-II	<b>GDP</b>	Guanosín-Difosfato
<b>CD</b>	Antígeno de diferenciación	<b>GEF</b>	Factor Intercambiador de nucleótidos de Guanina
<b>CD3<sup>a</sup></b>	Región del cSMAC con altos niveles de TCR	<b>GEM</b>	Dominios de membrana ricos en esfingolípidos
<b>CD3<sup>b</sup></b>	Región del cSMAC con bajos niveles de TCR, pero alta concentración de CD28	<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>CD4-CPA</b>	Célula T CD4 con funciones de célula presentadora de antígeno	<b>GM-1</b>	Monosialotetrahexosilgangliosido
<b>CD8-CPA</b>	Célula T CD8 con funciones de célula presentadora de antígeno	<b>GM-CSF</b>	Factor de estimulación de colonias de macrófagos-granulocíticos
<b>CFP</b>	Proteína azul fluorescente	<b>Grb2</b>	Proteína 2 de unión al receptor de factores de crecimiento
<b>CFSE</b>	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>	<b>GST</b>	Glutathion S-transferasa
<b>Cit D</b>	Citocalasina D	<b>GTP</b>	Guanosín-Trifosfato
<b>CLAT</b>	Clatrina	<b>GTPasa</b>	Proteína con capacidad intrínseca de catalizar la hidrólisis de GTP
<b>CM</b>	Células de memoria	<b>HBSS</b>	Solución salina balanceada de Hank
<b>CMV</b>	Cuerpos Multivesiculares	<b>HEPES</b>	Ácido N'-2-Etansulfónico N-2-hidroxiethylpiperacina
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígeno	<b>HLA-G</b>	Antígeno G de los leucocitos humanos
<b>CPH</b>	Complejo Principal de Histocompatibilidad	<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante
<b>cSMAC</b>	Complejo supramolecular de activación central	<b>HRS</b>	Sustrato de tirosina quinasa regulada por factor de crecimiento hepático. (" <i>hepatocyte growth factor receptor substrate</i> ")
<b>CTL</b>	Células citotóxicas	<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intercelular
<b>DAG</b>	Diacilglicerol	<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>Dbl</b>	Proteína de linfoma difuso de células B	<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>DC</b>	Células dendríticas	<b>IL-2</b>	Interleuquina-2
<b>DH</b>	Dominio de homología a Dbl	<b>IMF</b>	Intensidad Media de Fluorescencia
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco	<b>IOAA</b>	Yodoacetamida
<b>dSMAC</b>	Complejo supramolecular de activación distal	<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol trifosfato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol	<b>ITAM</b>	Motivo de activación basado en tirosinas del inmunorreceptor
<b>ECL</b>	Sistema de revelado	<b>Itk</b>	Quinasa de células T inducible por IL-2
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético	<b>JNK</b>	Quinasa N-terminal de c-Jun
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epitelial	<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señal extracelular	<b>KO</b>	Ratón deficiente en (" <i>Knock-out</i> ")
<b>ERM</b>	Ezrina, radixina y moesina	<b>LAMP</b>	Proteína de membrana lisosomal
<b>ESCRT</b>	Complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (" <i>endosomal sorting complex required for transport</i> ")	<b>LAT</b>	Proteína de unión para la activación de células T
<b>F-actina</b>	Actina filamentosa		
<b>FBS</b>	Suero Fetal Bovino		
<b>FcγR</b>	Receptor para el fragmento Fc de inmunoglobulinas IgG		

<b>LBPA</b>	ácido liso-bisfosfatídico	<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>Lck</b>	Quinasa específica de linfocitos	<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>LFA-1</b>	Antígeno asociado a la función linfocitaria-1	<b>Psk</b>	Proteína serina treonina quinasa
<b>LT</b>	Lisado total	<b>pSMAC</b>	Complejo supramolecular de activación peritérico
<b>LY</b>	LY294002	<b>PTK</b>	Proteína tirosina Quinasa
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos	<b>PV</b>	Pervanadato
<b>MC</b>	Oligómeros	<b>PX</b>	Dominio homólogo Phox
<b>MCC</b>	Péptido procedente del citocromo c de la palomilla de la luz (péptido 88-103).	<b>Raf-RBD</b>	Dominio de unión a Ras de Raf
<b>MEK</b>	Quinasa de MAPK/ERK	<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>MICA/MICB</b>	Cadena A/B relacionada al CPH-I	<b>Rho</b>	Proteína homóloga a Ras
<b>Min</b>	Minutos	<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>MTOC</b>	Centro de organización de microtúbulos	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>Na</b>	Apertura numérica	<b>RPMI</b>	Medio de <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>Nck</b>	Región no catalítica de tirosina-quinasas	<b>RRas</b>	Proteína relacionada con Ras ( <i>Ras related protein</i> )
<b>NF-κB</b>	Factor Nuclear κB	<b>s</b>	segundos
<b>NFAT</b>	Factor Nuclear de células T activadas	<b>SDS-page</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
<b>NK</b>	“Asesina natural” ( <i>Natural Killer</i> )	<b>SEE</b>	Enterotoxina de <i>Staphylococcus</i> , E
<b>OVAp</b>	Péptido correspondiente a los residuos aminoácidos 257-264 (SIINFEKL) de la proteína del huevo de pollo ovoalbúmina.	<b>SH2</b>	Dominio de homología a Src 2
<b>P24</b>	Placa de cultivo de 24 pocillos (16mm)	<b>SH3</b>	Dominio de homología a Src 3
<b>P6</b>	Placa de cultivo de 6 pocillos (35mm)	<b>SI</b>	Sinapsis Inmunológica
<b>P96</b>	Placa de cultivo de 96 pocillos (8mm)	<b>SLP76</b>	Proteína de leucocitos que contiene dominios SH2 de 76 KDa
<b>PBL</b>	Linfocitos de sangre periférica	<b>SOS</b>	<i>Son of Sevenless</i> , factor de intercambio de nucleótidos de Ras
<b>PBS</b>	Solución salina tamponada de fosfato	<b>T</b>	Célula T
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina	<b>TBS-Tween</b>	Salino tamponado con Tris-Tween
<b>Pd</b>	Pull Down. Ensayo de interacción proteína-proteína.	<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina	<b>Tf</b>	Transferrina
<b>PE</b>	Ficoeritrina	<b>Tfr</b>	Receptor de transferrina
<b>PFA</b>	Paraformaldehído	<b>Th</b>	Célula T cooperadora
<b>PH</b>	Dominio de pleckstrina	<b>TRAP</b>	Protocolo de análisis de trogocitosis
<b>PI</b>	Fosfoinositoles	<b>TSG101</b>	Gen de susceptibilidad tumoral 101 (“ <i>Tumor Susceptibility Gene</i> ”)
<b>PI(3,4)P<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol (3,4) bifosfato	<b>VCAM-1</b>	Molécula de adhesión de célula vascular-1
<b>PI(3,4,5)P<sub>3</sub></b>	Fosfatilinositol (3,4,5) trifosfato	<b>WASP</b>	Proteína del síndrome Wiskott-Aldrich
<b>PI(4, 5)P<sub>2</sub></b>	Fosfatidilinositol (4,5) bifosfato	<b>WAVE</b>	<i>WASP family verprolin-homologous protein</i>
<b>PI3K</b>	Enzima fosfatidilinositol 3 quinasa	<b>WB</b>	Western Blot
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C	<b>Wort</b>	Wortmanina
<b>PLA</b>	Fosfolipasa A	<b>WT</b>	Forma salvaje de una proteína (“ <i>wild type</i> ”)
<b>PLC<sub>γ</sub></b>	Fosfolipasa C gamma	<b>Zap70</b>	Proteína asociada a la cadena ζ de 70 KDa
<b>PLD</b>	Fosfolipasa D		
<b>PMA</b>	Forbol-12-miristato-13-acetato		



# Summary



## Summary

The immunological synapse (IS) was first described as a highly specialized junction between the membranes of T cells and antigen-presenting cells. The IS was proposed to be a site for effective T cell activation, for sustained T cell receptor (TCR) engagement and signaling, and for polarized secretion into the synaptic space. However, several studies have proposed that the IS is a site for TCR endocytosis, resulting in termination of its signalling and degradation.

In resting T cells, the TCR is continuously endocytosed and re-expressed at the cell surface. However, engagement with peptide-MHC (pMHC) causes increased TCR internalization, decreased recycling and increased degradation. Clathrin-dependent endocytosis is one of the mechanisms by which the TCR is internalized, both in untriggered and TCR triggered cells. However, the TCR is also internalized by clathrin-independent mechanisms that share a common cholesterol dependency but are not yet molecularly characterized.

Another consequence of IS formation is the intercellular transfer of APC membrane proteins to the T cell. T cells acquire major histocompatibility complex (MHC) class I and class II from APCs, as well as co-stimulatory molecules and patches of membrane, by a mechanism most commonly referred to as trogocytosis. MHC transfer to the T cell is dependent on TCR triggering. The consequences and physiological meaning of such transfer are not completely understood. T cells that acquire pMHC from APCs can themselves become antigen-presenting cells, but it is still unclear what advantage such a T cell APC could offer in comparison with “professional” APCs.

TC21 (RRas2), a small GTPase, activates phosphoinositide 3 kinase (PI3K), probably through the direct binding and recruitment of the hematopoietic specific catalytic subunit p110 $\delta$ . Indeed, TC21 binds directly to the TCR and BCR (B cell antigen receptor) and it is necessary for the recruitment of p110 $\delta$  to both antigen receptors in resting cells. TC21 is constitutively associated to the TCR and BCR and it has been shown to co-translocate with the TCR to the IS.

In this study, we have further investigated the role of TC21 in the formation of the IS. We found that TC21 is necessary for TCR internalization from the IS by a clathrin-independent mechanism that is nevertheless dependent on the small GTPase RhoG, previously associated with phagocytosis. Indeed, we found that T cells phagocytose 1-6  $\mu$ m beads coated with anti-TCR antibodies through a TC21 and RhoG-dependent pathway, in which PI3K and actin play an important role. Since TC21-deficient and RhoG-deficient T cells are unable to trogocytose MHC class II and membrane fragments from the APC, we propose that the TCR is internalized from the IS by phagocytosis (clathrin independent process) allowing acquisition of material (eg. pMHC) from the APC. Through this process, the T cell is converted into an efficient APC.



# **Introducción**



## 1. Un fugaz vistazo al sistema inmune

La defensa contra agentes infecciosos se da a través de una primera respuesta inmune innata y una respuesta posterior adaptativa en la que los linfocitos juegan un papel esencial y en la que este trabajo se va a centrar.

Las fases de activación y efectoras de la respuesta inmune adaptativa se basan en el reconocimiento del antígeno por parte del linfocito T. Para ello el linfocito T presenta en su membrana el receptor de los linfocitos T (TCR), capaz de reconocer fragmentos peptídicos de antígenos que le son presentados por células

presentadoras de antígeno (CPA) a través de los complejos principales de histocompatibilidad (CPH), formando un complejo péptido-CPH. La interacción estable entre la célula T y la CPA conlleva la formación de la Sinapsis Inmunológica (SI), estructura a través de la cual la célula integra señales procedentes de la CPA. La investigación realizada en esta tesis se centra en el momento de la interacción de la célula T con el complejo péptido-CPH a través de la formación de la SI.

## 2. Desde la sinapsis inmunológica a los Nanoclusters

La interacción estrecha entre la célula T y la CPA, y la formación de la SI, le otorga a la célula T la capacidad de integrar toda la información necesaria para diferenciar lo ajeno de lo propio.

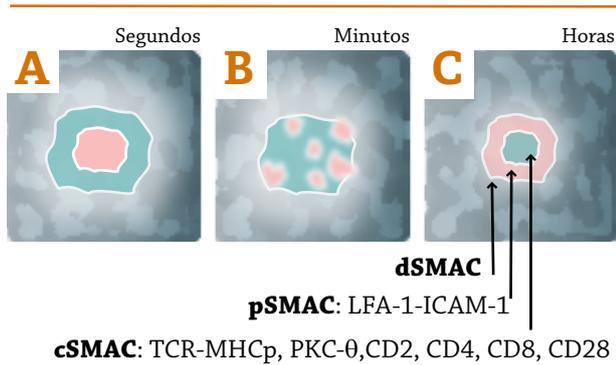
### 2.1. La Sinapsis Inmunológica y su relevancia funcional

Aprovechando los últimos avances en microscopía y pese a que todas las técnicas establecidas muestran sus limitaciones (Wulfing et al., 2002), el conjunto de todas ellas ha permitido dibujar, con bastante precisión, el proceso de contacto y activación de la célula T.

Tras el contacto entre la CPA y la célula T, se crea una estructura conocida como “ojo de toro” (Fig. I1) en la que se diferencia una zona central, rica en integrinas, rodeada por una zona de TCR contactados por complejos pép-

tido-CPH (SI inmadura). A los pocos minutos, esta estructura se invierte dando lugar a una SI madura, que presenta dominios específicos denominados complejos supramoleculares de activación (SMAC) (Monks et al., 1998), así tenemos un complejo central (cSMAC) compuesto mayoritariamente por TCR-CPH, y un anillo concéntrico que lo rodea conocido como complejo periférico (pSMAC), rico en moléculas de adhesión (LFA-1 y su ligando ICAM-1). También existe una zona aún más externa conocida como la zona distal (dSMAC) rica en CD43 y CD45. Se sugiere que esta zona corresponde al área donde se acumulan proteínas transmembrana y del citoesqueleto que son activamente desplazadas de la zona de contacto.

Para alcanzar la SI madura se requiere una reorganización de los diferentes receptores presentes en la interfase entre ambos tipos ce-



**Fig. 1** **Formación de la Sinapsis inmunológica**

Esquema basado en las imágenes captadas por microscopía durante la interacción de una célula T con complejos péptido-CPH agonistas (Grakoui et al., 1999).

- A** En segundos, la célula T se une al sustrato a través de una zona de unión central del par de interacción LFA-1/ICAM-1, rodeado de una zona rica de TCR señalizador contactando con el sustrato en la periferia.
- B** Tras unos minutos, los TCR contactados son translocados al centro de la interfase.
- C** Finalmente, aparece un patrón con un agregado central de TCR rodeado de un anillo concéntrico de LFA-1. Esta estructura es estable durante horas. Se indican diferentes moléculas localizadas en los diferentes dominios.

Adaptado a partir de Dustin, 2002.

lulares, que ha sido clásicamente explicada por la propia difusión de los receptores. Sin embargo, la formación de la SI requiere un proceso activo y el consumo de energía (Wulfing et al., 2001). Así, se ha descrito el movimiento de las diferentes moléculas gracias al anclaje o participación del citoesqueleto de actina y de motores moleculares. Es importante mencionar que el tamaño de los receptores, y la tendencia de estos a agregarse en los mismos dominios en función de su tamaño, controla la localización de los pares TCR-CPH en el centro (distancia de 15 nm) y de LFA-ICAM-1 (distancia 40 nm) en la periferia.

La función de la SI está aún en estudio. Inicialmente se propuso que la función esencial de la SI debía ser la correcta activación de la célula bajo condiciones fisiológicas. De hecho, la activación efectiva de la célula T requiere

del mantenimiento de la estructura durante varias horas, lo que supone en último término la transcripción de genes implicados en secreción de citoquinas, proliferación y diferenciación: procesos esenciales para el desarrollo de la respuesta inmune. La SI como lugar de señalización sostenida se correlacionaba con estudios que mostraban una alta concentración de moléculas implicadas en la señalización a través del TCR: Complejos TCR-CPH (Irvine et al., 2002; Krogsgaard et al., 2005), la tirosina quinasa Lck (Ehrlich et al., 2002; Monks et al., 1998), y productos de la enzima fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) (Costello et al., 2002) entre otros.

Posteriormente, la SI como requerimiento para la señalización perdió fuerza. Se vio que la señalización tenía lugar por ejemplo frente a una CPA fijada e incapaz de permitir la compartimentalización de los dominios que la SI madura requiere (Allen and Unanue, 1984). Además, la existencia de señalización en la zona de contacto inicial de la célula T con la CPA (flujo de calcio) (Negulescu et al., 1996), unido a que el tiempo requerido para la maduración de la SI era mayor que para la activación de la célula (Lee et al., 2002), llevó a pensar que la activación de la célula T no estaba controlada por la reorganización de la SI (Balamuth et al., 2001; Brossard et al., 2005; Dustin et al., 2006; Hailman et al., 2002). Esta idea se vio apoyada por la existencia de sinapsis multifocales, en las que no ocurría la acumulación de TCR en el cSMAC.

La evolución de la microscopía y el uso de bicapas lipídicas para la activación de las células ha permitido describir los microagregados de TCR o "Microclusters" (MC), en los que los

TCR son contactados en la periferia y transportados hacia el centro del punto de contacto, generando el cSMAC. La señalización a través del TCR ocurre en los MC periféricos, donde se ha visto la movilización de calcio y la presencia de moléculas señalizadoras como Zap70 tras el contacto (Bunnell et al., 2002; Campi et al., 2005; Grakoui et al., 1999; Krummel et al., 2000). La formación de los MC en la periferia se considera el inicio de la señalización a los pocos segundos. Un punto clave del descubrimiento de los MC, fue la descripción de que los TCR que llegaban al cSMAC estaban defosforilados, y que la señalización temprana a través del TCR, parece acabar antes de la formación de la SI madura o centralizada.

En base a lo dicho, se ha postulado la idea de la SI como lugar de degradación de la señal y con ello del TCR, al permitir la agregación de los MC en el cSMAC. De esta manera, se puede explicar la cinética de distribución de la fosfatasa CD45, excluida en los MC presentes en la periferia, pero relocalizadas en el cSMAC, mostrando su posible implicación en la finalización de la señalización (Vardhana et al., 2010; Varma et al., 2006). Sin embargo, la función de la SI parece no restringirse simplemente a la activación o a la degradación de la señal (“blanco o negro”), ya que diferentes trabajos (Cemerski et al., 2008; Lee et al., 2003) han evidenciado la complejidad funcional de la SI, al controlar la señalización según el tipo de ligando, adquiriendo una función degradativa y de terminación ante una señal fuerte, pero aumentando la señal si la estimulación con el ligando es débil.

Además de las funciones recién descritas, se le ha atribuido a la SI un papel en el control

de la polarización celular, fenómeno importante para la secreción localizada de citoquinas o gránulos líticos, mediado en parte por la relocalización del organizador de microtúbulos (MTOC) en la zona próxima a la SI. Además la polarización del MTOC permite el transporte dirigido de moléculas intracelulares a la zona de la SI (Das et al., 2004). Finalmente, la polarización celular, se está relacionando con la generación de una división celular asimétrica, en la que las células hijas se diferenciarían en células efectoras o células de memoria dependiendo de la proximidad a la SI (Chang et al., 2007).

## 2.2. Microclusters y señalización proximal

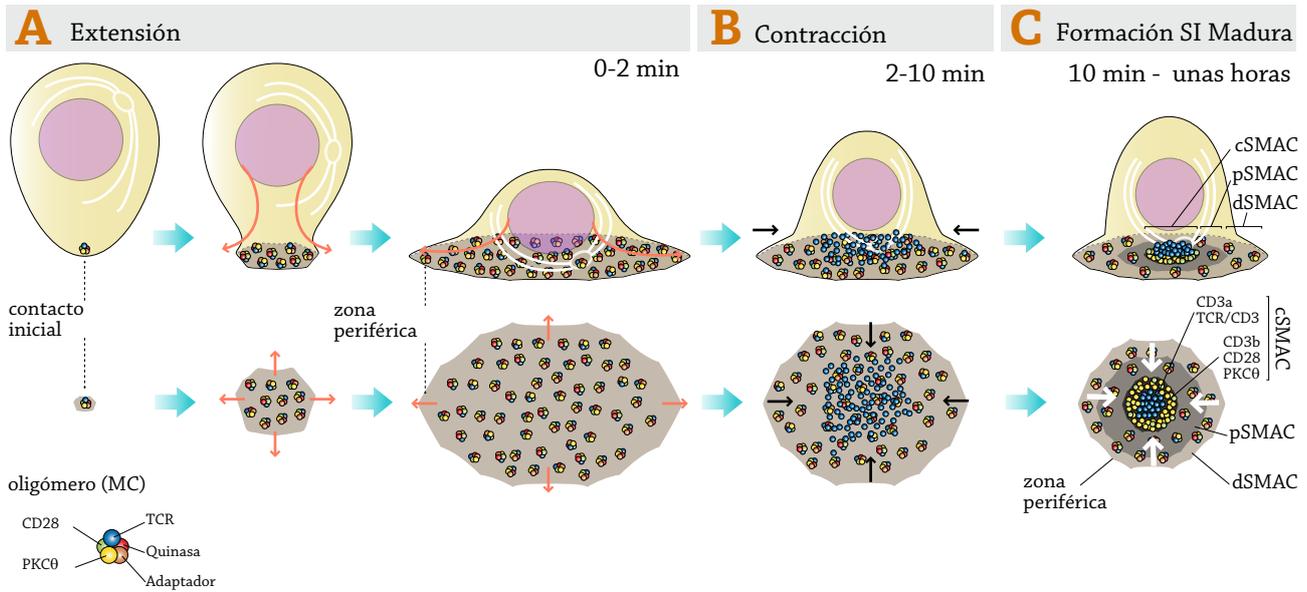
Los MC son considerados como la unidad mínima de señalización en la célula T, y pese a que parece que cada MC solo funciona alrededor de 2 min, su continua formación en el dSMAC, de manera actina dependiente (Tskvitaria-Fuller et al., 2003; Wülfing and Davis, 1998; Wulfing et al., 1998), es requerida para la señalización sostenida en la célula T (Varma et al., 2006) (Fig. I2).

Los MC migran desde la periferia (dSMAC) hacia el centro de la interfase a una velocidad de 1-5  $\mu$ m/min. Allí forman grandes acúmulos, que se inmovilizan a los 5-15 min dando lugar al cSMAC. El transporte de los componentes de la SI de manera radial, es un mecanismo de regulación de la señalización. Así aquellas sinapsis bloqueadas, donde los MC han sido mecánicamente constreñidos en la periferia, dan lugar a una mayor señalización (Mossman et al., 2005).

Antes de iniciarse el contacto, el TCR

está organizado en oligómeros que se conocen como nanoclusters (NC), que pueden constituir la estructura de señalización inicial, previa a la formación de los MC (Schamel et al., 2005). Su presencia en estado basal de la célula, es inde-

pendiente de la presentación del antígeno. La existencia de estas estructuras podría aumentar la avidéz del TCR (Alarcon et al., 2006). La unión del ligando debe convertir a estos NC preexistentes en MC.



**Fig. I2**

### Proceso dinámico del reconocimiento del antígeno y activación de la célula T por los MC

La célula T reconoce el antígeno y cambia su forma pasando por un proceso de expansión, contracción y formación de la SI.

- A** Tras el contacto se forman MC conteniendo diferentes moléculas como TCR y CD28. La expansión continua y a su vez la formación de nuevos MC en la zona periférica. Los MC iniciales "TCR-CD28" reclutan diferentes quinasas y adaptadores pertenecientes a la señalización proximal de la célula T, dando lugar a la activación temprana de la célula T.
- B** Tras alcanzar la expansión máxima la célula empieza a contraerse, los MC empiezan a migrar y a fusionarse unos con otros formando grandes agregados. Los adaptadores y las quinasas correspondientes son internalizados y disociados en este momento.
- C** Diez minutos después los MC están concentrados en el centro de la interfase creando el cSMAC, la cual está compartimentalizada en dos dominios concéntricos, CD3<sup>a</sup> y CD3<sup>b</sup>, ricos en TCR y CD28 respectivamente. En la región CD3<sup>b</sup>, también se encuentra localizado PKCθ, implicando a esta región en la señalización sostenida de la célula T. Durante todo el tiempo, nuevos MC "TCR-CD28" se forman en la región periférica, migrando hacia el centro de la interfase permitiendo el mantenimiento de la estructura de la SI y de la señalización (Yokosuka and Saito, 2010).

## 3. Regulación de la activación del linfocito T por el citoesqueleto de actina

Para iniciar y mantener la activación de las células T se requieren diversos procesos celulares dependientes del citoesqueleto en mayor o menor grado, tales como la adhesión mediada por integrinas, la formación de la SI, el establecimiento de la polaridad celular y la

señalización celular, (Billadeau et al., 2007; Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid, 2004). Concretamente, el mecanismo que controla la reorganización del citoesqueleto es esencial para la correcta función de la célula T ya que permite la redistribución de los recep-

tores celulares y el ensamblaje de los MC, y por tanto para la formación de la SI.

Tras la activación del TCR la célula T se expande y forma una estructura lamelar sobre la CPA que permite la formación de la SI, y en particular, la formación de los MC y su migración al centro de la interfase (Fig. I3).

Tras el contacto inicial del TCR, la polimerización de actina se aceleraría en la zona periférica del perímetro lamelipodial de la SI. Esto supone la extensión del citoesqueleto en la zona periférica y está asociado a la despolimerización de los filamentos en la zona central, lo que causa un flujo centrípeto hacia el centro de la interfase, que usan los MC para su transporte (Dobereiner et al., 2006; Fisher

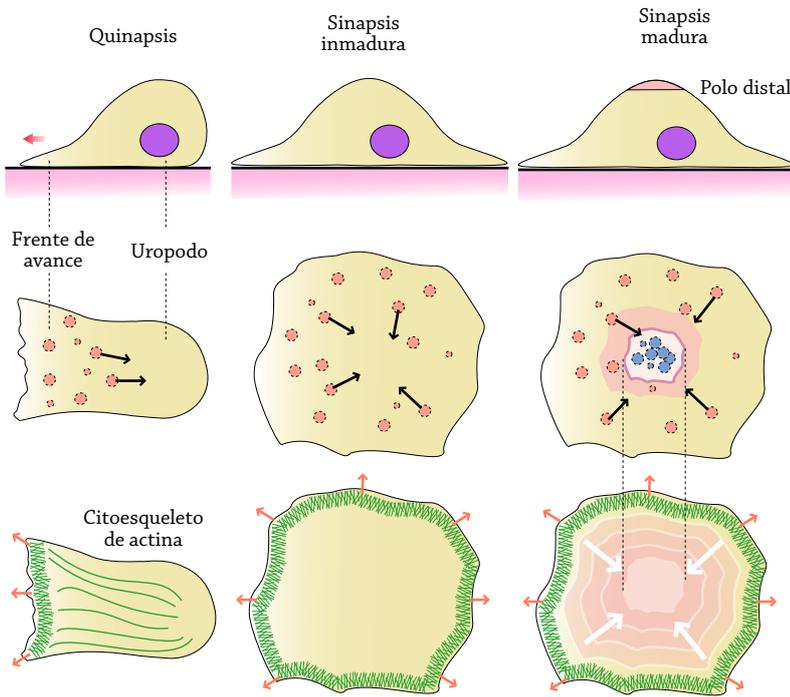
et al., 1988), además este flujo parece ser también el responsable de la segregación de LFA-1 (Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid, 2004). La velocidad del transporte es menor que el esperado para el flujo de polimerización de actina, por lo que o bien la asociación del complejo al citoesqueleto es parcial o bien estos agregados encuentran barreras que limitan su movimiento (DeMond et al., 2008). En todo caso, tanto la señalización de los MC como el citoesqueleto de actina acaban en el cSMAC, que está totalmente desprovisto de actina. Esta característica parece importante para fenómenos de exocitosis y endocitosis (Stinchcombe et al., 2006).

## 4. La Superfamilia Ras

La superfamilia Ras en mamíferos está constituida por un total de 150 GTPasas Ras, conocidas como proteínas G pequeñas o monoméricas. La superfamilia Ras se divide en cinco grandes familias: Ras, Rho, Rab, Ran y Arf. Como presentan una actividad GTP hidrolasa intrínseca, actúan como interruptores moleculares en múltiples rutas de transducción de señales que controlan procesos como la división celular, apoptosis, adhesión célula-célula, migración, etc. y cuya desregulación ocasiona graves patologías (Barbacid, 1987). En relación a su actividad, existen factores Intercambiadores de nucleótidos de Guanina (GEF) que promueven el intercambio de GDP por GTP (Quilliam et al., 2002), moléculas potenciadoras de la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas

G (GAP) que estimulan la actividad hidrolasa de las GTPasas (Takai et al., 2001), y en el caso de Rab y Rho, existe un nivel de regulación extra llevado a cabo por los inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI), que previenen la activación de las GTPasas bloqueando su interacción con las GEF y con las proteínas efectoras.

Las GTPasas monoméricas presentan una cola lipídica que determina su unión a membrana, requerida para su correcta actividad. La localización en membrana no es sin embargo suficiente para determinar el comportamiento exacto de la proteína. Se necesitan interacciones de tipo lípido-proteína y proteína-proteína para mantener a la proteína monomérica en su correcto compartimento subcelular donde lle-



**Fig. I3** Citoesqueleto de actina en la formación de la SI

La célula T durante su fase de quinapsis (migración) muestra una configuración polarizada, con actina polimerizada en el frente de avance. Tras el contacto inicial, la SI inmadura presenta una estructura radial simétrica de polimerización de actina, dirigida hacia el exterior del perímetro de contacto, creando un anillo. En la zona central se da un fenómeno de contracción mediado por miosina. Los MC se forman en la zona de la interfase y migran por el flujo de polimerización hacia el centro constituyendo el cSMAC (SI madura). Adaptado de Fooksman et al., 2010.

vará a cabo su función (Ten klooster and Hordijk, 2007).

#### 4.1. La familia Ras

Esta familia comprende 39 miembros con una alta similitud en el dominio efector, siendo su homología general del 50-55%. Dentro de este gran grupo existen a su vez varias subfamilias: Ras, R-Ras, Rap, Ral, Rheb y Rin (Bos, 1997; Reuther and Der, 2000; Wennerberg et al., 2005).

#### TC21: Nexo de unión entre el receptor y las rutas de supervivencia

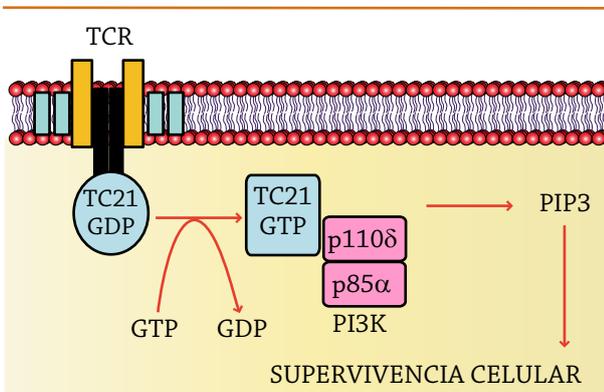
TC21 (RRas2) pertenece a la subfamilia RRas (RRas1, RRas2 y RRas 3) (Ehrhardt et al., 1999). En 1993 Terhorst, C y colaboradores descubrieron la existencia de una GTPasa unida a CD3 $\gamma$  desde los primeros momentos del ensamblaje del complejo TCR CD3 (Peter et al., 1993). En 2009 (Delgado et al., 2009) sugerimos que esta proteína debía ser TC21

(subfamilia RRas), la cual se encontró en su forma inactiva, unida a todas las unidades del TCR (incluida CD3 $\gamma$ ) a través de los Motivos de Activación basados en Tirosinas del Inmuno-receptor (ITAM), en células T en reposo.

TC21 tiene una alta capacidad intrínseca de intercambio de guanina comparada con H-Ras (Movilla et al., 1999). Una observación de gran importancia es que TC21 ha sido descrita como la única proteína GTPasa no Ras clásica mutada en tumores humanos (Barker and Crompton, 1998; Huang et al., 1995) y sobre-expresada en diferentes tipos de cáncer (Arora et al., 2005; Clark et al., 1996; Delgado et al., 2009; Sharma et al., 2005).

Comparando con las Ras clásicas, TC21 tiene la capacidad de activar específicamente a la subunidad catalítica p110 $\delta$  de PI3K (Murphy et al., 2002; Rodríguez-Viciano et al., 2004). En el caso de las células T y B, esta RRas GTPasa activa rutas de supervivencia directamente

uniendo la actividad de sus receptores, TCR y receptor de las células B (BCR) respectivamente, con la activación de la ruta PI3K/Akt (Fig. I4).



**Fig. I4** **TC21 punto clave en la supervivencia de células T**

TC21, unido constitutivamente en su forma inactiva a los dominios ITAM del TCR, transmite las señales tónicas de supervivencia que la célula recibe a través de su receptor. Su activación supone la estimulación de la ruta PI3K, clásica ruta de supervivencia celular (Delgado et al., 2009).

De esta manera se ha visto que TC21 es esencial para la supervivencia de las células B y T maduras. Así, los ratones deficientes en RRas2, a pesar de mostrar aparentemente un desarrollo del sistema inmune normal, muestran linfopenia, debido a una proliferación homeostática y a una supervivencia deficiente de las células T y B.

Por todo ello, hemos sugerido que TC21 media la señalización tónica por el receptor, necesaria para el mantenimiento de las poblaciones de las células T y B constante con el tiempo. Tal señal impide por una parte la expansión de la población celular de manera antígeno independiente, pero mantiene dicha población en un número adecuado para garantizar la respuesta ante una infección. TC21 controlaría directamente la señal tónica mediada por los receptores de antígeno, a través de la unión con PI3K (p100δ).

Por último, propusimos que TC21, a través de su unión al receptor de manera constitutiva, ejerce su función ante señales débiles transmitidas a través del TCR/BCR (señales tónicas de supervivencia), pero ante una señal fuerte inducida por la unión del antígeno, serían otras rutas y otras GTPasas las que mediarían la activación de PI3K, como es el caso de las Ras clásicas. No se sabe cuál puede ser el papel de TC21 en esta situación y si incluso, puede estar interaccionando con otro tipo de subunidad catalítica además de p100d, ampliando así su ámbito de actuación.

#### 4.2. Familia Rho

La familia Rho GTPasa, y las proteínas que las regulan, tienen importantes funciones en múltiples procesos celulares, como división celular, supervivencia, migración y adhesión. En mamíferos se conocen 23 genes que codifican un total de 26 proteínas de esta familia. Según su homología en la secuencia de aminoácidos, este grupo se divide en 6 familias: Rho, Rac, cdc42, Rnd, RhoBTB y RhoT/Miro (Wennerberg and Der, 2004).

Se conocen 79 GEF diferentes. La familia Dbl es el grupo más numeroso (66 miembros) y está caracterizado por el dominio homólogo Dbl (DH), que corresponde al dominio catalítico de la actividad GEF (Rossman et al., 2005). Adyacente a este dominio, encontramos un dominio de Pleckstrina (PH), que se puede unir a lípidos de la membrana en localizaciones específicas (Rameh et al., 1997).

El control de la polimerización del citoesqueleto de actina fue la primera función atribuida a las GTPasas de la familia Rho. Las proteínas más estudiadas y consideradas pro-

totípicas de esta gran familia de Rho GTPasas son RhoA, Rac1 y cdc42. Cada una de ellas actúa como nexo de unión entre la señalización a través de receptores de membrana y el ensamblaje o desensamblaje del citoesqueleto de actina.

### **RhoG y su regulación**

RhoG es un miembro de la familia Rho GTPasas que comparte un 72% y 62% de homología con Rac1 y cdc42 respectivamente. Diferentes trabajos, han mostrado que RhoG controla la activación de Rac y cdc42 (Blangy et al., 2000; Hiramoto et al., 2006; Katoh et al., 2006; Katoh and Negishi, 2003; Katoh et al., 2000; Nakaya et al., 2006; Wojciak-Stothard et al., 1999), promoviendo al final la activación de la polimerización de actina. Otros trabajos han sugerido que la actividad de RhoG es paralela a la de Rac y cdc42, sin estar en una relación jerárquica, bien compartiendo efectores, bien controlando fenómenos diferentes (Meller et al., 2008; Prieto-Sanchez and Bustelo, 2003; Wennerberg et al., 2002).

La localización de RhoG en la célula es diversa: membrana plasmática, vesículas intracelulares y aparato de Golgi (Gauthier-Rouviere et al., 1998; Prieto-Sanchez et al., 2006). Se piensa que RhoGDI-3, que interacciona específicamente con RhoG, determina en parte su localización intracelular (Brunet et al., 2002; Zalcman et al., 1996). El mecanismo que determina la liberación de RhoG del complejo RhoGDI-3 es aún desconocido (Dransart et al., 2005).

Se han descrito varios GEF que pueden estar controlando la actividad de RhoG, siendo TRIO el más conocido. Su activación y consecuente actividad de RhoG ha sido implicada en

la generación de estructuras celulares características (Blangy et al., 2000), crecimiento de neuritas (Estrach et al., 2002), fagocitosis (deBakker et al., 2004; Henson, 2005) y control de la secreción de gránulos presentes en células neuroendocrinas (Ferraro et al., 2007).

TRIO ha sido descrita como una proteína con triple función, debido a la presencia de 3 dominios funcionales diferentes (Debant et al., 1996): dos dominios GEF (Bellanger et al., 2003), uno con especificidad para la activación de RhoG/Rac1 (GEF D1) y otro para RhoA (GEF D2), y un dominio proteína serina-treonina quinasa (PSK). La zona GEF D1 presenta un dominio DH, seguido de un dominio PH. A este último dominio se le atribuye la unión a proteínas o lípidos dirigiendo así su localización celular (en el caso de TRIO, dicho dominio no es necesario para la actividad GEF). No se conoce bien la función del dominio PH, ya que su afinidad por los fosfatidilinositole es muy baja (Chhatrivala et al., 2007; Skowronek et al., 2004), sin embargo dicha afinidad aumenta a través de la interacción con el extremo C terminal de RhoG (Skowronek et al., 2004), el cual queda libre tras separarse, por algún mecanismo aún no descrito, del GDI correspondiente.

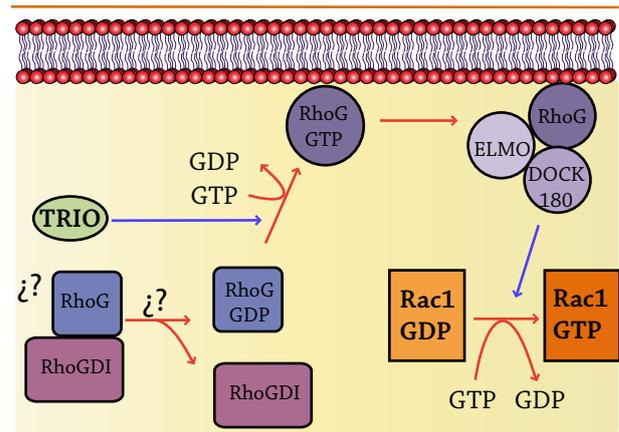
Dada la existencia de dos dominios DH en TRIO, y por lo tanto dos tipos de diana, es interesante estudiar el posible mecanismo que controla en cada momento la activación de un tipo de GTPasa u otra (RhoG/Rac frente a RhoA), sobre todo en procesos como la fagocitosis en macrófagos, donde ambos tipos de GTPasas tienen efectos contrarios: RhoG/Rac1 favorecen el proceso, RhoA lo inhibe (Nakaya et al., 2006). Un mecanismo factible es la lo-

calización subcelular diferencial de TRIO, que favorecería la activación de una GTPasa u otra (Bellanger et al., 2000).

Una vez activada RhoG, controla la actividad de Rac1 y cdc42, a través de la unión a ELMO (deBakker et al., 2004; Katoh and Negishi, 2003) que forma un complejo trimérico con Dock180. (Gumienny et al., 2001; Wu et al., 2001; Zhou et al., 2001) (Fig. 15).

Son muchos los trabajos que relacionan a RhoG con los procesos de internalización, pudiendo citar los procesos de fagocitosis de células apoptóticas, macropinocitosis o la endocitosis mediada por caveolas (balsas lipídicas ricas en caveolina), proceso descrito como independiente de clatrina (Prieto-Sanchez et al., 2006).

La ausencia de RhoG en células T procedentes de ratones RhoG<sup>-/-</sup>, no conlleva la aparición de importantes defectos en la respuesta inmune de estos animales. Únicamente se ha



**Fig. 15**

**Control de la actividad de RhoG por diferentes factores**

RhoG puede localizarse secuestrado en su forma inactiva en el citoplasma por un GDI específico. Tras la estimulación del receptor adecuado, algún tipo de modificación a nivel del GDI debe ocasionar la liberación de la GTPasa y la actuación del GEF correspondiente (TRIO) para el intercambio de GDP por GTP. Durante este proceso RhoG debe ser localizada en membrana donde ejecuta su función formando un complejo trimérico con ELMO y Dock180, siendo esta última una GEF de Rac1, promoviendo por tanto la activación y la inducción de la polimerización de actina por parte de esta GTPasa. Adaptado de Elfenbein et al., 2009.

descrito un aumento en la respuesta proliferativa de las células T/B, y un incremento en suero de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2b</sub> ante la estimulación a través del TCR (Vigorito et al., 2004).

## 5. Internalización alrededor del TCR: ¿varios procesos, diferentes destinos?

La célula T, en reposo, se caracteriza por mantener los niveles totales de TCR en membrana constantes. Para ello los TCR están bajo un control dinámico que conlleva la continua internalización y degradación, compensadas por el continuo reciclaje y la nueva síntesis de TCR. La estimulación de la célula T, a través del TCR, supone la ruptura de tal equilibrio, y la rápida disminución de los niveles del receptor en membrana (modulación negativa). Este proceso es debido, seguramente, a la modifica-

ción de alguno de los factores que permitían antes el equilibrio: aumento en internalización y degradación y/o disminución del reciclaje y nueva síntesis.

### 5.1. ¿Qué o quién controla el equilibrio?

Se propone que, en células en reposo, el 70-85% del TCR está expresado en membrana y el 15-30% en compartimentos intracelulares (Kragel, 1987; Liu et al., 2000; Menne et al., 2002; Minami et al., 1987), los cuales colocali-

zan con transferrina y su receptor, lo que sugiere que tales TCR se destinan a endosomas de reciclaje. Las tasas de degradación y nueva síntesis en estas condiciones son muy bajas, indicando que la mayoría de los receptores en membrana provienen de compartimentos endosomales de reciclaje.

Hay dos tipos de secuencias en las subunidades del TCR, responsables de interactuar con la maquinaria de internalización: el dominio basado en tirosinas, presente en todas las cadenas señalizadoras del TCR (CD3<sub>edgz</sub>), que es realmente parte de la secuencia ITAM (YxxL/I) y el dominio basado en dileucinas (DxxLL) (Mellman, 1996) localizado en las subunidades CD3γδ (las letras representan el código de aminoácidos y X cualquier aminoácido). Este último es el que ha sido descrito como el responsable de mediar el proceso de endocitosis del TCR y el consecuente reciclaje a membrana. Estos motivos son reconocidos por componentes proteicos localizados en la parte interna de la membrana plasmática, los cuales median la internalización de la proteína. En algunos casos, el reconocimiento de tales motivos está mediado por la fosforilación de alguno de sus residuos, y en otros casos es la ubiquitinación de las colas citosólicas de los receptores, lo que determina el destino de los receptores.

Se ha sugerido que el mecanismo de internalización de una célula en reposo coincide con el de una estimulada. Se ha mostrado la existencia de dos acúmulos de TCR en las células en reposo, un grupo que están fosforilados e interiorizados, y otro grupo que no presentan tal modificación y se encuentran en membrana (Kragel, 1987). Por tanto, se propone al mecanismo de internalización presente en las

células en reposo, como un control equilibrado de procesos de fosforilación, defosforilación mediado por quinasas y fosfatasa, que afecta a la Ser<sup>126</sup> de CD3γ, próximo al dominio de dileucinas. Dicha fosforilación produce, probablemente, un cambio conformacional en el motivo basado en dileucinas, dispuesto, tras esta modificación, para interactuar con la maquinaria de internalización (Dietrich et al., 1997; Rodionov and Bakke, 1998). De esta manera la secuencia DxxxLL se une a AP-2 en la membrana plasmática y por lo tanto a la maquinaria de endocitosis. La fosforilación basal del residuo de Ser<sup>126</sup> que tiene lugar en estas condiciones, parece estar mediada por PKC (Dietrich et al., 1998; Minami et al., 1987).

Sin embargo, la utilización de diferentes técnicas parece sugerir que la ruta que controla la internalización del TCR en el estado basal de la célula es diferente a aquella internalización que tiene lugar tras la estimulación (Dietrich et al., 2002). De hecho, se muestra como el proceso de internalización constitutiva es dependiente del dominio de dileucinas, pero es independiente de la Ser<sup>126</sup> y de PKC. En base a esto, el dominio de dileucinas de CD3γ en la célula en reposo estaría constitutivamente expuesto, permitiendo una tasa constante de unión a AP-2 y por lo tanto de internalización, sin necesidad de la actividad basal de PKC. Por otro lado, este mismo trabajo, sugiere que en el caso de la internalización inducida por el ligando del TCR, sería dependiente de PKC pero independiente del dominio de dileucinas, apareciendo la posibilidad de la implicación de otro tipo de dominio que medie la internalización (Lauritsen et al., 1998; Legendre et al., 1999; Niedergang et al., 1997b).

La función de la internalización constitutiva es aún desconocida, pero se le atribuyen: control de calidad del TCR, aumentar la tasa de variabilidad de TCR disponibles en membrana y permitir la existencia de acúmulos intracelulares de TCR disponibles para ser relocalizados ante un estímulo en el punto de contacto.

## 5.2. Modulación negativa de los niveles totales de TCR en membrana tras la estimulación

Tras la estimulación del TCR, sus niveles en membrana disminuyen drásticamente, probablemente debido a un aumento de la internalización (Menne et al., 2002), aumento de la degradación y disminución del reciclaje. Tras la internalización, el TCR es degradado y tratado como una unidad global (von Essen et al., 2004).

Ante una estimulación, solo una pequeña parte de los TCR presentes en la SI parecen estar unidos al péptido específico, sin embargo casi el 90% de los TCR es internalizado, lo que se explica por la existencia de dos grupos de TCR: los contactados y los no contactados o comodulados (Niedergang et al., 1997a; San Jose et al., 2000), siendo la comodulación importante en los primeros minutos del proceso de activación (Utzny et al., 2006). Se ha descrito que los TCR contactados no son reciclados, sino que son degradados (Valitutti et al., 1997) bien por vía lisosomal o proteosomal (Bonifacio and Weissman, 1998; Cenciarelli et al., 1992; Cenciarelli et al., 1996).

La comodulación es dependiente de la afinidad del ligando usado para estimular, así, ante una afinidad alta, la modulación negativa de ambos tipos de receptores tiene lugar, pero

mientras que la expresión de los TCR contactados en membrana permanece baja, los TCR comodulados son reexpresados en superficie después de 30 minutos. Sin embargo, cuando la afinidad es baja, la cinética y comportamiento de los dos grupos de TCR es similar, encontrándose ambos reexpresados en la membrana al poco tiempo.

Inicialmente esta diferencia en cuanto a dinámica y destino se relacionó con la existencia de dos rutas bien diferenciadas que controlaban la internalización de los dos grupos de TCR. Esto quedaba patente en resultados iniciales donde en condiciones fisiológicas, los inhibidores de PKC tenían más efecto ante dosis bajas de antígeno y mostraban una incapacidad inhibitoria ante dosis altas. Esto permitió describir la internalización de los TCR comodulados, con destino a los endosomas de reciclaje, dependiente de PKC, al contrario que los modulados directamente por el antígeno que eran destinados a degradación y cuyo mecanismo de internalización era desconocido (San Jose et al., 2000).

En este proceso conjunto de internalización de los dos tipos de receptores, el contacto del TCR por el antígeno, iniciaría la señalización proximal dando lugar a la activación de PKC, la cual fosforila a la Ser<sup>126</sup> del CD3 $\gamma$  del TCR comodulado. Esto causaría la exposición del motivo de dileucinas y la posibilidad de unión de AP2, con la consiguiente internalización de este TCR no contactado, por un proceso dependiente de clatrina (Monjas et al., 2004).

En cuanto al mecanismo subyacente a la internalización del TCR contactado, se ha descrito, además de independiente de señalización conocida, dependiente de ATP, de temperatura

y de dinamina (Monjas et al., 2004). Además, tal internalización se describió dependiente de colesterol, proponiendo así, que el proceso global de modulación negativa es el conjunto de un proceso dependiente de clatrina y otro dependiente de balsas lipídicas. La proporción de uno u otro, dependerá del tipo de estímulo. Este estudio se hizo en condiciones de estimulación con ligandos de alta afinidad, usando un TCR constituido por una quimera de CD3 $\zeta$ . Se presenta así, la existencia de un mecanismo implicado ante altas dosis de antígeno y alta afinidad, donde solo determinados tipos de estimulación (anticuerpo pegado a placa y la utilización de péptidos presentados por CPA) muestran la implicación de una ruta hasta el momento desconocida.

En base a estos datos, fueron varios los trabajos que intentaron describir con precisión la ruta que está bajo el control de la internalización de los TCR modulados directamente por el antígeno o ligando. Actualmente se piensa que al menos son dos rutas las que están implicadas en tal fenómeno, una dependiente de la actividad PTK (Lck), que conlleva la ubiquitinación del TCR mediante la activación por Zap70 de Cbl, mientras que la otra es dependiente de PKC, activando el motivo de dileucinas presente en CD3 $\gamma$ . Sin embargo la mayoría de estos estudios se han realizado en condiciones de estimulación con anticuerpos solubles, lo que supone un punto a tener en cuenta (Geisler, 2004).

La implicación de PKC en ambos grupos de TCR (modulados y comodulados) parece, hasta el momento, mostrar también una diferencia en cuanto a qué isoforma se encarga de la internalización de cada TCR, siendo PKC $\alpha$  la

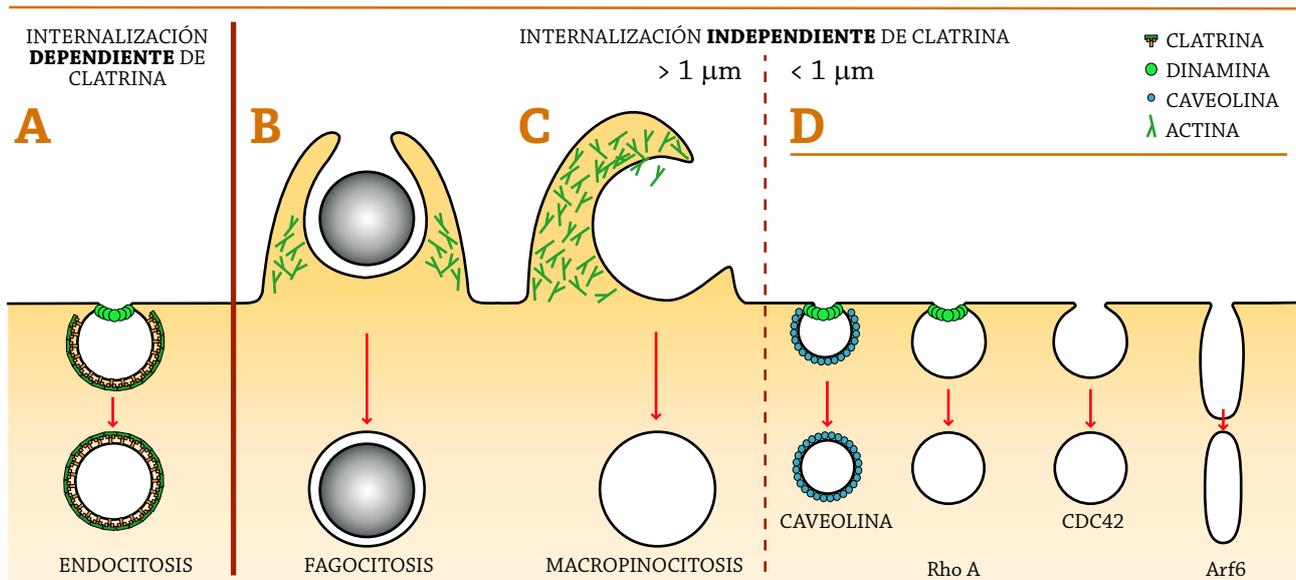
que media la internalización de los TCR comodulados y PKC $\theta$  la de los TCR modulados. Esta diferenciación podría estar relacionada con el hecho de que los TCR comodulados son internalizados por un proceso dependiente de clatrina y los modulados por un proceso dependiente de balsas lipídicas, lo que conlleva una localización diferente y por lo tanto el requerimiento de una isoforma diferente (von Essen et al., 2006).

Resumiendo, en condiciones de estimulación, podemos clasificar dos grupos de TCR: los comodulados, que son internalizados por una ruta dependiente de PKC $\alpha$ , activada seguramente por Lck cuya actividad viene determinada por la señalización proximal inducida en los TCR contactados, y cuyo destino principal es el reciclaje. Y por otra parte los TCR contactados, donde parece estar implicadas dos rutas diferentes, una PTK dependiente, donde Lck controla la ubiquitinación y degradación del TCR, y otra mediada por PKC $\theta$ . En cuanto a la ruta general de endocitosis subyacente, los experimentos realizados por Monjas et al, muestran la existencia clara de dos fenómenos, uno clatrina dependiente (los TCR comodulados y el TCR en estado basal) y clatrina independiente (TCR contactados) cuya relación con las rutas de señalización planteadas para este grupo de TCR es aún desconocida.

### **Endocitosis dependiente e independiente de clatrina**

Aunque la ruta dependiente de clatrina es la más estudiada y conocida, cada vez son más las moléculas internalizadas por procesos independientes.

Las nuevas rutas de internalización (constituyen el 50% del total de los procesos

**Fig. I6****Clasificación general de procesos de entrada en la célula**

Partículas de gran tamaño son internalizadas por procesos fagocíticos independientes de clatrina (B) dando lugar a vesículas de gran tamaño. En el caso de incorporación de fluidos, este proceso se denomina macropinocitosis (C) y junto con la fagocitosis constituyen mecanismos independientes de clatrina y dependientes de actina. Las partículas de pequeño tamaño (<math>< 1 \mu\text{m}</math>) pueden ser internalizadas por un fenómeno clásico de endocitosis mediado por clatrina (A) o por mecanismos independientes que son clasificados actualmente en función de la pequeña GTPasa implicada. En este último grupo también está incluido el proceso de internalización mediado por caveolinas, también independiente de clatrina (D). Adaptado de (Mayor and Pagano, 2007; Sandvig et al., 2008).

de endocitosis) (Gong et al., 2008), son muy diversas en cuanto a maquinaria implicada y en el destino de los componentes internalizados. Hasta el momento los motivos encargados de mediar tal internalización son desconocidos y no se conocen proteínas adaptadoras que se encarguen de su unión y reconocimiento para determinar la internalización de la proteína por ese mecanismo.

Un aspecto a destacar es que la clasificación en procesos dependientes de clatrina frente a independientes va unido a poca o gran dependencia con el colesterol respectivamente, además se ha observado que las proteínas o ligandos a internalizar suelen estar asociados a zonas de membrana con características lipídicas específicas, como las balsas lipídicas. (Kirkham and Parton, 2005).

Revisiones actuales del campo, han dividido los procesos de internalización indepen-

dientes de clatrina en varios grupos (Fig. I6).

### 5.3. Internalización del TCR: localización y función

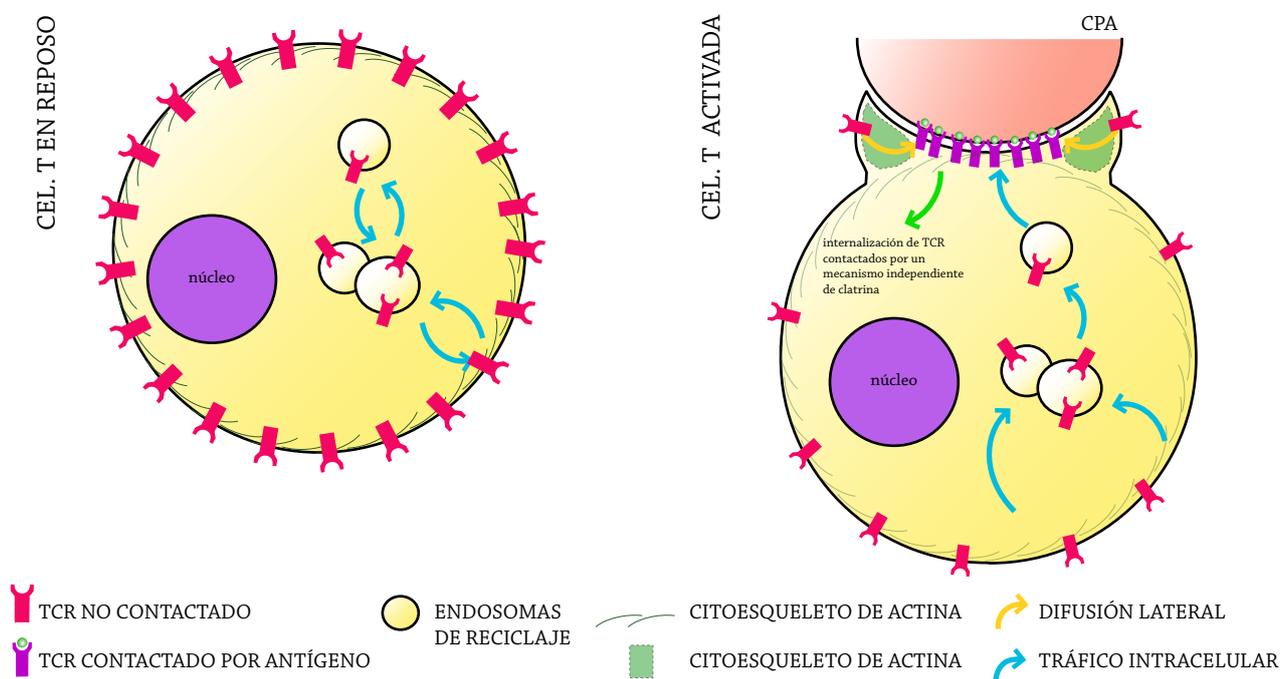
Durante la formación de la SI se puede discernir entre dos tipos de internalización del TCR: el que permite la relocalización de los complejos del TCR en la zona de la SI desde puntos distales, y el que tiene lugar desde el cSMAC para la internalización del TCR. Estos procesos son fenómenos tempranos y tardíos respectivamente en lo que se refiere al inicio de la formación de la SI (Fig. I7).

La internalización de los TCR distales, correspondería mayoritariamente el proceso de TCR comodulados y dependiente de clatrina (von Essen et al., 2006). En cuanto al proceso de internalización más tardío y que corresponde a los TCR contactados (mecanismo independiente de clatrina), debe tener lugar desde

la SI, donde las dos membranas están en estrecho contacto. Respecto a los procesos de internalización que tiene lugar desde la SI hay que recordar la localización de PKC $\theta$  y Cbl de manera específica en el cSMAC, ambas proteínas implicadas en la señalización conocida para la internalización de los TCR contactados. Actualmente a la internalización de este grupo de TCR contactados desde la SI se le atribuye una función degradativa (Lee et al., 2003; Lee et al., 2002). Esta función está condicionada a la localización de LBPA en el centro de la estructura de la SI (marcador de cuerpos multivesiculares (CMV), cuya función es degradativa) (Varma et al., 2006), y a la ubiquitinación de CD3 $\zeta$  y CD3 $\delta$  seguramente por Cbl-1 también localiza-

da en esta punto (Wiedemann et al., 2005). La existencia de los residuos ubiquitinados y los CMV en la zona del cSMAC, han hecho proponer la implicación de las proteínas del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT) en la internalización y consiguiente degradación del TCR (Vardhana et al., 2010; Williams and Urbe, 2007), y su función parece solo importante ante péptidos agonistas fuertes. Sin embargo tal proceso degradativo solo es importante ante péptidos agonistas que causan una modulación negativa en la célula, ya que aquellos que son más débiles la internalización no es necesaria (Cemerski et al., 2007).

En este proceso de internalización/de-



**Fig. I7**

### Dinámica general de los TCR en la célula T

En reposo, los receptores de la célula T (TCR) se encuentran en un ciclo constante, desde todos los puntos de la célula. Los receptores ciclan desde la membrana a compartimentos de reciclaje endosomal por un mecanismo dependiente de clatrina. Tras el estímulo, los TCR presentes en las zonas distales a la interfase donde se crea la SI, se internalizan por la misma ruta independiente de clatrina pero con un reciclaje dirigido hacia la zona de contacto, constituyendo parte del grupo de TCR conocidos como TCR comodulados. La acumulación de estos TCR y la difusión lateral de los TCR próximos a la interfase constituyen la SI. Desde ese punto, los TCR se internalizan por un mecanismo independiente de clatrina, donde la ubiquitinación de los receptores debe jugar un papel importante (Fackler et al., 2007).

gradación mediado por ESCRT, se ha descrito la implicación específica de TSG101 en la internalización degradativa, pero también se ha

descrito su función en la formación del cSMAC y por lo tanto en el transporte de los MC hacia el centro de la interfase.

## 6. Fagocitosis y trogocitosis: adquisición de material ajeno

45

### 6.1. Fagocitosis por células profesionales

Se conoce como fagocitosis al proceso por el cual las células internalizan partículas más grandes de 1  $\mu\text{m}$ . Se consideran células fagocíticas profesionales a los neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, y en algunos casos a los precursores de estos últimos (monocitos), los cuales presentan una respuesta fagocítica menor. Debido a la diversidad de células, patógenos y variantes, todo lo referente a fagocitosis explicado a continuación está referido al proceso común de fagocitosis de partículas opsonizadas, mediada por células profesionales del sistema inmune de mamíferos a través de los receptores FcR.

Las interacciones continuadas de los receptores FcR con sus ligandos permite el proceso fagocítico mediado por la expansión de la membrana y del citoesqueleto sobre la partícula (modelo de fagocitosis en cremallera, “zippering”), permitiendo la internalización completa de la partícula, dando lugar al fagosoma. Es la forma y tamaño de la partícula a fagocitar lo que determina la forma del fagosoma. Esta gran vesícula es transportada al interior celular y se va fusionando con lisosomas convirtiéndose así en orgánulos de destrucción del patógeno ingerido (Fig I8).

Consistente con la idea de que el proceso fagocítico está mediado por uniones locales del

receptor, cuando un macrófago se asienta sobre una superficie recubierta de IgG se da una respuesta frustrada de fagocitosis, donde la membrana se expande creando una unión muy fuerte con la superficie, a la que intenta fagocitar (Wright and Silverstein, 1984).

#### Señalización para la ingestión de la partícula

La fagocitosis es iniciada por la agregación de los receptores FcR (p.ej Fc $\gamma$ R para fagocitar partículas recubiertas de IgG) y por la consiguiente fosforilación específica de los motivos ITAM localizados en las cadenas accesorias  $\gamma$  del receptor.

El complejo de Fc $\gamma$ R y las proteínas citoplasmáticas reclutadas crean un agregado de proteínas fosforiladas y lípidos modificados (Yeung and Grinstein, 2007), los cuales pueden permanecer en el complejo o difundirse en la bicapa lipídica. Estas señales modifican la actividad de otras moléculas, las cuales en último término estimulan la polimerización de actina cerca de la membrana plasmática (en cuestión de segundos) y la extensión de la membrana sobre la partícula.

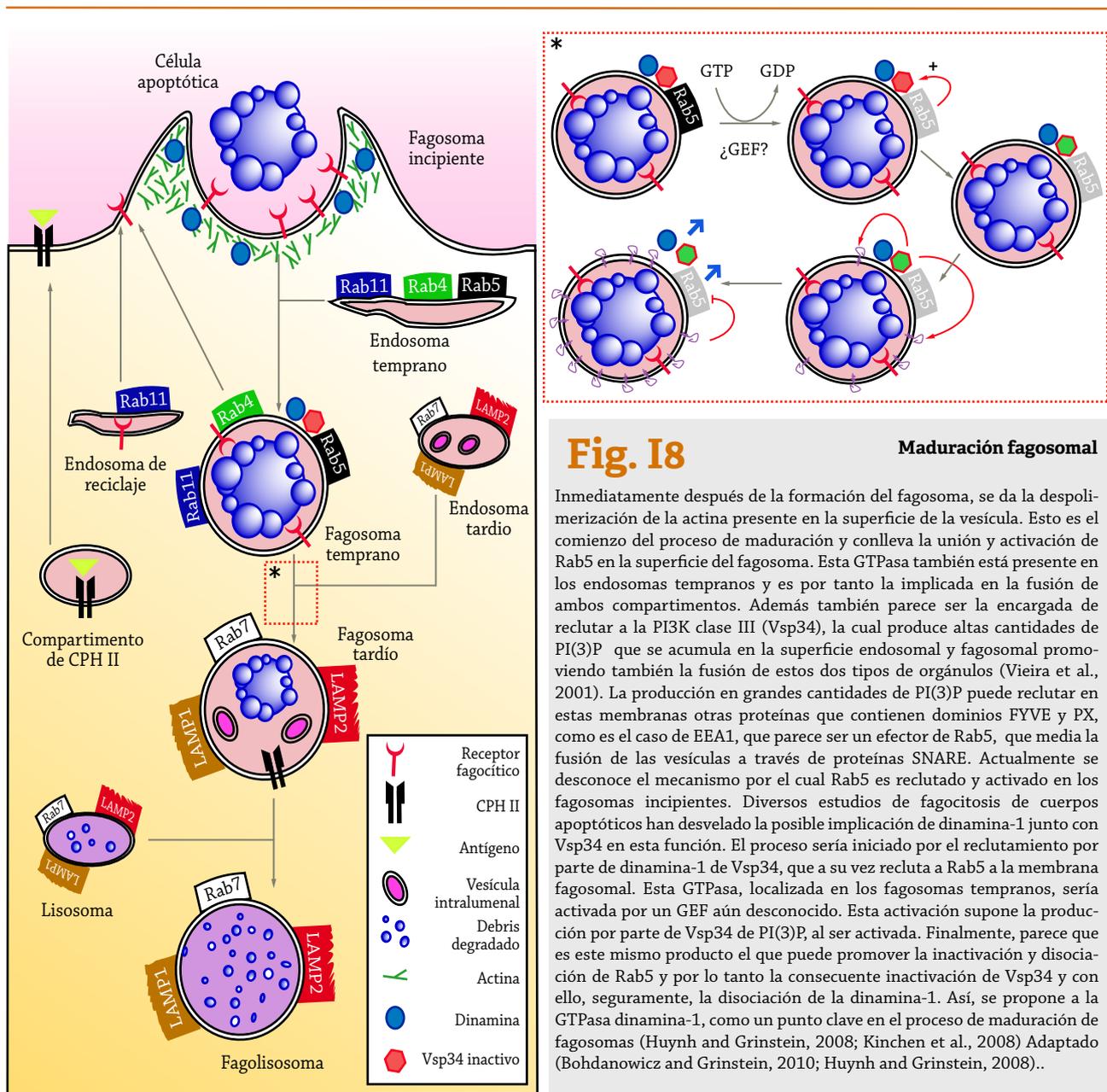
PI3K de clase I controla toda la reorganización profunda de la actina en este caso (Lindmo and Stenmark, 2006). La clase I de PI3K usa PI(4,5)P<sub>2</sub> como principal sustrato, dando lugar a PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, que puede aumentar la actividad

de determinadas proteínas que modifican la membrana y el citoesqueleto de actina, los cuales se unen a los lípidos modificados a través de dominios específicos: dominio PH, dominio PX y dominio FIVE.

Los niveles de  $PI(3,4,5)P_3$  presentes en el recién formado fagosoma disminuyen rápidamente (Vieira et al., 2001) y es en este momento cuando la actividad de PI3K clase III (hVsp34) controla su maduración.

Dada la importancia de PI3K en estos

procesos, se han desarrollado distintos inhibidores de su actividad, por ejemplo LY294002 y Wortmanina entre otros. Se ha descrito que estos inhibidores bloquean la fagocitosis tras el ensamblaje de actina en la copa fagocítica (Araiki et al., 1996) la cual queda inconclusa por no poder resolverse la internalización completa en el citoplasma. Por lo tanto, parece que los fenómenos iniciales de expansión de membrana no requieren de la actividad de PI3K, pero sí las actividades posteriores como es la forma-



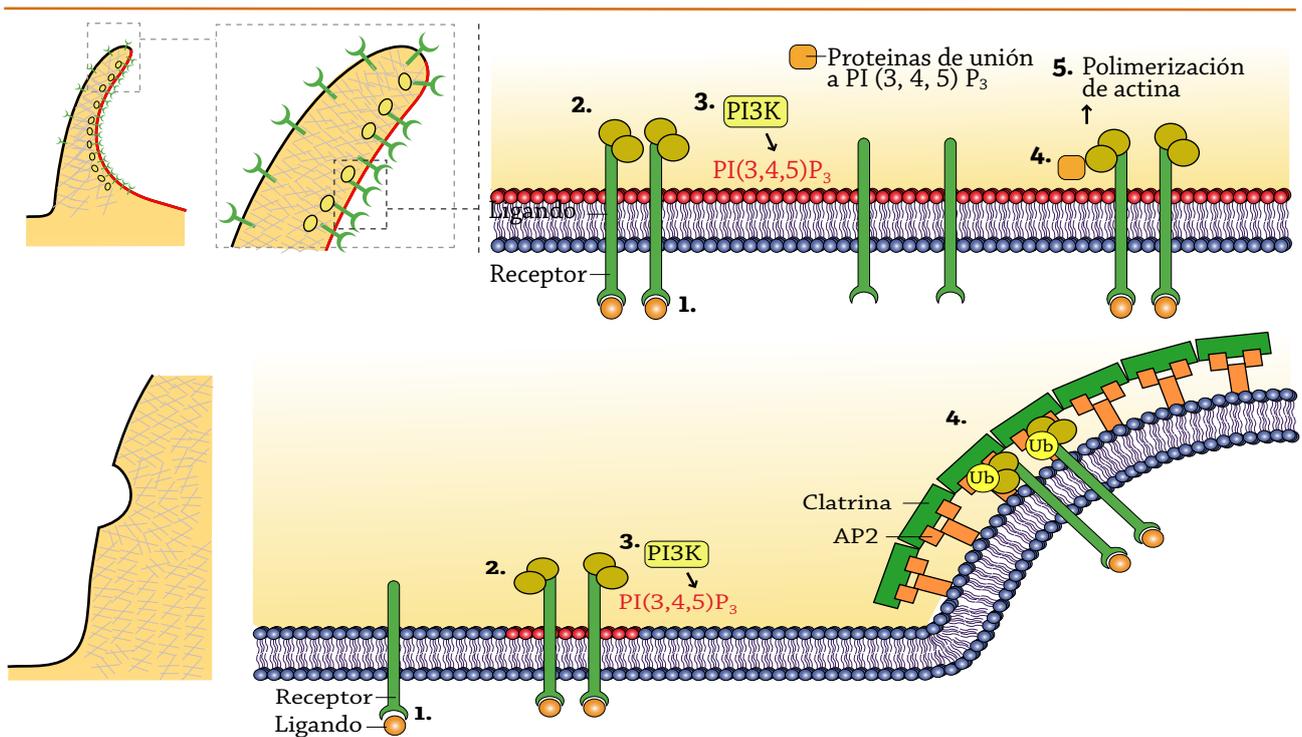
ción del fagosoma (Cox et al., 1999; Marshall et al., 2001).

Diferentes GTPasas de la superfamilia Ras están implicadas en este fenómeno, por ejemplo RhoG y su GEF TRIO controlan procesos de fagocitosis de células apoptóticas, produciendo la activación de la GEF de Rac1.

Es importante tener en cuenta que los niveles de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> aumentan abruptamente en la parte interna de la copa fagocítica, esto indica la existencia de una activación o inhibición retroalimentada de PI3K o fosfatasa como PTEN respectivamente. Además, debe

existir de alguna manera unas barreras que limiten la difusión de todos estos productos lipídicos a las zonas que no pertenecen a la copa fagocítica, lo que aumenta aún más la concentración requerida en altos niveles para activar correctamente los GEF o GAP determinados (Beemiller et al., 2006). Los FcγR contactados que no adquieran la señalización necesaria para superar un límite o porque la partícula a fagocitar es muy pequeña, el proceso que tiene lugar para la internalización es el mediado por clatrina (Huang et al., 2006) (Fig. I9).

Otro aspecto a resaltar es la limitación de



**Fig. I9** Importancia del contexto de membrana en el que la activación tiene lugar

La señalización que tienen lugar en la parte de membrana enfrentada a la partícula a fagocitar (A) es muy diferente a la que tiene lugar fuera de éste dominio (B).

**A** La unión de los ligandos al receptor (1) supone la agregación de diferentes receptores y de la unión de las proteínas señalizadoras a los dominios citoplasmáticos constituyendo el señalosoma (2). El reclutamiento de PI3K supone la producción de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (3) constituyendo una zona de actuación debido al aumento de concentración de este lípido modificado en esta parte de la membrana, debido a una difusión limitada entre otras cosas. Al superar un límite de niveles de lípidos modificados, determinadas proteínas de unión a estos sustratos actúan (4), lo que ocasiona la señalización necesaria para la modificación del citoesqueleto de actina para permitir la formación del fagosoma.

**B** Fuera de la copa fagocítica, la unión del ligando (1) también estimula la oligomerización del receptor y la unión y constitución del señalosoma (2). De la misma manera PI3K es reclutado y media la producción de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (3), sin embargo en este caso no hay una barrera de difusión, por lo tanto no se alcanzan los niveles requeridos para la activación y localización de determinadas GTPasas. Como consecuencia el receptor es internalizado por un mecanismo dependiente de clatrina (4).

Adaptado de Swanson, 2008.

las propiedades físicas de la partícula a fagocitar. Partículas tensas y reforzadas son perfectamente fagocitadas, sin embargo partículas más blandas que no presentan la resistencia adecuada, no. Por lo que la fagocitosis parece estar afectada positivamente por la existencia de resistencia mecánica y una curvatura en la superficie (Beningo and Wang, 2002).

La dinamina ha sido implicada en el procesos fagocíticos, concretamente en la extensión de membrana sobre la partícula a fagocitar (Yu et al., 2008; Yu et al., 2006) controlando el aporte de material a la membrana plasmática (Peters et al., 2004; Praefcke and McMahon, 2004) y regulando la polimerización de actina (Hinshaw, 2000).

### **Cuerpos multivesiculares y presentación del antígeno**

A lo largo del proceso de maduración del fagosoma, pueden aparecer CMV (vacuolas de unos 200-500 nm, que presentan una membrana limitante que engloba, a veces, cientos de vesículas de 40-90 nm (Katzmann et al., 2002)). Éstos se forman a partir de endosomas/fagosomas tempranos. Los CMV sufren un proceso de maduración, pasando por un estado temprano inicial que luego madura (o se fusiona) a CMV tardíos (endosomas tardíos) los cuales en último lugar se fusionarán con lisosomas.

El hecho de que diferentes tipos de proteínas que han sido internalizadas y englobadas en un endosoma/fagosoma temprano, sean compartimentalizadas en este tipo de estructuras multivesiculares, supone la aparición de dos tipos de moléculas, aquellas localizadas en la membrana limitante, y aquellas que se sitúan en las vesículas internas (lumen).

La posibilidad de localizar una proteína en dos tipos de localizaciones -lumen/membrana limitante- otorga una función degradativa o de reciclaje respectivamente. El reciclaje se realiza por la producción de exosomas (Denzer et al., 2000), debido a la capacidad de los CMV de fusionarse con la membrana plasmática (Raposo et al., 1996).

Los mecanismos que determinan el destino de diversas proteínas a las vesículas de los CMV son aún desconocidos. Se sugiere la existencia de 3 factores diferentes que pueden regular este proceso:

- La monoubiquitinación de proteínas presentes en la membrana limitante (Piper and Luzio, 2001).

- Existencia de microdominios de membrana en la estructura limitante de los CMV (Piper and Luzio, 2001), por ejemplo por la acumulación de PI(3)P generados por PI3K clase III, y sirve de sustrato para el complejo ESCRT (Wollert and Hurley, 2010) o la presencia de LBPA (ácido liso(bis)fosfatídico) (Kobayashi et al., 1998), el cual presenta una estructura cónica característica que parece estar mediando la curvatura de la membrana para permitir la formación de los CMV.

- La presencia de un tipo nuevo de clatrina localizado en la parte citoplasmática de los CMV que puede retener proteínas ubiquitinadas para impedir su reciclaje y determinar, por tanto, su internalización en las vesículas de los CMV (Sachse et al., 2002).

Se ha propuesto ESCRT -0, -I, -II y -III como la maquinaria responsable de la formación de las vesículas de los CMV. Aunque la acción secuencial de estas proteínas ha sido implicada en múltiples procesos de comparti-

mentalización de proteínas, también se están dando funciones independientes a proteínas como Hrs y TSG101 en procesos de internalización y formación de CMV (Razi and Futter, 2006)..

### *Presentación de péptidos antigénicos desde los CMV*

Los CPH DE CLASE II (CPH-II)-II recién sintetizados son transportados desde el trans-Golgi hasta los CMV y lisosomas, convirtiendo a estas regiones en lo que se conoce como compartimentos de CPH-II (CCII) (Sallusto et al., 1995), siendo los CMV las localizaciones más activas de carga de péptidos en el CPH-II.

Las células dendríticas inmaduras presentan casi todo su contenido de CPH-II almacenado en las vesículas internas de los CMV, tras la estimulación, se incrementa la expresión en membrana de CPH-I y CPH-II, además de múltiples moléculas coestimuladoras. El incremento de la expresión de CPH-II se lleva a cabo principalmente con la expresión de los complejos acumulados en el CCII. Para ello, las vesículas internas que contienen CPH-II, son transferidas a la membrana limitante, facilitando la carga del péptido antigénico en el CPH-II. Además, la reorganización de la membrana supone la formación de estructuras tubulares, que se dirigen hacia la periferia de la célula, para alcanzar la membrana plasmática. Desde estas estructuras, se crean una serie de vesículas conteniendo los CPH-II que se reexpresarán en la membrana plasmática (Kleijmeer et al., 2001; Murk et al., 2002). Este mecanismo no excluye la posibilidad de la fusión de los CMV directamente con la membrana, permitiendo la producción de exosomas, los cuales parecen jugar un papel importante en el desarrollo de la

respuesta inmunitaria (Admyre et al., 2008).

## **6.2. Trogocitosis: expansión del proteoma celular**

La Trogocitosis (del griego “trogo” que significa mordisquear) (Ahmed et al., 2008; Caumartin et al., 2006; Davis, 2007; Hudrisier and Bongrand, 2002; LeMaoult et al., 2007) permite a las células incorporar material que de manera natural no expresan en sus membranas, y desarrollar así nuevas funciones.

El intercambio de información a través de la SI va acompañado, en la mayoría de los casos, por un intercambio de material a través del proceso trogocítico el cual fue descubierto por primera vez en 1973 (Bona et al., 1973), cuando se apreció que los contactos estrechos realizados entre los linfocitos y sus CPA permitían el intercambio de proteínas de membrana, como el CPH desde células B a células T, de manera antígeno específica. Además se vio que la incorporación del antígeno específico presentado por el CPH correspondiente, iba acompañado de otros CPH no específicos y de otras moléculas cointernalizadas, como B7-1, B7-2, ICAM e IgM entre otros.

Éste fenómeno ha sido descrito en diversos tipos celulares como en células T  $\alpha/\beta$  (Arnold et al., 1997; Huang et al., 1999b; Hudrisier et al., 2001), Células T  $\gamma/\delta$  (Espinosa et al., 2002), células B (Batista et al., 2001), células NK (Carlin et al., 2001), CPA (Herrera et al., 2004) y células tumorales (Vanherberghen et al., 2004). Independientemente del tipo celular que adquiera el material, parece esencial, la creación de una interfase entre ambos tipos de células implicadas y la unión del ligando al receptor de antígeno, o al receptor NK (depen-

diendo del tipo de linfocito).

El proceso trogocítico ha sido principalmente estudiado en el caso de la interacción entre células T  $\alpha/\beta$  y CPA en ratón y en humanos (Game et al., 2005; Hudson and Sprent, 1976; Hudson et al., 1974; Sharrow et al., 1981; Sharrow et al., 1980; Tatari-Calderone et al., 2002), y ha sido descrito como un fenómeno de intercambio rápido. Aunque durante mucho tiempo, se ha postulado que la transferencia de material era unidireccional, diferentes trabajos han mostrado la bidireccionalidad del fenómeno (He et al., 2007; Vanherberghen et al., 2004). La cantidad de material transferido depende directamente de la dosis de péptido agonista (Huang et al., 1999b; Hudrisier et al., 2001) o de la afinidad del receptor por el antígeno como ocurre en el caso de las células B (Batista et al., 2001; Fleire et al., 2006), siendo más eficientes en el proceso las células activadas (Brezinschek et al., 1999; Rechavi et al., 2007).

Poco es sabido del mecanismo subyacente a este intercambio, sin embargo caben destacar algunas características clave que han servido para describir, en la medida de lo posible, el proceso trogocítico: es estrictamente dependiente del contacto célula-célula y está completamente inhibido cuando se usan membranas semipermeables para separar los linfocitos de sus células diana o cuando la CPA se fija con agentes químicos (Hwang et al., 2000; Hwang and Sprent, 2001; Rechavi et al., 2007)). Además las proteínas transferidas son incorporadas a la nueva célula en su forma íntegra, sin ser modificadas, y sin exponer en ningún momento su dominio citoplasmático. Por último, la cuestión temporal ya comentada con ante-

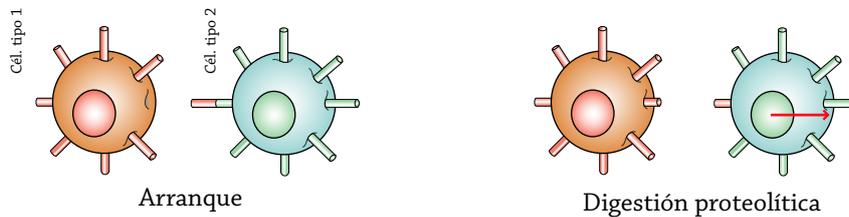
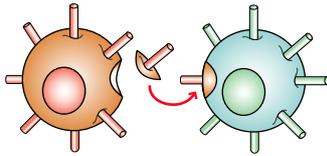
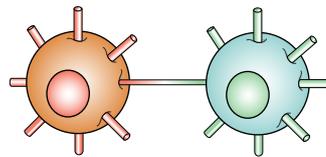
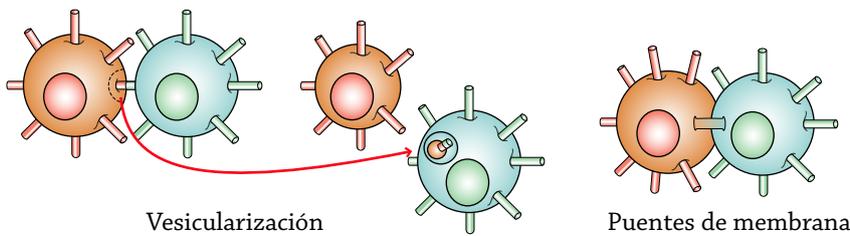
rioridad, y el hecho de haberse detectado que esta internalización supone la incorporación de material lipídico de membrana, visualizado mediante sondas lipofílicas (Daubeuf et al., 2009), convierte a la trogocitosis en un fenómeno distinguible y particular.

### **Posibles mecanismos responsables de la transferencia de material intercelular**

Son conocidos diferentes mecanismos de transferencia proteica que van desde los procesos de proteólisis de proteínas de superficie a mecanismos más sofisticados y especializados (Fig. I10).

Dados las características del proceso trogocítico, se ha propuesto al contacto directo intercelular, como el responsable del proceso trogocítico. Factores como la integridad de las proteínas y rapidez del intercambio, descartan los fenómenos de disociación de la proteína de la membrana y la producción de exosomas respectivamente. En cuanto a los nanotúbulos, no han sido visualizados en todos los casos donde el intercambio de material tiene lugar. En relación a qué tipo de contacto célula-célula es el implicado, son diferentes trabajos los que abogan por la existencia de tensiones que facilitan la aparición de un material de membrana disgregado de la célula diana que engloba a las proteínas transferidas y permite su transferencia a la célula receptora (efectora) (Williams et al., 2007).

Por tanto, el proceso trogocítico se define como una transferencia de fragmentos de membrana, mediante la cual las moléculas contenidas en un área determinada (intra y transmembrana) son transferidas de una célula a otra, incluyendo algunas que no participan en la interacción entre ambos tipos celulares

**A DISOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA DE LA MEMBRANA DE MANERA INDIVIDUAL****B GENERACIÓN DE EXOSOMAS****C FORMACIÓN DE NANOTÚBULOS****D TRANSFERENCIA POR CONTACTO DIRECTO CÉLULA-CÉLULA****Fig. I10****Mecanismos de transferencia proteica entre diferentes células del sistema inmune**

Las proteínas pueden ser transferidas como unidades individuales, mediante su liberación a través de una fuerza ejercida por parte de la célula receptora o por mecanismo de proteólisis en la base del receptor (A). Otro mecanismo, puede suponer la participación de estructuras membranas encapsuladas (exosomas) (B) o la aparición de nanotubulos que permiten la transferencia de material proteico (C). La transferencia también puede darse durante el contacto directo entre dos células (D), a través del intercambio de vesículas procedentes de la célula donante, directamente incorporadas en la célula receptora, o la existencia de puentes membranosos que comunican ambos tipos celulares. Adaptado (Davis, 2007)

51

(Huang et al., 1999a). El área que quedaría bajo el control de esta transferencia es la constreñida por la SI, formada por ambos tipos celulares, donde se acumulan una serie de moléculas y se excluyen otras.

**Trogocitosis: Un proceso ubicuo pero específico**

La trogocitosis en células T requiere la formación de la SI y la interacción del TCR con el péptido-CPH específico. Diferentes grupos apoyan la idea de que la fuerza requerida para tal proceso debe ser consecuencia de la internalización del TCR, desde la SI (Huang et al., 1999b; Hwang et al., 2000). De hecho, la rápida adquisición del CPH por parte de la célula T correlaciona directamente con la modulación negativa del TCR (Huang et al., 1999b).

Teniendo en cuenta la complejidad de la

SI y la cantidad de proteínas de membrana implicadas, es lógico pensar que no solo el TCR es el que permite la internalización del material. Así, CD28, parece jugar un papel muy importante en este proceso, mediando un proceso trogocítico independiente de antígeno (Hwang et al., 2000).

Diferentes trabajos han intentado describir cuál es el mecanismo implicado en la adsorción del material de la CPA. Se ha demostrado una clara dependencia del proceso trogocítico promovido por el TCR, de la polimerización de actina y de rutas de señalización temprana del TCR (Syk, Src y PI3K), con alguna diferencia en cuanto a CD4 y CD8 (Aucher et al., 2008). En cuanto a la dependencia del proceso de mecanismos dependientes de clatrina, parece ser que la trogocitosis, es independiente de ésta

proteína (Rechavi et al., 2007).

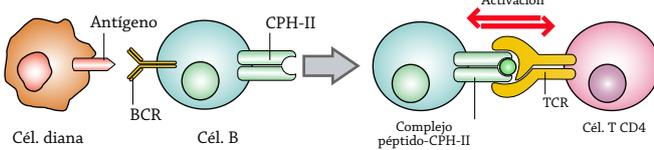
### ¿Cuál es el destino de las proteínas trogocitadas?

En procesos trogocíticos donde se ha descrito la transferencia de la proteína H-Ras, del BCR, de MICA (cadena A relacionada al CPH-I) y FcγR (proteínas de membrana) (Hudrisier et al., 2009; McCann et al., 2007; Quah et al., 2008; Rechavi et al., 2007), se ha intentado valorar la funcionalidad de estas proteínas en sus nuevas localizaciones. En el caso de H-Ras han demostrado la potencialidad de esta molé-

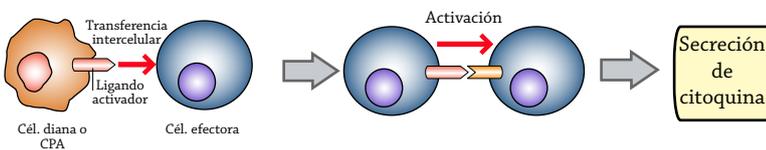
cula para activar rutas como Raf/Mek/Erk en la célula receptora. En el caso de las proteínas de membrana, la interpretación es más compleja. En todos los casos, ha sido demostrado la localización de la proteínas trogocitadas en la orientación correcta en la membrana de la célula aceptora, permitiendo la unión de su ligando. Sin embargo, en el caso de la transferencia de BCR de una célula B a otra (Quah et al., 2008) o el FcγR de una CPA a una célula T (Hudrisier et al., 2009), estos receptores no inducen la señalización intracelular corres-

## A INICIO, EXPANSIÓN Y TERMINACIÓN DE LA SEÑAL

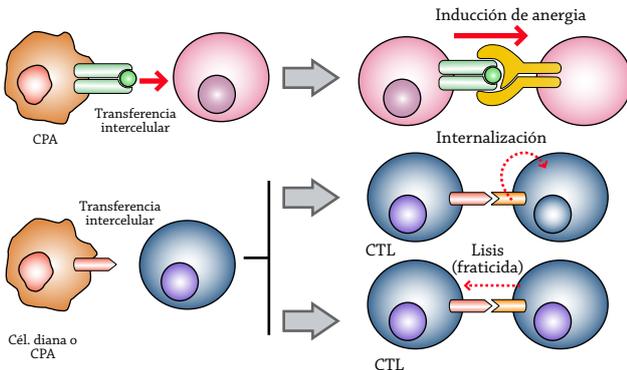
### 1. INICIO DE LA RESPUESTA INMUNE



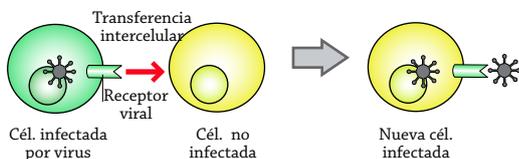
### 2. EXPANSIÓN/ AMPLIFICACIÓN



### 3. LIMITACIÓN Y TERMINACIÓN



## B ADQUISICIÓN DE NUEVOS FENOTIPOS



## Fig. I11

### La transferencia de material entre diferentes tipos celulares puede ejercer múltiples tipos de funciones en la respuesta inmune

La trogocitosis puede estar implicada en el inicio, expansión y terminación (regulación) de la respuesta

**A** (A1) Un ejemplo es la adquisición por parte de células B del péptido-CPH el cual puede ser presentado a una célula T virgen iniciando así la respuesta. (A2) Además, una célula T-CPA puede actuar amplificando la señal, incorporando el péptido-CPH y representándolo a otra célula T de la misma especificidad antigénica (Game et al., 2005; Xia et al., 2006; Zhou et al., 2005). (A3) Sin embargo, la trogocitosis también puede originar la limitación de la expansión de la señal (Carlin et al., 2005; Tsang et al., 2003), induciendo sobre determinados tipos celulares preactivados (célula T-CPA), procesos de anergia, o dando lugar a procesos fraticidas, donde la células T-CPA se convierten en diana de células citolíticas (Cox et al., 2007; Yang et al., 2006). Además ya solo la incorporación del péptido, disminuye la disponibilidad de la señal para posteriores interacciones entre las células T y las CPA, desprovistas, cada vez más, de péptido para presentar.

**B** La adquisición de material ajeno también puede otorgar un fenotipo específico, por ejemplo, convirtiendo a la célula T en dianas específicas de determinados virus (Mack et al., 2000; Tabiasco et al., 2003) (B). Adaptado (Davis, 2007).

pondiente al ser activados, bien porque no disponen de la maquinaria adecuada en la célula aceptora o porque su correcta orientación no significa una integración adecuada que le permite el reclutamiento de los segundos mensajeros responsables de la señalización.

### **¿Cuál es la función fisiológica o fisiopatológica de la trogocitosis?**

La adquisición por medio de la trogocitosis de proteínas inicialmente ausentes en la célula diana, pueden, directa o indirectamente, afectar al fenotipo de la célula y por lo tanto a la función atribuida a ésta (Fig. I11).

La dificultad tecnológica existente ac-

tualmente para visualizar y analizar el proceso trogocítico, ha limitado el número de experimentos que prueben que todas estas funciones ocurren in vivo. Sin embargo, aquellos que sí que lo han hecho, plantean dos cuestiones: la complejidad del sistema inmune, aún más entrelazado e interconectado de lo que ya de por sí le caracteriza, y la necesidad de describir el mecanismo molecular que controla el intercambio de material, para poder abrir nuevas vías terapéuticas, teniendo en cuenta la implicación que parece tener en la respuesta inmune (Beum et al., 2008; Machlenkin et al., 2008; Zhang et al., 2008).



# Objetivos



## Objetivos

El objetivo principal e inicial de este trabajo de tesis es la descripción del papel de TC21 (RRas2), una pequeña GTPasa cuya interacción con el TCR ha sido descrita (Delgado et al., 2009) en la internalización del TCR desde la membrana de la célula T. En base a este objetivo principal se pueden enumerar los siguientes objetivos concretos:

57

### **1. Caracterizar el papel de TC21 en la internalización de TCR desde la SI.**

- Describir la relación de la internalización controlada por TC21 con las rutas de endocitosis dependiente e independiente de clatrina.
- Describir la posible implicación de RhoG en el proceso de internalización del TCR desde la SI.

### **2. Valorar la capacidad fagocítica de las células T.**

- Analizar la implicación de factores reguladores de fagocitosis clásicas en la fagocitosis de las células T.
- Analizar la implicación de TC21 y RhoG en la capacidad fagocítica de las células T.

### **3. Describir la relación molecular entre TC21 y RhoG.**

### **4. Describir el proceso conocido como trogocitosis.**

- Valorar la implicación de TC21 y RhoG en el proceso trogocítico.

### **5. Valorar la capacidad presentadora de las células T.**

- Analizar el efecto de la ausencia de TC21 y RhoG en relación a la capacidad presentadora de la célula T.



# **Materiales y métodos**



## 1. Materiales

### 1.1. Líneas celulares

La línea celular JK se estableció a partir de la sangre periférica de una leucemia linfocítica aguda (Schneider et al., 1977). Por otra parte, las células Raji son células B procedentes de un linfoma Burkitt humano (Pulvertaft, 1964). Ambos tipos celulares se cultivan en RPMI 5% de suero fetal bovino (FBS) suplementado con 2 mM L-Glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 U/ml estreptomycin.

La línea celular Hek293T se originó a partir de la línea celular Hek293 que consistía en células embrionarias de riñón humano transformadas con adenovirus. Las Hek293T contienen además el antígeno grande de SV40 T, permitiendo la réplica episomal de los plásmidos que contienen el origen SV40 y la región temprana del promotor. Esta línea celular se crece usando DMEM al 10% FBS suplementado con 2mM L-Glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 U/ml estreptomycin.

La línea DCEK es una línea celular de fibroblastos transfectados establemente con I-E<sup>k</sup> y CD80. Se mantiene usando DMEM 10% FBS suplementado con 2 mM L-Glutamina, 100U/ml penicilina y 100 U/ml estreptomycin.

Cultivos de células T primarias pro-

cedentes de órganos periféricos de ratones (ganglios linfáticos y bazo) se mantienen en RPMI al 10% FBS, suplementado con 2 mM L-Glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomycin, 10 mM Piruvato sódico, 20  $\mu$ M  $\beta$ Mercaptoetanol y 5 pg/ml de IL2 si se requiere para mantener las células tras estimularlas (Ver Materiales y Métodos 2.1).

Las células dendríticas provienen de células de la médula ósea cultivándolas en RPMI 10% FBS, suplementado con 2 mM L-Glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 U/ml estreptomycin, 10 mM Piruvato sódico, 20  $\mu$ M de  $\beta$ Mercaptoetanol y 20 ng/ml de factor de estimulación de colonias de macrófagos-granulocíticos (GM-CSF) (Ver Materiales y Métodos 2.1).

### 1.2. Ratones

A lo largo del trabajo aquí presentado se han utilizado dos grandes grupos de ratones en relación al TCR: los transgénicos y los no transgénicos. Los no transgénicos son ratones de fondo C57BL/6 cuyo genotipo puede ser +/+, RRas2 -/- y RhoG -/-, estos dos últimos descritos en Delgado et al., 2009 y Vigorito et al., 2004 respectivamente.

**Tabla 1. Material utilizado en cultivos celulares.**

PRODUCTO CULTIVOS	CASA COMERCIAL
RPMI 1640	Servicio de Cultivos del CBMSO
DMEM	Servicio de Cultivos de CBMSO
Placas y botellas de cultivos	BD-Falcon
FBS (suero fetal bovino)	Sigma
GM-CSF	Prepotech

Los ratones RRas2<sup>-/-</sup> y RhoG<sup>-/-</sup> se cruzaron con ratones transgénicos para el TCR OT1 (V $\alpha$ 2.1 V $\beta$ 5.1), específico para el péptido SIINF-EKL (derivado de OVA) presentado por H2-K<sup>B</sup> (Hogquist et al., 1994) y para el TCR AND (V $\alpha$ 11.1 V $\beta$ 3) específico para el péptido MCC presentado por I-E<sup>k</sup> (Kaye et al., 1989). Los ratones heterocigotos resultantes se cruzaron entre ellos para generar ratones transgénicos +/+ y -/- para cada tipo de ratón.

Todos los experimentos se han realizado usando ratones homocigotos en la forma silvestre o con el gen de interés noqueado de la misma camada.

Para obtener células dendríticas para usar como CPA con haplotipo I-E<sup>k</sup>, se usaron ratones B10.BR.

Para genotipar los ratones se usaron los siguientes pares de oligos en función del alelo a detectar:

En algunos casos, los ratones transgénicos OT1 y AND se genotiparon mediante citometría con CD8/V $\alpha$ 2 y CD4/V $\beta$ 3 respectivamente, para lo que se utilizó sangre periférica.

Todas las cepas de ratón fueron mantenidas en el animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM, Madrid) de acuerdo a la legislación vigente.

**Tabla 2. Información de los oligos 5' y 3' utilizados para genotipar los ratones.**

ALELO	SECUENCIA OLIGO 5'	SECUENCIA OLIGO 3'
TC21 +/+	GGA TCA TGT TGT GGA GTT CTG GC	GTC CAA GAA GAC ATG GAT GGG GG
TC21 -/-	GGA TCA TGT TGT GGA GTT CTG GC	AAA CCC TCT TGC AGT TGC ATC CG
RHOG +/+	GGC ACA AAT GGC ACC CAG AGG	GAG TTT CCA GGC AAG GGG TGC
RHOG -/-	CCT CGT CTT GGA GTT CAT TC	GAG TTT CCA GGC AAG GGG TGC
OT1	ACG TGT ATT CCC ATC TCT G	CTG TTC ATA ATT GGC CCG
AND	CAG ACT CCA AGA TAT CTG GTG	GTC GGA GTT TGC ATT GTT CAG

### 1.3. Reactivos y soluciones

**Tabla 3. Reactivos, casa comercial de procedencia y aplicación.**

REACTIVO/PRODUCTO	CASA COMERCIAL	APLICACIÓN
Sales orgánicas, ácidos, bases y disolventes.	MERCK, PANREAC, SIGMA.	Varios.
Cubetas de electroporación. 0,4 mm.	Biorad.	Transfección por electroporación.
Separador celular de nylon (filtros 40 $\mu$ m)	BD Pharmingen	Obtención de células primarias
Filtros 0,45	Millipore	Filtrado de suspensión vírica
Counting beads.	Invitrogen.	Contar número de células en el citómetro de flujo
Membranas nitrocelulosa 0,2 $\mu$ m	Biorad	Western Blot
TEMED	Biorad	Western Blot

REACTIVO/PRODUCTO	CASA COMERCIAL	APLICACIÓN
APS	Sigma	Western Blot
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific	Western Blot
Dynabeads® M-280 Streptavidin	Invitrogen	Purificación de células T/B de ratón
Heparina Sódica	Chiesi	Obtención de linfocitos de sangre periférica humana.
Mouse IL2 Platinum ELISA	Bender Medsystems	Cuantificación de IL2 presente en el sobrenadante celular.
Polibreno	Sigma	Transducción de células primarias
jetPEI™	PolyPlus Transfection	Transfección células Hek293T
Lipofectamine™ and PLUS™ Reagent	Invitrogen	Transfección células DCEK
Enterotoxina de <i>Staphylococcus aureus</i> E (SEE)	Toxin Technologies.	Microscopia confocal con células vivas.
OVAp (SIINFEKL)	Sintetizado por la unidad de apoyo del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.	Estimulación de células T OTI.
MCC (ANERADLIAYLKQATK)	Sintetizado por la unidad de apoyo del centro de Biología Molecular Severo Ochoa.	Estimulación de células T AND.
Carbodiimide Kit.	Polysciences, Inc.	Unión covalente de anticuerpos a las bolas de látex
Polybead Carboxylate Microspheres (1 µm).	Polyscience, Inc.	Ensayos de fagocitosis
FluoroSpheres® Carboxylated-modified microspheres, crimson Fluorescent. (1 µm).	Molecular probes.	Ensayos de fagocitosis
Fluoresbrite® Carboxylate Microspheres. (3 µm y 6µm)	Polyscience, Inc.	Ensayos de fagocitosis
Placa 35 mm con cubre de 10 mm (Glass Bottom Culture Dishes)	MatFek Cooperation	Microscopia de células vivas
γ-globulina.	Sigma	Inmunofluorescencia
Fibronectina	Sigma	Inmunofluorescencia
Poli-L-Lisina	Sigma	Inmunofluorescencia
Mowiol-Dabco	Servicio de microscopía óptica y confocal CBMSO	Inmunofluorescencia
Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit	BD Pharmingen	Citometría de flujo
Citocalasina D	Calbiochem	Ensayos de fagocitosis y trogocitosis.
Wortmanina	Calbiochem	Ensayos de fagocitosis y trogocitosis.
LY294002	Calbiochem	Ensayos de fagocitosis y trogocitosis.

**Tabla 4. Tampones y soluciones.**

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN	APLICACIÓN
SOLUCIONES VARIAS		
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . pH 7,4.	Varias
TBS	50 mM TrisHCl, 276 mM NaCl, 54 mM KCl. pH 8.	Western Blot e inmunofluorescencia
PBS BSA 1%	PBS 1x, Azida 0,02%, BSA 1%.	Varias
PBS BSA 1% SAPONINA	PBS 1x, Azida 0,02%, BSA 1%, saponina 0,1%.	Varias
TBS-TWEEN	TBS 1x, 0,1% tween.	Western Blot
TNB	100 mM Tris-HCl 7,4, 150 mM NaCl, 2% BSA.	Inmunofluorescencia
HBSS	25mM Hepes KOH pH 7.4, 1mM MgCl <sub>2</sub> , 1mM CaCl <sub>2</sub> , 132mM NaCl, 0,1% BSA.	Microscopía con células vivas.
TAMPÓN LAVADO ÁCIDO	150 mM glicina pH 2,7, 50 mM NaCl.	Citometría de flujo: Cuantificación de la internalización de bolas látex no marcadas.
TAMPÓN ACK	0,15 M NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KHCO <sub>3</sub> , 0,1 mM EDTA, pH 7,2-7,4.	Obtención de células primarias
TAMPONES LISIS		
BRIJ96	20 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 10 mM IOAA, 1 mM PMSE, 1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 0.33% Brij96, e inhibidores de fosfatasa y proteasas.	Lisis celular: estimulación de eventos tempranos mediados por el TCR.
RIPA	50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, inhibidores de proteasas, 0,1 % SDS, 1% Tritón-X100, 0,5% Deoxicolato sódico e inhibidores de fosfatasa y proteasas.	Lisis celular: estimulación de eventos tempranos mediados por el TCR.
TAMPÓN LISIS PULL-DOWN GST-ELMO	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5% TritonX-100, 1 mM ditiotreitól e inhibidores de proteasas.	Lisis celular: Ensayos de pull down con GST-ELMO y GST-RAFRBD.
TAMPONES SDS-PAGE		
TAMPÓN DE CARGA 1x	Glicerol 10%, βmercaptoetanol 5%, SDS 3%, azul de bromofenol, 1/8 v del tampón del gel concentrador.	SDS-PAGE
TAMPÓN DEL GEL CONCENTRADOR (gel de poli-acrilamida)	0,4 M Tris pH 6,8, 0,4% SDS.	SDS-PAGE
TAMPÓN DEL GEL SEPARADOR (gel de poli-acrilamida)	1,5 M Tris pH 8,8, 0,4% SDS.	SDS-PAGE
Poliacrilamida	Acrilamida 30%, Bisacrilamida 0,8%	SDS-PAGE

## 1.4. Anticuerpos y sondas fluorescentes

**Tabla 5. Anticuerpos y sondas fluorescentes.**

ANTICUERPO/ SON-DA FLUORESCENTE	CLON O CÓDIGO	ISOTIPO	DESCRIPCIÓN	USO	ORIGEN	USO
ANTICUERPOS PURIFICADOS (PRIMARIOS)						
Anti-CD3 $\zeta$	448	Policlonal	Conejo	WB/IF	San José et al. 1998	1:3000
Anti-ratón CD3	145-2C11	IgG	Hámster	Bolas	J. Bluestone, UCSF	300 $\mu$ g/ml
Clathrin Heavy Chain	23	IgG <sub>1</sub>	Ratón	IF	BD Pharmingen	
OKT 3		IgG <sub>2a</sub>	Ratón	Bolas	Ortho Diagnostic Systems (Raritan, NJ).	300 $\mu$ g/ml
FG 1/6		IgG <sub>1</sub>	Ratón monoclonal	Bolas	(Salmeron et al., 1995)	300 $\mu$ g/ml
OKT 8		IgG <sub>2a</sub>	Ratón	Bolas	Ortho Diagnostic Systems (Raritan, NJ).	300 $\mu$ g/m
Anti-Phospo-Zap70 (Tyr319)/Syk (Tyr352)	65E4	IgG	Conejo	WB	Cell Signalling	1:1000
Anti-RhoG	1F3 B3 E5	IgG <sub>2a</sub>	Ratón	WB, IF	Santa Cruz Biotechnology, INC.	1:250
Anti-RhoG	C-20	Policlonal	Conejo	IF	Santa Cruz Biotechnology, INC.	1:250
Anti-Phospo-p44/42 MAP Kinase (thr202/ Tyr204) antibody	9101	Policlonal	Conejo	WB	Cell Signalling	1:1000
Anti-p44/42 MAP Kinase antibody	9102	Policlonal	Conejo monoclonal	WB	Cell Signalling	1:1000
4G10	4G10	IgG <sub>2b</sub>	Ratón	WB	Producción Propia	1:1000
Fc Block™ purified anti-mouse CD16/ CD32	2.4G2	IgG <sub>2b</sub>	Rata	CF	BD Pharmingen	1:100
Anti-RRAS2	2D3-4B8	IgG <sub>1</sub>	Ratón	WB/IF	Sigma	10 $\mu$ g/ml
Anti-Phospho-Akt (Ser473)(D9E) XPTM	D9E	IgG	Ratón	WB	Cell Signalling	1:2000
Anti-Akt Antibody	9272	Policlonal	Ratón	WB	Cell Signalling	1:2000
Anti-LBPA (lysobisphosphatidic acid)	6C4	IgG <sub>1</sub>	Ratón	IF	Echelon®	1:100
ANTICUERPOS DIRECTOS CONJUGADOS						
H57-FITC, biotinylated	H57-597	IgG	Hámster	CF/IF	Immunotools. Bioscience	1:100
Anti-CD4-PE-PerCP-Biotinylated	RM4-5	IgG <sub>2a</sub>	Rata	CF	BD Pharmingen	1:100
Anti-CD8 $\alpha$ -FITC, -PE, -PerCP, Biotinylated	53-6.7	IgG <sub>2a</sub>	Rata	CF	BD Pharmingen	1:100
Anti-V $\beta$ 3 TCR PE Biotinylated	KJ25	IgG <sub>2</sub>	Ratón	CF	BD Pharmingen	1:100

ANTICUERPO/ SONDA FLUORESCENTE	CLON O CÓDIGO	ISOTIPO	DESCRIPCIÓN	USO	ORIGEN	USO
Anti-CD69 FITC Biotinylated	H1.2F3	IgG <sub>1</sub>	Hámster	CF	BD Pharmingen	1:100
Anti-CD11b Biotinylated	M1/70	IgA	Rata	CF	BD Pharmingen	1:100
Anti-CD11c Biotinylated	HL3	IgG <sub>1</sub>	Hámster	CF	BD Pharmingen	1:100
Anti-I-E <sup>K</sup> Biotinylated	17-3-3	IgG <sub>2a</sub>	Ratón	CF	BD Pharmingen	1:100
Anti-B220 Biotinylated	RA3-6B2	IgG <sub>2a</sub>	Rata	CF	BD Pharmingen	1:300
ANTICUERPOS SECUNDARIOS						
Anti-hámster FITC	127-095-160	IgG	Cabra, anti-hámster	CF/IF	Jackson Immunoresearch	1:100
Anti-conejo Alexa 488	A-21206	IgG	Mono, anti-conejo IgGs	IF	Invitrogen	1:500
Anti-ratón Alexa 488	A-21202	IgG	Mono anti-ratón IgGs	IF/CF	Invitrogen	1:500
Anti-conejo Alexa 555	A-31572	IgG	Mono anti-conejo IgGs	IF	Invitrogen	1:500
Anti-ratón Alexa 555	A-31570	IgG	Mono anti-ratón IgGs	IF	Invitrogen	1:500
Alexa 555	S-32355		Streptavidin	IF	Invitrogen	1:400
Alexa 488	S-11223		Streptavidin	IF	Invitrogen	1:400
Anti-conejo Alexa 594	A-21207	IgG	Mono anti-conejo IgGs	IF	Invitrogen	1:500
Anti-ratón Alexa 594	A-21203	IgG	Mono anti-ratón IgGs	IF	Invitrogen	1:500
Anti-conejo Alexa 647	A-31573	IgG	Mono anti-conejo IgGs	IF	Invitrogen	1:200
Anti-conejo fragmento F(ab') <sub>2</sub> Peroxidasa (HRP)		IgG	Cabra anti-conejo	WB	Amersham	1:5000
Anti-ratón (HC/LC) Peroxidasa (HRP)		IgG	Oveja anti-ratón	WB	Amersham	1:5000
SONDAS FLUORESCENTES						
To-Pro-3	T-3605		Marcaje de ácidos nucleicos Cianida monomérica	IF	Invitrogen	1:500
Alexa Fluor® 488 phalloidin	A-12379		Sonda para F-Actina	IF	Invitrogen	1:100
Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate	P-1951		Sonda para F-Actina	IF	Sigma	1:500
CFSE				CF	Molecular Probes	5 µg/ml
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit.	PKH26GL		Sonda fluorescente	CF/IF	Sigma	4 µg/ml
Transferrina de suero humano, conjugado con Alexa Fluor® 633	T-23362		Conjugado de transferrina	IF	Molecular Probes	5 µg/ml

Bolas: Unido a las bolas de látex CF: Citómetro de flujo IF: Inmunofluorescencia WB: Western Blot

## 1.5. Vectores

Tabla 6. Lista de plásmidos.

NOMBRE	PLÁSMIDO	ORÍGEN	DESCRIPCIÓN
VECTORES DE EXPRESIÓN EN CÉLULAS DE MAMÍFERO			
TC21 WT-Dsred, -GFP, -CFP	pDsred2-C1 pEGFP-C1 pECFP-C1	Clonaje por PCR de la secuencia silvestre del cADN humano en el plásmido de interés.	Forma silvestre de TC21
TC21 S28N-Dsred, -GFP, -CFP	pDred2-C1 pEGFP-C1 pECFP-C1	Introducción de la mutación S28N usando el sistema de mutagénesis dirigida (Stata-gene).	Forma dominante negativa de TC21
TC21 G23V.Dsred, -GFP, -CFP	pDsred2-C1 pEGFP-C1 pECFP-C1	Introducción de la mutación G23V usando el sistema de mutagénesis dirigida (Stata-gene).	Forma constitutivamente activa de TC21
RhoG WT-GFP, -CFP	pEGFP-C1 pECFP-C1	(Prieto-Sanchez et al., 2006)	Forma silvestre de RhoG
RhoG T17N-GFP, -CFP	pEGFP-C1 pECFP-C1	(Prieto-Sanchez et al., 2006)	Forma dominante negativa de RhoG
RhoG Q61L-GFP, -CFP	pEGFP-C1 pECFP-C1	(Prieto-Sanchez et al., 2006)	Forma constitutivamente activa de RhoG
CD3-ζ-GFP, -CFP, -Dsred, -Cherry	pDsred2-N1 pEGFP-N1 pECFP-N1 pmCherry-N1	Inserción del cADN usando los sitios XhoI and EcoRI de los vectores indicados.	Proteína de fusión CD3ζ
pHR-CD3ζGFP	pHRSIN-CSGW	Inserción del cADN en el plásmido pHR-SIN-CSGW-dlNotI usando los sitios BamHI y NotI.	Proteína de fusión CD3ζ GFP en vector lentiviral
Rab4, 5, 7 and 11 - GFP	pEGFP-C1-N1	Marino Zerial, Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Germany	Formas silvestres de Rabs 4, 5, 7 and 11
EXP. BACT			
GST-ELMO	pGEX-4T2	Región N-terminal (aa1-362) de ELMO2.; (Prieto-Sánchez et al., 2006)	Forma silvestre de ELMO
GST-Raf1-RBD	pGEX-4T3	Caloca, MJ et al. 2003)	Forma silvestre de RafRBD

## 2. Métodos

### 2.1. Obtención de células primarias

68

#### Células T/B de órganos periféricos de ratón (ganglios linfáticos y Bazo)

Se aíslan los ganglios linfáticos y el bazo de los ratones de interés. En ambos casos se procesan mecánicamente para disgregarlos y conseguir una suspensión celular en PBS FBS 2%. Para la disgregación se pueden usar portaobjetos biselados o filtros de 40  $\mu\text{m}$ .

La suspensión celular se centrifuga a 1500 rpm durante 6 min. En el caso de los ganglios, el sedimento se resuspende con PBS FBS 2%, mientras que en el del bazo se requiere un paso previo de lisis de eritrocitos con el tampón de lisis Ack (5 min a temperatura ambiente) tras lo que se interrumpe la lisis con PBS 2% FBS.

Después de varios lavados las células se cuentan y si no se requiere una purificación especial, se resuspenden en RPMI 10% FBS (ver composición detallada en Materiales y Métodos 1.1). Esta suspensión celular se usa como células T para hacer directamente experimentos funcionales (estimulación, expresión de CD69, proliferación, etc.).

En otro tipo de experimentos necesitamos una población pura de células T o B, por lo que tras obtener la suspensión anterior, se procede con una incubación de las células con anticuerpos biotinilados que van a marcar la población de las células que se quiere eliminar, esto es, las células T o las B, según el caso (selección negativa). Para ello, se utilizan los siguientes anticuerpos:

- Purificación de células T:
  - Ratones AND: anti CD8, B220, CD11b y CD11c.
  - Ratones C57BL/6: anti B220, CD11b y CD11c.
- Purificación de células B:
  - Ratones AND: anti TCR  $\alpha\beta$  H57, CD11b y CD11c.
  - Ratones C57BL/6: anti TCR  $\alpha\beta$  H57, CD11b y CD11c.

En ambos procesos de purificación, la tinción se realiza a 0°C en PBS 2% FBS a una concentración de  $50 \times 10^6$  células/ml, durante 20 min (agitando las células periódicamente). Luego se lava y se toma una alícuota para comprobar posteriormente el resultado de la purificación.

Una vez las células están teñidas se añaden bolas magnéticas (Dynabeads) recubiertas con estreptavidina, a un cociente de 1:1 célula:bola (las bolas son previamente lavadas con PBS) en el mismo volumen que se ha realizado la tinción previamente ( $50 \times 10^6$  células/ml). Se incuban en rotación a temperatura ambiente durante 1 h, tras lo que se eliminan las bolas y con ellas las células que no son de interés mediante un imán.

La suspensión celular restante se lava y se recuentan las células (de este último grupo de células se toma también una alícuota para verificar el proceso de purificación).

Las células se resuspenden en RPMI 10% suplementado (Materiales y Métodos 1.1) a la concentración deseada.

El proceso de purificación se comprueba tiñendo las dos alícuotas de comprobación tomadas con una combinación de anticuerpos diferentes, según el caso:

- Purificación de células T: Estreptavidina (para detectar los anticuerpos biotinilados), anti TCR, CD4 y/o CD8.
- Purificación de células B: Estreptavidina (para detectar los anticuerpos biotinilados) y B220.

Tras la tinción, las alícuotas de comprobación se analizan en el citómetro de flujo, lo que permite calcular exactamente el porcentaje de contaminación de las poblaciones purificadas de células T o B con el otro tipo celular que no es de interés.

### **Células Dendríticas a partir de la médula ósea de ratón**

Se obtienen los fémures y tibias de las dos extremidades posteriores de los ratones. Estos huesos son perfundidos con PBS FBS 2% usando una jeringa con una aguja de 25G. La médula ósea se disgrega haciéndola pasar varias veces a través de la aguja obteniendo finalmente una suspensión celular homogénea.

La suspensión celular se centrifuga a 1500 rpm durante 6 min y luego se lisa el pellet de células con el tampón de lisis Ack durante 30 s para eliminar los eritrocitos. A continuación se lavan las células con PBS FBS 2% y se cuentan para diluirlas en RPMI 10% (Materiales y Métodos 1.1) suplementado con GM-CSF a 20 ng/ml a  $1 \times 10^6$  células /ml.

El cultivo celular se hace en pocillos de placa de P24 (16 mm) poniendo 1 ml por pocillo y manteniéndose así durante 3 días. Tras este primer periodo de crecimiento se elimina el sobrenadante -y por tanto todas aquellas cé-

lulas que no han quedado adheridas al pocillo- y se añade medio nuevo también con GM-CSF a 20 ng/ml. A partir de este momento el cultivo se mantiene expandiéndolo durante una o dos semanas hasta obtener las células suficientes para su uso.

### **Obtención de linfocitos de sangre periférica humana**

Se extraen 50 ml de sangre humana sana, se les añade heparina 10 U/ml (anticoagulante) y se diluyen en 90 ml de PBS. Se reparte la sangre diluida en 4 tubos falcon de 50 ml, a cada uno de los cuales se ha añadido previamente 15 ml de ficoll y se centrifugan los tubos durante 20 min a 1800 rpm, quitando el freno.

Tras la centrifugación se apreciarán 3 fases diferenciadas, se aísla la fase intermedia que corresponde a la fase de linfocitos (células mononucleares). Esta suspensión celular se diluye en PBS para lavar las células varias veces antes de usarlas.

## **2.2. Transfección de células**

### **Electroporación: Células JK**

Las células JK se transfectan transitoriamente por electroporación. Se toman  $10 \times 10^6$  células y se resuspenden en 500  $\mu$ l de RPMI 20% de suero con Hepes 20 mM pH 7,4.

Las células se disponen en una cubeta de electroporación de 0,4 mm, a la que se añaden 40  $\mu$ g totales de ADN (si se usan dos plásmidos diferentes sería 20  $\mu$ g de cada uno de ellos) y se mantienen durante 10 min a temperatura ambiente.

A continuación se realiza la electroporación con una capacitancia de 960  $\mu$ F y una

diferencia de potencial de 260 mV. Tras el choque eléctrico las células son transferidas rápidamente a 10 ml de medio RPMI completo al 5% y se mantienen así durante 24 h. Trascurrido este tiempo se comprueba la eficiencia de transfección por citometría y se usan las células para el correspondiente experimento.

### **Sistema jetPEI: células Hek293T**

El sistema jetPEI compacta el ADN en partículas cargadas positivamente capaces de interactuar con proteoglicanos aniónicos en la superficie celular, entrando en la célula por endocitosis.

Para ello, las células Hek293T son plaqueadas el día anterior en placas de P6 (35 mm) a  $2,5 \times 10^5$  células por pocillo en 2 ml de DMEN 10% FBS (Materiales y Métodos 1.1). Al día siguiente, las células deben estar a una confluencia del 70-80% aproximadamente. Éstas serán consideradas las células empaquetadoras.

El protocolo de transfección comienza con la preparación de las siguientes mezclas de ADN y jetPEI, donde las cantidades están indicadas para un punto de transfección que equivale a un pocillo de P6 (35 mm):

- TUBO A:
  - 100  $\mu$ l PBS 150 mM NaCl
  - jetPEI: 6  $\mu$ l (225  $\mu$ M)
- TUBO B:
  - 100  $\mu$ l PBS 150 mM NaCl
  - pMD2G; 0,5  $\mu$ g
  - pCMV-dR8.2: 1  $\mu$ g
  - ADN de interés: 1,5  $\mu$ g

Cada tubo se resuspende bien usando el vortex y se centrifuga para recuperar todo el volumen en el tubo. Luego se añade el volumen

del tubo A sobre el tubo B, mezclando bien y centrifugando. Se incuba durante 20-30 min a temperatura ambiente.

Tras este tiempo, y después de cambiar el medio de las células empaquetadoras por medio fresco (DMEN 10%), se añade el volumen obtenido gota a gota sobre las células Hek293T (intentando abarcar toda la superficie del pocillo).

Las células se mantiene así hasta 48 h, siendo tras este periodo de tiempo cuando se usa el sobrenadante para procesos de transducción, tal y como se explica en el apartado siguiente. Una vez se recoge el sobrenadante de las células, se comprueba la eficiencia de transfección.

### **Sistema Lipofectamida (“Lipofectamine™ and PLUS™ Reagent”): células DCEK**

Se plaquean las células DCEK a  $5 \times 10^5$  células por pocillo de P6 (35 mm), con 2 ml de medio DMEM 10% FBS (ver medio completo en Materiales y Métodos 1.1). Al día siguiente se procede con la transfección, para ello por cada punto (pocillo de 35 mm) se procede de la siguiente forma:

- Se añaden 2  $\mu$ g de ADN de interés en 100  $\mu$ l de DMEM libre de suero.
- Se mezcla bien el vial de “PLUS™ Reagent” y se añaden 20  $\mu$ l de éste a la suspensión de ADN anterior. Se mezcla e incuba durante 15 min a temperatura ambiente.
- En otro tubo se diluyen 5  $\mu$ l de lipofectamida en 100  $\mu$ l de DMEM libre de suero y se mezcla este volumen con la solución que contiene el ADN preparado con anterioridad. Se incuba a temperatura ambiente durante 15 min.
- Se elimina el medio a las células DCEK y se

añaden 400  $\mu$ l de medio DMEM libre de suero y los 220  $\mu$ l de la mezcla del ADN con la lipofectamida. Se mueve bien la placa para distribuir el volumen por el pocillo.

- Se mantiene la placa durante 3 h a 37 °C.
- Trascorrido este tiempo se añaden 600  $\mu$ l de medio DMEM completo 2x.
- Se utilizan las células 48-72 h después. Antes de usarlas se debe comprobar siempre la eficiencia de la transfección por citometría analizando los niveles de GFP.

### 2.3. Transducción de células T vírgenes

Las células que se transducen son obtenidas directamente de los ganglios linfáticos de ratones AND (+/+; RRas2-/-, RhoG-/-) (Materiales y Métodos 2.1). Se usan vectores lentivirales que permiten introducir de manera eficiente, integrar y expresar de forma estable transgenes en células quiescentes y proliferantes.

Las partículas lentivirales se generan mediante la coexpresión de elementos de empaquetamiento del virión y el genoma del vector en una célula usada como “productora”, la línea celular Hek293T.

Así, las células Hek293T son transfectadas por el método de JetPei (Materiales y Métodos 2.2) con los vectores que contienen los genes virales necesarios para la síntesis de la envuelta (pMD2G) y las proteínas de empaquetamiento (pCMVdR8.2) así como el genoma vírico que incluye el ADN de interés que codifica para CD3 $\zeta$ GFP (vector pHR-CD3 $\zeta$ GFP). Las partículas virales se van produciendo y concentrando en el medio de las células. Este sobrenadante es lo que se utiliza para transdu-

cir las células de los ganglios linfáticos.

El protocolo exacto es:

- Día 1: Se plaquean las células Hek293T en pocillos de P6 (35 mm) a  $2,5 \times 10^5$  para que el día siguiente estén a una confluencia del 70-80%.
- Día 2: Se transfectan con jetPEI las células Hek293T con los 3 tipos de vectores necesarios (Materiales y Métodos 2.2 para más detalle).
- Día 4: Se recoge el sobrenadante de las células empaquetadoras (Hek293T) y se filtra (filtro 0,45) para eliminar los restos celulares. Este sobrenadante es suplementado con Polibreno a 8  $\mu$ g/ml (el Polibreno es un polímero catiónico que neutraliza la repulsión entre los viriones y el ácido siálico presente en las membranas celulares, aumentando así la eficiencia de infección en las células diana). Además también se suplementa con el anticuerpo 145-2C11 a 1  $\mu$ g/ml para estimular las células diana y conseguir así blastos.

Paralelamente se obtienen las células de los ganglios linfáticos de los ratones de interés, se procesan como se ha indicado anteriormente (Materiales y Métodos 2.1), y tras contar las células se resuspenden en el sobrenadante con las partículas virales y el estímulo a  $0,5 \times 10^6$  células/ml. Se plaquean en pocillos de P24 (16 mm) añadiendo 2 ml en cada pocillo.

La placa se centrifuga a 2200 rpm durante 90 min a 32 °C, tras lo que se incuban las células durante 6h a 37 °C. Posteriormente se lavan y se les añade medio RPMI 10% FBS con IL2 a 5 pg/ml (Materiales y Métodos 1.1) dejando las células a la misma concentración inicial. Las células se usan 4 días después para microscopía confocal.

## 2.4. Microscopía óptica y confocal

### Microscopía confocal con células vivas

#### *Células Jurkat y células Raji*

Las células JK transfectadas con los plásmidos indicados 24 h antes, se resuspenden en HBSS a  $0,3 \times 10^6$  células/ml. A continuación se deposita 1 ml de esta suspensión celular sobre una placa de 35 mm con un cubre de 10 mm recubierto de Fibronectina (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se deja durante 15 minutos a 37 °C para que las células se adhieran.

Después se pone la placa en el microscopio, acoplado a una cámara que mantiene la temperatura a 37 °C y se toman imágenes secuencialmente de fluorescencia y campo claro cada 5 s, 30 s o 1 min, dependiendo del experimento.

Al minuto de haber empezado la grabación se añaden células Raji que han sido previamente cargadas con SEE durante 20 min en medio RPMI 5% a 37 °C a una concentración de  $3 \times 10^6$  células/ml.

Se añaden 60  $\mu\text{l}$  de la suspensión de CPA ( $3,5 \times 10^6$  cél./ml) en la zona próxima del objetivo esperando que entren en contacto con la célula T elegida y enfocada previamente.

En este trabajo, se usaron dos sistemas de microscopios diferentes: Zeiss LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200; y un LSM710 acoplado a un microscopio invertido AxioObserver con objetivos de inmersión 63x y 100x PlanApo oil (1.4 NA) respectivamente.

Las imágenes tomadas son procesadas con el programa Metamorph6.2r6 (Universal Imaging).

#### *Células primarias T y células presentadoras (DCEK o células de bazo)*

Células T previamente transducidas con pHR-CD3 $\zeta$ GFP (Materiales y Métodos 2.3) y estimuladas con 145-2C11 (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 4-7 días antes, son diluidas a  $1 \times 10^6$  células/ml en HBSS al 10% de FBS.

Se añade 1 ml de dicha solución celular a una placa petri de 35 mm con un cubre de 10 mm recubierto con Fibronectina (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y poli-L-Lisina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Las células se dejan durante 20-30 min para que se adhieran a la placa, que luego se coloca en la platina del microscopio para buscar células positivas para la transducción de CD3 $\zeta$ , cuya expresión sea homogénea de membrana.

Tras iniciarse la grabación se añaden 60  $\mu\text{l}$  de una suspensión celular de CPA previamente preparadas.

En el caso del sistema AND, se utilizan células DCEK marcadas o no con PKH26 (Materiales y Métodos 2.12) y cargadas con el péptido MCC (10  $\mu\text{M}$ ) durante la noche. Se resuspenden y diluyen a  $10 \times 10^6$  células/ml en HBSS 10% FBS.

En el caso del sistema OT1, se utilizan células directamente obtenidas del bazo de un ratón C57BL/6 y procesadas en el caso de que fuese necesario para marcarlas con PKH26. Estas células se cargan con péptido OVA (OVAp) a 3  $\mu\text{M}$  durante 2h a 37 °C y se diluyen a  $10 \times 10^6$  células/ml en HBSS 10% FBS.

Las imágenes fueron tomadas cada 5 s-30 s según el experimento usando LSM710 acoplado a un microscopio invertido AxioObserver con objetivos de inmersión 100x PlanApo oil (1.4 NA) y fueron procesadas con el programa Metamorph 6.2r6 (Universal Imaging).

## Microscopia Confocal con muestras fijadas

### *Conjugados JK- Raji*

Se utilizaron células JK transfectadas con diferentes plásmidos 24 h antes (Materiales y Métodos 2.2). Estas células se diluyeron en RPMI libre de suero Hepes 25 mM a  $0,3 \times 10^6$  en 25  $\mu$ l.

Como CPA usamos Raji diluidas a la misma concentración que las JK. Ambos tipos celulares se ponen en contacto en un volumen total de 50  $\mu$ l, se le da un pulso y se incuba a 37 °C durante diferentes tiempos.

Luego el volumen con las células se traspasa en forma de gota a un cubreobjetos recubierto de poli-L-lisina (50  $\mu$ g/ml durante 2 h a temperatura ambiente) y se deja las células sedimentar durante 15 min.

Posteriormente las células se fijan (ver tabla de uso de anticuerpos para el tipo de fijación) a temperatura ambiente. A continuación las preparaciones se lavan con TBS 1x y se permeabilizan si es necesario con saponina durante 20 min a temperatura ambiente o con Tritón a la concentración y el tiempo indicado posteriormente para cada anticuerpo. A continuación se hace un paso de bloqueo en TNB o PBS-Saponina (según el método de permeabilización) suplementados con  $\gamma$ -globulina (20  $\mu$ g/ml) durante 30 min a temperatura ambiente.

Tras ello se tiñe con los anticuerpos 1ariosy 2arios correspondientes indicados en cada figura y a la concentración indicada en la tabla de materiales utilizados (Materiales y Métodos 1.4).

Cada paso de tinción se realiza a temperatura ambiente durante 30 minutos y separa-

dos por pasos de lavado con el tampón usado para resuspender el anticuerpo. Tras el último paso de tinción se lava dos veces y una última en agua para montar la muestra sobre el portaobjetos con MOWIOL. La muestra se guarda a 4°C hasta su observación en el microscopio.

Una modificación de este protocolo es llevado a cabo para ver la posible colocalización de las vesículas de TC21 con transferrina que es internalizada por endocitosis. En este caso se añade transferrina Alexa-fluor633 a 5  $\mu$ g/ml en el medio 10 min antes de finalizarse el tiempo de estimulación de la célula JK con la célula Raji, tras ello, el proceso es idéntico al que se acaba de describir.

### *Células naive CD4+-DCEK*

Las CPA (DCEK) son plaqueadas el día anterior sobre cubreobjetos colocados en pocillos de una placa P24 (16 mm) a razón de  $50 \times 10^3$  células por pocillo y se incuban en DMEM 10% FBS suplementado con péptido MCC a 10  $\mu$ M durante toda la noche. Antes de ponerlas en contacto con las células T se lavan con PBS para quitar el péptido sobrante.

Para la obtención de las células T, se sacrifica un ratón AND+ del que se extraen los ganglios linfáticos. Se procesan según lo indicado en el apartado de obtención de células primarias (Materiales y Métodos 2.1) y se resuspenden para tener  $2 \times 10^6$  células/ml. En cada pocillo de p24 se añade 250  $\mu$ l y se incuba el tiempo deseado.

Para los tiempos cortos (menos de 10 min) se le da un pulso a la placa p24 a 800 rpm 12 s. A continuación se fijan las células con formaldehído al 2% y se continua con el proceso de tinción igual que en el caso de los conjuga-

dos JK-Raji, excepto el paso de bloqueo con  $\gamma$ -globulina, que se sustituye con un bloqueo simple con TNB.

#### **Conjugados células T- bolas de látex**

Se preparan las células (JK o células vírgenes) según se ha explicado con anterioridad, y se diluyen a  $2,5 \times 10^5$  o  $5 \times 10^5$  células en 25  $\mu$ l (RPMI libre de suero, 25 mM Hepes) en el caso de las JK o células vírgenes respectivamente. Las bolas de látex que se van a utilizar, una vez listas y recubiertas con el anticuerpo de interés (Materiales y Métodos 2.10) se diluyen en 25  $\mu$ l (RPMI libre de suero 25 mM Hepes) para tenerlas, al juntarlas con las células, en el cociente de interés (célula:bola) que se indica en cada figura en un volumen final de 50  $\mu$ l.

A continuación las células se incuban a 37 °C durante los tiempos de interés. Pero antes se les da un pulso de 12 s a 800 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, se traspasan las células a un cubreobjetos recubierto con Poli-L-Lisina (50  $\mu$ g/ml, 2 h a temperatura ambiente) y se dejan sedimentar durante 15 min, luego se procede con el proceso de fijación con formaldehído al 2% y posterior lavado con TBS.

Cuando sea necesario diferenciar las bolas internas de las externas, en función de su accesibilidad a un anticuerpo secundario correspondiente al anticuerpo que recubre la bola, se hace un paso de tinción con dicho anticuerpo -previo a la permeabilización con saponina- de modo que solo aquellas bolas que estén en el exterior celular serán positivas para la tinción.

A continuación se procede con un protocolo normal de tinción, igual que en los casos de conjugados de células, anteriormente des-

critos.

#### **Ensayo de internalización del TCR desde la sinapsis inmunológica**

En este caso se procede exactamente igual que en el caso descrito con anterioridad para conseguir conjugados de células T CD4+ con CPA DCEK.

La diferencia y a su vez la esencia del experimento, es que 5 min antes de poner las células T en contacto con las CPA, se añade a las células T un anticuerpo biotinilado con poca capacidad estimuladora contra la cadena  $\beta$  del complejo  $\alpha\beta$  del TCR (H57  $\alpha/\beta$ ). Esta tinción se realiza a 0° C.

Este paso previo de tinción tiene como objetivo marcar los complejos de TCR presentes en la membrana antes del estímulo con las DCEK. Será la unión con la célula presentadora lo que ocasione la formación de la SI y con ello la internalización de los TCR desde la membrana hacia el interior celular. Estos TCR pueden proceder de sitios distales a la sinapsis o de la propia estructura supramolecular (que es nuestro punto de interés).

Tras el tiempo de estimulación adecuado, se fijan las células y se tiñen, tras la permeabilización con PBS saponina, con 448 (anticuerpo anti CD3 $\zeta$ ) y con estreptavidina para detectar el anticuerpo anti TCR añadido previamente (como la célula no estaba permeabilizada en el momento de añadir este anticuerpo, todo marcaje que encontremos intracelular corresponde a TCR internalizado desde la membrana).

Lo que se cuantifica es la formación de sinapsis (en función de la acumulación de marcaje para TCR  $\beta$  y CD3 $\zeta$  en el lugar de contacto entre célula T y CPA) y la presencia de vesícu-

**Tabla 7. Condiciones de uso de anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia.**

ANTICUERPO O SONDA	CONCENTRACIÓN	TIPO FIJACIÓN	TIPO PERMEABILIZACIÓN
448 (anti CD3 $\zeta$ )	1:3000	FA 2%	Saponina 0,1%
Anti Cadena pesada de clatrina	1:100	FA 2%	Tritón 0,1%
Faloidina	1:100/1:500	FA 2%	Saponina 0,1%
Anti RRas2	10 $\mu$ g/ml	Metanol	Triton 0,2%
Anti RhoG	1:100	Metanol	Triton 0,2%
Anti LBPA	1:100	PFA 4%	Saponina 0,05%
Transferrina 633	5 $\mu$ g/ml	FA	--

FA: Formaldehido PFA: Paraformaldehido

las doble positivas en la zona inmediatamente próxima a la sinapsis, lo que nos indica que dichas vesículas proceden de la membrana y al estar próximas a la sinapsis, han sido internalizadas desde ese punto.

Como punto 0 en este tipo de experimentos tomamos células T formando conjugados con células DCEK sin MCC pero en presencia del anticuerpo anti- $\beta$  del TCR (H57  $\alpha/\beta$ ) para asegurarnos que el estímulo es debido a la presentación por parte de la célula presentadora y no a la posible capacidad estimuladora del propio anticuerpo.

## 2.5. Tinción de células para citometría

Las tinciones de citometría de cualquier tipo celular se realizaron siempre usando placas de fondo en v P96 (8 mm), donde cada pocillo corresponde un punto de tinción añadiendo de media de  $2-5 \times 10^5$  células. Todo el proceso se realiza a 0° C usando como tampón de tinción PBS-BSA 1%.

Se añade el anticuerpo primario diluido en PBS-BSA 1% a la concentración adecuada

(Materiales y Métodos 1.4) en un volumen final de 50  $\mu$ l para cada punto y se incuba durante 20 min, luego se lava con PBS-BSA 1% y se procede, si es necesario, a añadir un anticuerpo secundario acoplado a FITC, PE, PercP o APC (según el experimento). Este anticuerpo se diluye en el mismo tampón y se incuba 20 min. Por último se realizan dos pasos consecutivos de lavado y se preparan las células para pasar por el citómetro en un volumen final de 200  $\mu$ l añadiendo yoduro de propidio a una concentración final de 1  $\mu$ g/ml si es necesario.

En aquellos casos donde la proteína de interés es intracelular, se marcan en primer lugar las proteínas de superficie y a continuación se permeabiliza usando Saponina o fijando y permeabilizando con el sistema Cytofix/Cytoperm.

Las células se pasan por dos sistemas de citometría de flujo diferentes, según el experimento, un FACSCalibur con el software CellQuest, o FACSCanto II con el software FACSDiva 6.6.1. En ambos casos los datos son procesados con el programa FlowJo.

En el caso de las células de ratón se hace un paso previo al de tinción, de bloqueo de receptores Fc (CD16/CD32).

## 2.6. Experimentos funcionales

### Estimulación de células T y análisis de la activación de eventos tempranos mediados por el TCR

76

#### *Estímulo 1: bolas de látex recubiertas de anticuerpo anti-CD3 del complejo TCR*

Este tipo de experimentos se ha realizado con diferentes tipos celulares, en concreto, con células T vírgenes, células linfoblásticas y células JK. En el caso de las dos últimas, se incuban durante 1 h a 37 °C en RPMI sin suero suplementado con 20 mM Hepes. Finalmente, en los tres casos, se diluyen las células en este mismo medio a la concentración deseada.

Las bolas de látex, recubiertas de 145-2C11 u OKT3 para las células de ratón o para la línea celular JK respectivamente, se lavan con PBS centrifugándolas a la máxima velocidad durante 6 min. Luego se diluyen en medio RPMI libre de suero 20 mM Hepes a la concentración adecuada.

Tras poner las bolas en contacto con las células se hace un paso de sincronización consistente en la centrifugación durante 12 s a 800 rpm y la incubación de las células a 0 °C durante 5 min.

Posteriormente a esta sincronización, se procede a la estimulación de las células, para lo que se incuban a 37 °C los tiempos deseados, parando el estímulo centrifugando, quitando el sobrenadante y lisando las células con Brij96 o RIPA suplementado con los inhibidores de proteasas (1mM PMSE, 1µg/ml Aprotinina, 1µg/ml Leupeptina, 1 µM Benzamidina, 10mM Yodoacetamida) y fosfatasa (10mM NaF, 1mM NaVO<sub>3</sub>). La lisis se realiza en rotación a 4 °C durante 20 min. Después se centrifuga duran-

te 15 min a 13000 rpm y finalmente se recupera el sobrenadante como lisado celular postnuclear total.

Las células que corresponderán al “tiempo cero”, habrán estado en contacto con las bolas el tiempo máximo de entre los tiempos de incubación del experimento, pero no habrán recibido el estímulo de activación sino que se habrán mantenido siempre a 0 °C.

Parte del lisado total se resuspende con el tampón de carga 3x y se calienta a 90 °C durante 5 min. Las proteínas presentes en los lisados celulares se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) y se transfieren a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm. Las membranas se bloquean con 5% de leche en TBS-Tween, y se incuban con los anticuerpos primarios de interés durante 16 h a 4 °C. A continuación y tras varios lavados con TBS-Tween se sigue con una incubación con el anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa del rábano (horseradish peroxidase o HRP) durante 1 h.

Por último, y tras lavar las membranas con TBS-Tween, se detecta la proteína de interés usando el sistema ECL, siguiendo el protocolo de la casa comercial.

#### *Estímulo 2: Células presentadoras*

Las células T se obtienen de ratones transgénicos AND (Vα11.1 Vβ3). Estas células (como se ha descrito previamente en Materiales y Métodos 1.2) reconocen el péptido MCC presentado en el contexto de CPH-II I-E<sup>k</sup>. A lo largo de este trabajo se han usado o bien células vírgenes o células linfoblásticas previamente activadas con MCC. En este último caso, antes de cualquier ensayo funcional, las células se

incubaban durante 1 o 2 h a 37 °C en RPMI libre de suero 20 mM Hepes, para bajar la posible activación basal que puedan tener.

Las CPA son las células DCEK, que se dejan incubando con el péptido MCC a 10  $\mu$ M diluido en DMEM 10% FBS durante 16 h a 37 °C. Antes de utilizarlas se lavan con PBS para eliminar el posible péptido no unido.

Antes de la estimulación ambos tipos celulares se cuentan y se diluyen en RPMI libre de suero con 20 mM Hepes a la concentración deseada, para que quede un cociente de 1 célula presentadora por cada 10 células T.

Una vez ambos tipos celulares se ponen en contacto, al igual que en el apartado anterior, se da un pulso a 800 rpm durante 12 s, para luego incubar las células 5 min y sincronizar.

A continuación se incuban las células a 37 °C los tiempos deseados y se lisan y tratan los lisados celulares de la misma manera que se describe en el caso de la estimulación con bolas de látex. En este caso, las células que corresponderán al “tiempo cero” son células T en contacto con CPA sin MCC.

### **Inducción de la expresión de CD69/CD25 y producción de IL2 en las células T**

Las células utilizadas son células vírgenes obtenidas de ganglios linfáticos de ratones C57BL/6 (+/+, RRas2 -/- y RhoG -/-) si lo que se usa para estimular son bolas de látex recubiertas con anticuerpo, o ratones AND (+/+, RRas2 -/- y RhoG -/-) cuando el estímulo son células DCEK cargadas con MCC.

En ambos casos las células T se obtienen según el protocolo descrito previamente, y se diluyen en RPMI 10% FBS para obtener

$2,5 \times 10^5$  células en 100  $\mu$ l, cuando el estímulo son bolas de látex, o en 200  $\mu$ l cuando el estímulo son células DCEK.

En el caso del estímulo con bolas, se usan bolas con diámetros de 1, 3 y 6  $\mu$ m, recubiertas de 145-2C11 que se diluyen en RPMI 10%, para tener un cociente final de 1:10, 1:3 y 1:1 (célula:bola) respectivamente, en 100  $\mu$ l. La estimulación se hace en placa P96 (8mm) en fondo en U, para optimizar el contacto de las células con las bolas de látex.

Cuando el estímulo utilizado son CPA DCEK, éstas son plaqueadas el día anterior en una placa P96 (8mm) de fondo plano añadiendo el péptido MCC a la concentración final deseada. Antes de utilizarlas se lavan con PBS.

Las células T se dejan estimulándose durante 24 h a 37 °C (en este grupo de experimentos el tiempo 0 son células T en contacto con DCEK pero sin MCC).

Tras ese tiempo, se centrifuga y se trabaja de forma diferente con el sobrenadante y el pellet (células).

Por un lado se cuantifica la cantidad de IL2 del sobrenadante mediante el sistema de ELISA de Bender Medsystems, siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. Finalmente se detecta la cantidad de IL2 midiendo la absorbancia a 450 nm. Se calcula la concentración presente en el sobrenadante tomando como referencia una curva patrón de concentración de IL2 conocida.

Por otro lado, se tiñe el pellet según lo descrito en el apartado de tinción para citometría de flujo, utilizando una combinación de anticuerpos contra CD3/CD4/CD8/CD69/CD25 en el caso de la estimulación con bolas (analizando los niveles de los marcadores de

## Índice proliferativo en las células T

En este grupo de experimentos se extraen células vírgenes de los bazos de dos tipos de ratones:

- Ratones C57BL/6 (+/+, RRas2 -/-, RhoG -/-) para estimular las células con bolas de látex.
- AND (+/+, RRas2 -/-, RhoG -/-) para estimular con DCEK previamente cargadas con MCC a diferentes concentraciones durante 16 h a 37 °C.

Los experimentos se preparan según lo descrito en el apartado anterior (análisis de la expresión de CD69 o CD25), con la particularidad de que las células T son marcadas previamente con CFSE. El tampón que se usa para el marcaje es PBS BSA 0,1%. Inicialmente se lavan las células dos veces con este tampón, y tras el segundo lavado se dejan a una concentración de  $20 \times 10^6$  células/ml y se añaden 5  $\mu$ M de CFSE, al tiempo que se mueve la suspensión celular con un vortex.

Las células se incuban protegidas de la luz durante 5 min a 37 °C. Durante este tiempo el CFSE se introduce en las células y es procesado por la esterasas intracelulares para producir un compuesto fluorescente que se une covalentemente a las proteínas intracelulares.

La reacción se detiene añadiendo RPMI al 20 % FBS, y se lava varias veces con RPMI completo antes de contar de nuevo las células y diluirlas a la concentración deseada para ponerlas en contacto con el diferente tipo de estímulo

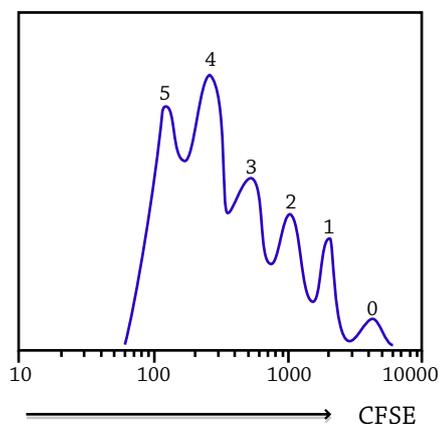
(bolas de látex o células DCEK).

Las células se dejan durante 72 h a 37 °C y tras este periodo de tiempo se recuperan y se procede con una tinción de citometría. En el caso de los ratones C57BL/6 se usa CD4/CD8, analizando los niveles de CFSE en las poblaciones CD4+ o CD8+. En el grupo de los ratones AND, la tinción es más simple dado que solo se tiñe para CD4 y es en esta población donde se comprueban los niveles del marcaje de CFSE.

### Cálculo del número de divisiones e índice proliferativo

En este tipo de experimentos, obtenemos la información del número de divisiones en forma de picos de diferentes intensidades de CFSE. Para procesar los datos analizamos el número de divisiones e índice proliferativo. Siendo el índice proliferativo el número de divisiones dividido por el porcentaje de células sin dividir.

El tiempo 0 en este tipo de experimentos son células T en contacto con DCEK sin MCC.



$$\text{Índice Prolif} = \frac{(\%0 \times 0 + \%1 \times 1 + \%2 \times 2 + \%3 \times 3 + \%4 \times 4 + \%5 \times 5)}{\%0}$$

## 2.7. Ensayo de downmodulación del TCR en células T

Las células T se obtienen directamente de los ganglios linfáticos de ratones AND (+/+, RRas2 -/-, RhoG -/-) o de ratones C57BL/6 (+/+, RRas -/-, RhoG -/-) y se diluyen a una concentración de  $2,5 \times 10^5$  células en 200  $\mu$ l de RPMI 10% FBS.

A continuación se plaquean añadiendo 200  $\mu$ l a cada pocillo de P96 (8 mm) de fondo plano donde previamente, 16 horas antes, se han puesto DCEK incubándose con MCC a diferentes concentraciones o anticuerpo 145-2C11 pegado a placa (para células AND o C57BL/6 respectivamente). En el caso de utilizar como estímulo anticuerpo soluble, se añade a la suspensión celular directamente (para células C57BL/6).

Las células se incuban a 37 °C durante los tiempos que se requiera y finalmente se recuperan las células y se tiñen para pasar por el citómetro detectando los niveles de TCR presentes en la membrana tras la estimulación.

Para saber el porcentaje de downmodulación o modulación negativa del TCR, se tienen en cuenta los niveles totales de TCR en el tiempo 0 (células T en contacto con células DCEK sin MCC a 37 °C, o células T que no han estado en contacto con el anticuerpo estimulador), y estos niveles son considerados como el 100% de TCR en membrana.

## 2.8. Ensayo de Pull-down

### Pull down con GST-ELMO en células JK estimuladas con bolas de látex

Células JK se incuban durante 1-2 h a 37

°C en RPMI libre de suero, para intentar disminuir la activación basal de este tipo de línea celular. Después se cuentan las células y se diluyen a  $35 \times 10^6$  células/ml de RPMI libre de suero 20 mM Hepes.

Se utilizan bolas de látex de 1  $\mu$ m recubiertas con OKT3, previamente lavadas, que se añaden a las células JK para tener una proporción final de célula:bola de 1:40. A cada punto se le da un pulso de 12 s a 800 rpm para sincronizar las células con las bolas de látex, y se incuban durante 5 min a 0 °C, luego se incuban a 37 °C el tiempo de estimulación deseado (5 min).

Trascurrido el tiempo, la estimulación se paraliza centrifugando a 13000 rpm y quitando el sobrenadante para añadir el tampón de lisis que contiene 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 0,5% TritonX-100, y la mezcla correspondiente de inhibidores de proteasas (1 mM PMSE, 1  $\mu$ g/ml Aprotinina, 1  $\mu$ g/ml Leupeptina, 1  $\mu$ M Benzamidina, 10mM Yodoacetamida) y fosfatasas (10 mM NaF, 1 mM NaVO<sub>3</sub>).

La lisis se realiza a 4 °C en rotación durante 10 min. Luego se centrifuga el lisado a 13000 rpm durante 15 min a 4° C. Posteriormente se recupera el sobrenadante que corresponde al lisado celular total (postnuclear). De esta suspensión se toma una alícuota para comprobar la cantidad total de proteína inicial, añadiéndole 3x del tampón de carga no reductor.

Al resto del sobrenadante se le añade BSA a 2 mg/ml y proteína GST (10  $\mu$ g/ml) unida a la matriz de glutatión-sefarosa. Se incuban en rotación durante 30 min a 4 °C.

A continuación la matriz se sedimenta y

el sobrenadante se recupera. A éste último se le añade la proteína GST-ELMO (10  $\mu\text{g/ml}$ ) unida también a la matriz de glutatión-sefarosa y se incuba de nuevo en rotación a 4 °C durante 20 min.

Trascurrido el tiempo se centrifuga y se recupera la matriz, que junto con los puntos del paso previo de incubación con GST se lavan de 3 a 5 veces con el tampón de lisis. Por último la matriz de glutatión-sefarosa se resuspende con 8  $\mu\text{l}$  del tampón de carga 3x.

Tanto los puntos del pull-down como los del lisado total se calientan durante 5 min a 90 °C. Posteriormente se centrifugan para tener todo el volumen en el fondo del tubo y se carga en geles de poliacrilamida del 12% separando así las proteínas por SDS-PAGE. Tras la transferencia de las proteínas a las membranas de nitrocelulosa se inmunodetecta con el anticuerpo específico la presencia de RhoG.

De este modo se obtiene la información de qué cantidad de RhoG está unida/activa a ELMO (en el caso de los puntos donde se ha usado GST-ELMO) y si la unión es inespecífica a GST (en los puntos donde se incuba con GST).

Tanto el bloqueo como la incubación de los anticuerpos se realizan en TBS-Tween.

El punto 0 de este experimento corresponde a células en contacto con bolas de látex pero a 0 °C continuamente.

### **Pull-down de GST-ELMO en células vírgenes CD4+ estimuladas con DCEK**

El protocolo es similar al descrito para trabajar con células JK, salvo porque las células diana son células obtenidas de los ganglios linfáticos y bazo de ratones AND (+/+, RRas2

-/-, RhoG -/-), y estimuladas con células DCEK cargadas con 10  $\mu\text{M}$  de MCC durante 16h.

Las células T ( $50 \times 10^6$  por punto de estimulación) se ponen en contacto con las DCEK (cociente 1 célula DCEK por cada 10 células T) previamente para sincronizarlas (5 min a 0 °C después de centrifugar 12 s a 800 rpm). La estimulación se realiza a 37 °C y se para centrifugando a 13000 rpm y quitando el sobrenadante para añadir rápidamente tampón de lisis.

El tampón de lisis y los pasos realizados a partir de este punto son exactamente iguales que los realizados para las células JK descritos en el apartado anterior.

### **Pull down consecutivo de GST-ELMO y GST-Raf1-RBD en linfoblastos CD4+ en presencia de LY294002**

En este grupo de experimentos las células a estimular son blastos AND CD4+, que se mantienen 1 h en RPMI libre de suero 20 mM Hepes a 37 °C, antes de proceder a su estimulación.

Luego se diluyen a  $1 \times 10^8$  células en 250  $\mu\text{l}$  de RPMI libre de suero 20 mM Hepes. Se les añade, si es necesario, 250  $\mu\text{l}$  a cada punto con 2x de la concentración del inhibidor de PI3K LY294002 (concentraciones finales utilizadas 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ ). Las células se incuban con el inhibidor 30 min a 37 °C (las células que están sin inhibidor también se dejan 30 min a 37 °C). El inhibidor se mantiene durante todo el proceso de estimulación.

Trascurrido los 30 min, se añade el estímulo, que en este caso son bolas de látex de 1  $\mu\text{m}$  recubiertas con 145-2C11 a un cociente de 1 célula: 20 bolas. Se realiza un paso previo de sincronización y luego se incuban 5 min a 37

°C, seguido de una centrifugación y lisis celular como en los casos anteriores.

Una vez se tiene listo el lisado total se procede con el primer pull-down con GST (10 µg/ml) como en los apartados anteriores y luego con GST-ELMO (10 µg/ml). Transcurrido el tiempo y recuperada la matriz de GST-ELMO glutatión-sefarosa, se vuelve a poner el sobrenadante restante 20 min con GST-Raf1-RBD (10 µg/ml) unido también a la matriz glutatión-sefarosa.

Cumplido el tiempo, la matriz se sedimenta y se lava con el tampón de lisis y se procesa igual que los puntos de GST o GST-ELMO, separando las proteínas por SDS-PAGE como ya se ha descrito con anterioridad.

Así, tras la detección con los anticuerpos específicos, anti RhoG para el pull-down con GST-ELMO y anti TC21 para el realizado con GST-Raf1-RBD, podemos saber el estado de activación de ambas proteínas en el mismo experimento.

En este caso el punto 0 son células con la misma cantidad de bolas pero siempre a 0 °C.

## 2.9. Microscopía Electrónica

### Internalización de bolas de látex en células JK

Se ponen en contacto  $20 \times 10^6$  células JK con bolas de látex de 1 µm recubiertas con OKT3 durante diferentes tiempos (5, 15, 30 y 60 min) teniendo un cociente final de 1:50 célula:bola.

Tras la estimulación correspondiente, el pellet de células con las bolas se fija con paraformaldehído al 4% en 0,1 M de tampón fosfato (pH 7,4) durante 1,5 h a temperatura ambiente

y luego durante 16 h con paraformaldehído al 8% a 4 °C.

Una vez las células están fijadas se lavan y se embeben en 10% de gelatina en PBS. A continuación cubos de gelatina de aproximadamente  $0,5-1 \text{ mm}^3$  se crioprotegen con 15% de glicerol durante 15 min, y luego con otros 15 min adicionales con 30% de glicerol antes de ser sumergidos en propano líquido e inmediatamente transferidos a un sistema de congelación por sustitución (Freeze-Substitution System, AFS, Leica).

La sustitución es realizada a -85 °C en metanol conteniendo 0,5% de acetato de uranilo durante 54 h. Después de alcanzar la temperatura de -45 °C (la velocidad es de 5 °C/h) se lavan las muestras con metanol puro y posteriormente son infiltradas con la resina Lowicryl HM20 y polimerizadas con luz UV a -45 °C durante 2 días.

Se cortan secciones ultrafinas de esta resina polimerizada (Reichert-Jung E ultramicrotome). Las muestras se analizaron a 80 Hv con el microscopio electrónico JEM 1010.

### Sinapsis inmunológica

Para visualizar la parte interna de la membrana, correspondiente a la formación de la SI (en contacto con una superficie recubierta con puntos de anti-CD3 rodeados de ICAM-1), se preparan las muestras acorde con lo descrito en (Doh and Irvine, 2006.).

### 2.10. Unión de anticuerpo a bolas de látex (1, 3 y 6 µm)

Las bolas de látex, independientemente de su tamaño y del tipo de fluorescencia que

presenten, son bolas hechas de poliestireno cuya superficie presenta grupos sulfato a los que se les ha añadido polímeros conteniendo grupos carboxílicos. El resultado son microesferas con una superficie altamente cargada y relativamente hidrofílica.

Debido a sus características, se les pueden unir covalentemente proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas. Para la unión covalente se requiere un proceso mediado por carbodiimida, donde dicho agente activa los grupos carboxílicos de la superficie de la bola de látex.

Para llevar a cabo la unión covalente en todos los tipos de bolas utilizados a lo largo de este trabajo, se ha usado un kit comercial de Polysciences, Inc (Carbodiimide Kit for Carboxylated Microparticles), siguiendo específicamente las instrucciones de la casa comercial, y añadiendo 300 µg/ml de anticuerpo para unir.

La eficiencia de unión se determinaba en cada caso midiendo la cantidad de proteína residual presente en el sobrenadante descartado de las bolas.

### 2.11. Ensayos cuantitativos de fagocitosis (citometría de flujo)

El objetivo de estos ensayos es cuantificar la entrada de bolas de látex recubiertas por

anticuerpo ya visualizada por microscopía óptica y confocal y por microscopía electrónica.

### Ensayos con bolas no marcadas fluorescentemente

Las células que se van a utilizar (tanto células JK como células primarias de ratón) se incuban 1 h a 37 °C en RPMI 10% FBS 20 mM Hepes y 0,2% BSA. Se resuspenden en RPMI 10% FBS 20 mM Hepes 0,2% BSA para tener  $2,5 \times 10^5$  células en 50 µl. Se reparten los puntos necesarios en pocillos de P96 (8 mm) en fondo en V, para optimizar así el contacto con las bolas de látex.

Las bolas recubiertas con el anticuerpo de interés se lavan con PBS y se incuban durante 30 min en PBS con BSA 1% a temperatura ambiente. Se diluyen también en el mismo medio que las células, poniendo el número necesario de bolas en 50 µl (volumen que se añade por pocillo) para tener un cociente final de 1:50 (célula:bola).

Las bolas se van añadiendo a los pocillos y siempre se da un pulso de 2 min a 1250 rpm inmediatamente después de añadirlas. Luego se incuban el tiempo que requiera el experimento a 37 °C.

La estimulación se para poniendo la placa a 0° C. Se centrifuga 2 min a 1250 rpm y se lava 2 veces con PBS BSA 1%.

A continuación se hace un lavado ácido

**Tabla 8. Lista de bolas de látex.**

NOMBRE	ORIGEN	TAMAÑO	EXT/EMS
Polybead Carboxylate Microspheres	Polyscience, Inc.	1 µm	--
FluoroSpheres® Carboxylate-modified microspheres, crimson fluorescent	Molecular Probes	1 µm	625/645
Fluoresbrite® Carboxylate Microspheres.	Polyscience, Inc.	3 µm	529/546
Fluoresbrite® Carboxylate Microspheres.	Polyscience, Inc.	6 µm	529/546

(150 mM glicina pH 2,7, 50 mM NaCl) durante 2 min a 0 ° C y se centrifuga 2 min a 1250 rpm. Posteriormente se lava dos veces con PBS BSA 1%. (con el lavado ácido hemos eliminado el anticuerpo pegado a las bolas que estaban fuera de las células y por lo tanto expuestas al pH ácido).

Se procede con un paso de fijación con paraformaldehído 2% durante 10 min y posteriormente un lavado con PBS BSA 1% y a continuación se permeabilizan las células con PBS BSA 1% Saponina 0,1% durante 10 min a 0 ° C.

Por último, se realiza la tinción con anticuerpo marcado contra el tipo de inmunoglobulina (Ig) que sea el anticuerpo pegado a la bola utilizada (si es necesario se tiñe para otros marcadores de superficie de membrana, como por ejemplo CD4 o CD8).

Las células se pasan por el citómetro y se cuantifica la señal que tenemos de fluorescencia, indicándonos la cantidad de bolas internalizadas.

### **Ensayos con bolas de látex marcadas fluorescentemente (1 $\mu\text{m}$ , 3 $\mu\text{m}$ y 6 $\mu\text{m}$ )**

En este caso, el protocolo es exactamente igual que el anterior en lo que se refiere al procedimiento inicial, poniendo normalmente cocientes de 1:50, 1:3 y 1:1 de célula:bola de 1, 3 y 6  $\mu\text{m}$  respectivamente en el caso de las células JK, en el caso de las células vírgenes de ratón, los experimentos se han hecho únicamente con bolas de 1  $\mu\text{m}$  a un cociente de 1:20.

En este caso, tras transcurrir el tiempo necesario para permitir la entrada de las bolas de látex, las células se lavan y se procede directamente a la tinción con el anticuerpo secundario marcado contra el tipo de Ig usado para unir a

la bola (ej: bolas OKT3 secundario anti ratón, bolas 145-2C11 secundario anti hámster).

Al usar bolas de látex marcadas previamente, no es necesario el proceso de lavado ácido, ya que la información de dentro/fuera se obtiene ahora si la célula presenta solo tinción simple de la bola (lo que significa que está totalmente interna y que no está accesible al anticuerpo secundario) o si tiene la doble tinción bola/anticuerpo secundario, lo que significa que o bien las células tienen solo bolas en la membrana (totalmente accesibles al anticuerpo) o dentro y fuera.

Para probar que realmente lo que detectamos con esta técnica es la entrada de bolas con el tiempo, se realizó también una variante de este grupo de experimentos, con el método de “pulso y caza”, donde todo el protocolo es exactamente igual, pero inicialmente, todas las células se incuban 1 h a 0 ° C con las bolas de látex en el cociente determinado y posteriormente se lavan para eliminar las bolas no unidas.

Con esta sincronización previa lo que se pretende es que se una la mayor cantidad de bolas a la membrana celular y que no haya luego bolas libres que puedan comenzar el proceso desde un punto inicial de unión. Así una célula que a tiempos cortos debe ser principalmente doble positiva para la tinción, con el tiempo (las bolas se van internalizando) se debe convertir en simple positiva para la fluorescencia de las bolas.

Posteriormente las células se incuban a 37 ° C diferentes tiempos para permitir la internalización y finalmente se tiñe como se ha indicado anteriormente.

En el caso de que se requiera un pretra-

tamiento con algún inhibidor, las células se incuban con éste durante 30 min antes de poner en contacto con las bolas y luego se mantiene durante el experimento.

## 2.12. Ensayos de Trogocitosis

Este tipo de ensayos son conocidos por el acrónimo TRAP (“T cell recognition of APCs by proteína capture”). Su objetivo es la cuantificación del material procedente de la célula presentadora internalizado por parte de la célula T.

Una limitación importante es que incluso en ausencia de antígeno, los linfocitos pueden adquirir componentes de la membrana de la célula presentadora, aunque esta incorporación es muy inferior a la que tiene lugar cuando hay un antígeno específico. Por ello es siempre necesario incluir como control negativo células T en contacto con CPA sin antígeno, que será considerado como “tiempo 0” o como nivel basal de trogocitosis.

El proceso se puede seguir de diferentes maneras en función del componente analizado: incorporación de lípidos de la membrana de la célula presentadora o incorporación de proteínas del complejo CPH fusionadas a GFP. Para este último caso, la herramienta utilizada es la proteína I-E<sup>k</sup>-GFP del complejo CPH-II (para trabajar con el sistema de células CD4+ AND).

### Preparación de las células presentadoras

#### *Marcaje de las CPA con PKH26:*

Las CPA son DCEK cargadas durante 16 h con la concentración/es de MCC correspondientes. Se levantan usando EDTA y se lavan

varias veces con medio sin suero (las cantidades de la tinción están establecidas teniendo en cuenta  $20 \times 10^6$  células por punto de tinción).

Finalmente se centrifuga y el pellet de las células se deja prácticamente sin líquido residual del medio y se resuspende en 0,5 ml de Diluyente C en un tubo falcon de 50 ml (nunca usando el vortex, sino resuspendiendo y consiguiendo una suspensión celular con la pipeta).

Se prepara 0,5 ml de Diluyente C con 8  $\mu$ M de PKH26 y se añade a la suspensión celular a la vez que el tubo está agitándose en el vortex, para permitir la tinción homogénea en todas las células.

Se incuba a temperatura ambiente durante 2-5 min (se invierte el tubo periódicamente). La tinción se para añadiendo el mismo volumen de suero (1 ml), e incubando 1 min a temperatura ambiente. A continuación se diluye la solución de parada con el mismo volumen de medio completo y se centrifugan las células. El pellet se transfiere a otro tubo nuevo después de filtrarlo para quitar posibles precipitados de PKH26.

Se lava varias veces con medio completo y finalmente se diluyen las células en medio RPMI 10% FBS para dejarlas a la concentración requerida para el experimento.

#### *Transfección de las células DCEK con I-E<sup>k</sup>GFP*

Las células DCEK se transfectan con el sistema de lipofectamida descrito ya con anterioridad (Materiales y Métodos 2.2), y teniendo en cuenta siempre el tiempo requerido para la correcta expresión de la proteína fusionada a GFP, el protocolo es:

- Día 1: Plaqueamos las células en placas

P6 (35 mm)

- Día 2: Transfectamos las células con I-E<sup>k</sup>GFP.
- Día 3: Incubamos las células con MCC.
- Día 4: Se levantan las células con EDTA para usarlas en el experimento de trogocitosis diluyéndolas en RPMI 10% FBS a la concentración deseada.

### **Cocultivo de ambos tipos celulares (Célula presentadora-célula T efectora)**

En ambos casos (marcaje con PKH26 o transfección de I-E<sup>k</sup>GFP) las células se reparan en pocillo de P96 (8 mm) de fondo en V para mejorar el contacto con las células T efectoras.

Las células T que se van a usar como efectoras, son células vírgenes obtenidas de ganglios linfáticos de ratones AND (+/+, RRas2 -/-, RhoG -/-). Las células se diluyen en RPMI 10% FBS a la concentración deseada.

Células T y CPA se ponen en contacto (se centrifugan durante 30 s a 800 rpm) y se incuban a 37 °C durante el tiempo requerido por el experimento.

Transcurrido el tiempo se centrifugan y se lavan usando PBS 2 mM EDTA para disgregar los dobletes formados por ambos tipos celulares. A continuación se procede con lavados normales con PBS BSA 1% y con el proceso normal de tinción para citometría (Materiales y Métodos 2.5), siempre teniendo en cuenta qué canal del citómetro se encuentra ocupado según la señal que se va a seguir para ver el proceso trogocítico (FL1 para GFP o FL2 para PKH26).

Se marca con los anticuerpos CD4/Vβ3/CD69, analizando luego en la población CD4+

los niveles de PKH26 o GFP según el caso y los niveles de Vβ3 para seguir también el proceso de modulación negativa que sufre el TCR.

Además de la incorporación directa desde la célula presentadora, se puede analizar y cuantificar la posible reexpresión de las moléculas de CPH-II adquiridas por la célula T en su membrana, gracias a que las células T transgénicas AND utilizadas son negativas para I-E<sup>k</sup>.

Para ello, tras realizar todo el protocolo anterior, se añade en la mezcla de anticuerpos uno contra I-E<sup>k</sup>, lo que permite ver esta proteína expresada en la membrana de las células T (ya que en ningún momento hemos permeabilizado). El análisis se haría en la población CD4+.

### **2.13. Ensayo de presentación por parte de las células T**

Se obtienen células dendríticas que expresan I-E<sup>k</sup> a partir de médula ósea de ratones B10.BR (Materiales y Métodos 2.1) y se plaquean en pocillos de 35 mm de placas P6, incubándolas durante 16 h con las diferentes concentraciones de MCC.

Se obtienen células vírgenes de ganglios linfáticos de ratones AND (+/+, RRas -/-, RhoG -/-), que son negativas para I-E<sup>k</sup>. Estas células se ponen en contacto con las células dendríticas en los pocillos de P6, añadiendo aproximadamente 10x10<sup>6</sup> células T por pocillo. Se da un pulso a 800 rpm durante 12 s y se incuban las células durante 2 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo, las células T se recogen usando EDTA al 0,02% para separar los posibles conjugados entre células T y CPA.

A continuación se procede a purificar las

células T eliminando las células contaminantes con una mezcla de anticuerpos biotinilados (CD11b, CD11c, B220 y CD8) y con bolas magnéticas (Dynabeads) recubiertas con estreptavidina (el procedimiento es el mismo que el explicado en Materiales y Métodos 2.1).

La pureza y con ello el porcentaje de contaminación es analizado pasando alícuotas de cada punto del proceso de purificación por el citómetro, tiñendo con los siguientes anticuerpos: estreptavidina, CD4 y V $\beta$ 3.

Una vez se tienen las células T que han sido expuestas a las CPA, se cuentan y se diluyen a diferentes concentraciones en placas P96 (8 mm) de fondo en U.

Por otro lado se obtienen células T de los ganglios linfáticos de un ratón AND (+/+). Las células se marcan con CFSE (Materiales y Métodos 2.6) y se diluyen para tener  $1,4 \times 10^5$  por pocillo de P96. Son estas células las que se usan como respondedoras ante las células T expuestas a las células dendríticas previamente purificadas. Se mide su índice de proliferación 96 h después.

Para el análisis de la capacidad presentadora de las células T, hay que tener en cuenta la posible estimulación causada por células dendríticas contaminantes. Para ello, paralelamente a esta estimulación, se ponen células dendríticas cargadas con péptido a diferentes diluciones de células en contacto directo con las células CFSE positivas respondedoras (se hace una curva de número de células dendríticas presentadoras de  $1,4 \times 10^5$  hasta 50 por pocillo).

Conociendo la contaminación de dendríticas en cada punto del experimento, se puede saber, teniendo en cuenta la estimulación ob-

tenida con la curva patrón de las células dendríticas, qué nivel de estimulación es debido a las células dendríticas residuales.

Como controles en este experimento se tiene células T expuestas a células dendríticas sin MCC que se utilizan para estimular a las células T marcadas con CFSE, y puntos donde las células CFSE+ se ponen sin CPA.

Una variación de este experimento, es la realización de una dilución límite para intentar tener 1 célula presentadora (célula dendrítica o célula T expuesta a una célula dendrítica durante 2 h) por pocillo y ver su capacidad presentadora en relación a la activación que causa sobre células T respondedoras.

En este caso ambos tipos de CPA (células dendríticas y células T que han estado expuestas durante 2 h a las CPA) se plaquean en pocillos de 8 mm en U para tener 0,3, 1, y 3 células por pocillo teóricamente.

Cada condición de número se pone en 24 pocillos (réplicas).

Como células respondedoras se ponen células T AND marcadas con CFSE ( $1,4 \times 10^5$  por pocillo). A los 7 días se analiza por citometría de flujo, en la población CD4+, los niveles de CFSE, la expresión en membrana de CD25 y la adquisición de forma blástica.

Lo primero que se hace es contar en cuántos pocillos hay respuesta por las células T respondedoras. En aquellos pocillos donde no hay respuesta consideramos que no había célula presentadora.

Para saber si realmente estamos próximos a una condición en la que sólo tengamos una CPA por pocillo, consideramos el número de pocillos sin respuesta y aplicamos la distribución de Poisson. Donde P es la probabilidad

de que un número  $x$  de CPA sea encontrado en un pocillo cuando una media de células  $m$  se ha puesto en el pocillo.

Si consideramos que se ha puesto 1 CPA de media por cada pocillo ( $m=1$ ), la probabilidad de encontrar 0 células ( $x=0$ ) es:

$$p\mu(x) = \mu^x / x! \cdot e^{-\mu}$$

Según esto el 37% de los pocillos debe mostrar ausencia de respuesta para indicar que tenemos 1 célula por pocillo.

En el experimento la distribución de pocillos sin respuesta fue de 79,2% y 58,4% para células dendríticas y 87,5% y 58,4% para células T como CPA, plaqueadas teóricamente con una media de 0,3 y 1 célula por pocillo.

Consideramos que en estas condiciones la mayoría de los pocillos con células (que

muestran respuesta) contienen solo una célula presentadora.

Así, en los pocillos con respuesta, se calculó por citometría de flujo usando bolas de conteo (Invitrogen) el número de células respondedoras a partir del porcentaje de células vivas, con forma blástica y que fuesen positivas para CD25.

#### 2.14. Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico de los resultados, se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney bilateral para calcular los intervalos de confianza, usando el software Graph PathPrism. Cada valor representa la media y la desviación estándar de al menos tres conjuntos de datos. \* $P < 0.05$ , y \*\* $P < 0.005$  (test de Mann-Whitney bilateral).



# Resultados



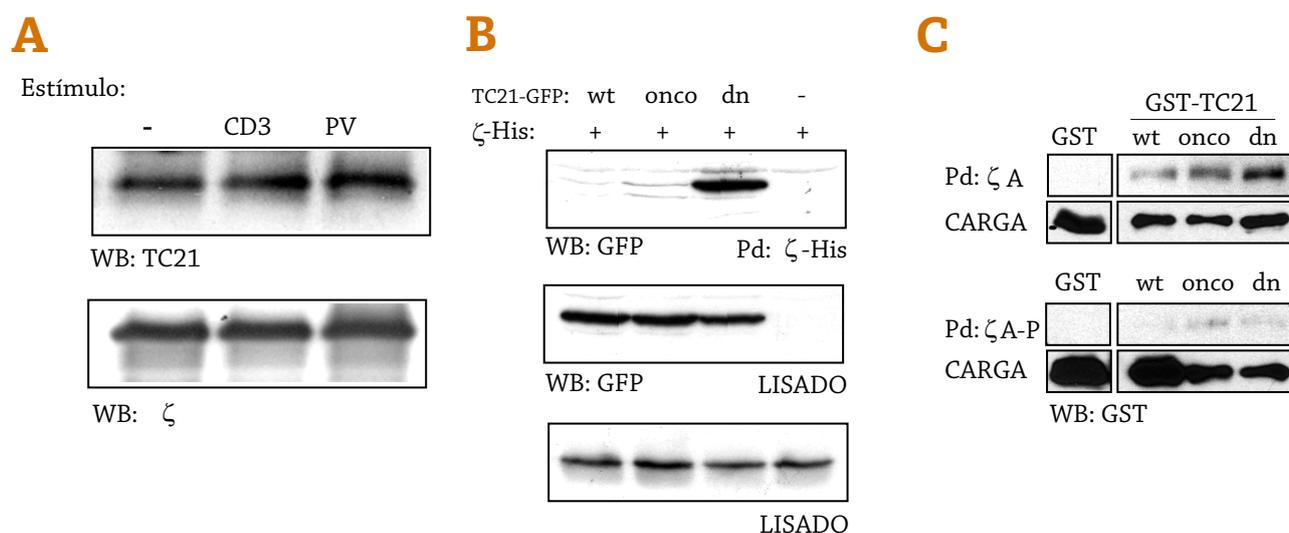
## 1. El TCR es internalizado desde la sinapsis por un proceso dependiente de TC21 y RhoG.

TC21 es una pequeña GTPasa codificada por el gen *RRas2*. Hasta el momento son pocos los trabajos que analizan la función de esta proteína en el contexto de las células T. De hecho, el trabajo realizado por Delgado, P. y colaboradores (Delgado et al., 2009) ha constituido el inicio del estudio de esta molécula bajo el control del receptor de las células T (TCR).

En dicho trabajo se describió de forma

detallada la unión de TC21 al TCR de manera constitutiva, es decir independiente del estado de activación del linfocito T (Fig. R1 A). La proteína presenta capacidad de unión a todas las subunidades señalizadoras del TCR. Mediante estudios de precipitación en células COS transfectadas con diferentes construcciones, se determinó que la forma dominante negativa es la que se une con mayor intensidad a la cadena

91



**Fig. R1**

### TC21 se une al TCR preferentemente en su forma inactiva a través del ITAM no fosforilado

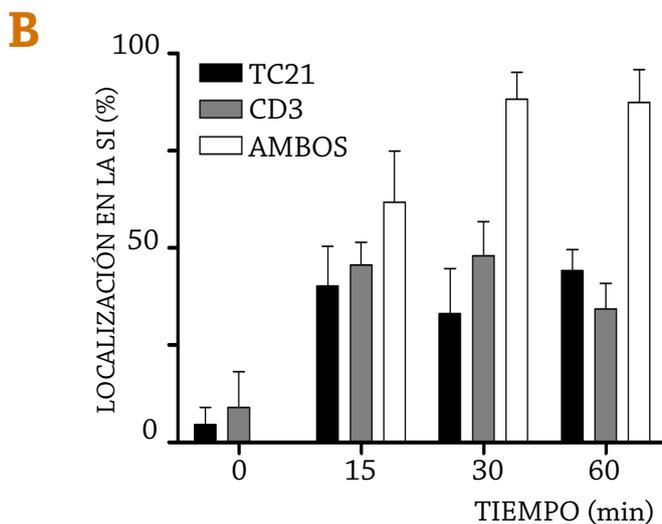
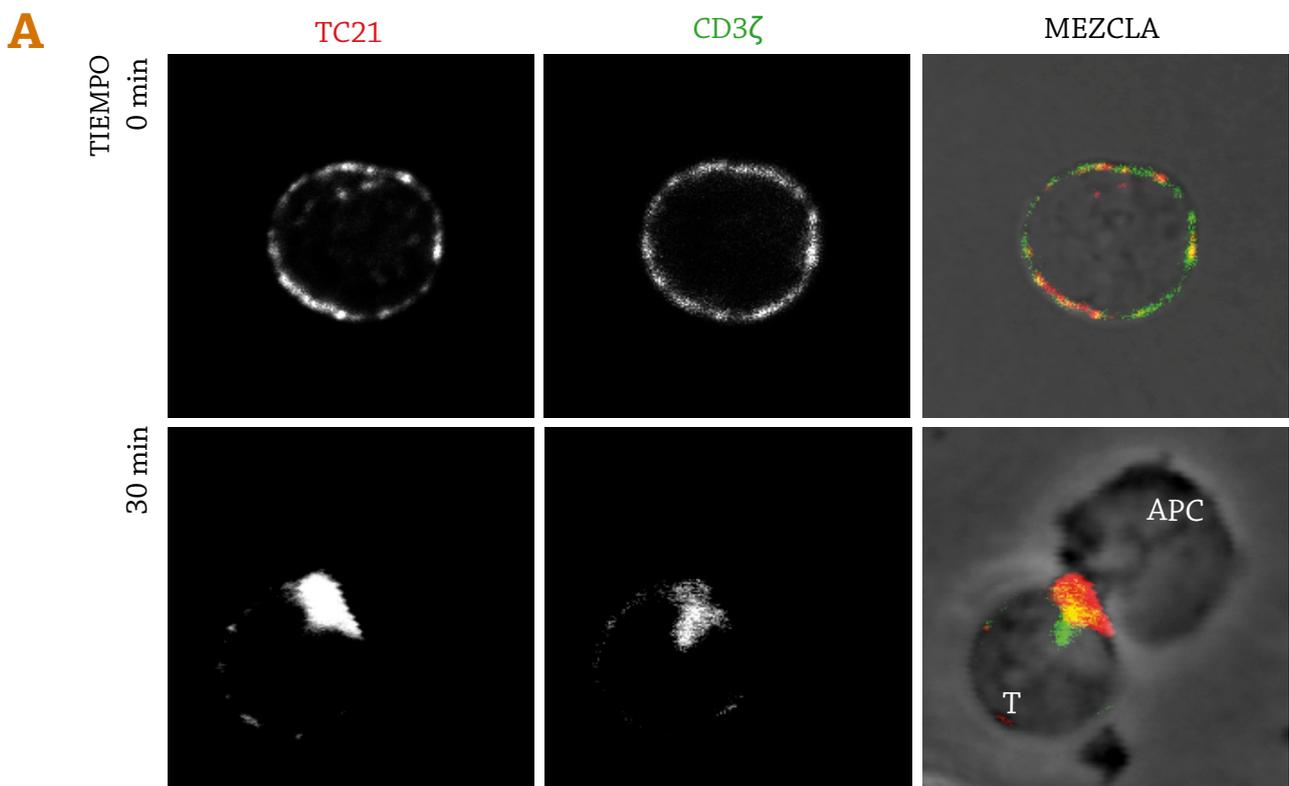
- A** **TC21 se une constitutivamente al TCR.** Células 2B4 que expresan establemente CD3ζ fusionado a histidina, se usaron para precipitar el TCR mediante el sistema NI-NTA (purificación basada en la unión a colas de histidina). Las células fueron estimuladas con anticuerpo anti-CD3 (145-2C11) o con pervanadato (PV), y se inmunodetectaron los niveles de TC21 unidos usando un anticuerpo anti-TC21.
- B** **La forma dominante negativa (dn) de TC21 se une mejor a CD3ζ.** Lisados de células COS doblemente transfectadas con ζ-HIS y con las diferentes formas de TC21-GFP (silvestre, wt, dominante negativa, dn, y constitutivamente activa, onco) fueron sometidos a una precipitación de CD3ζ usando el sistema NI-NTA. Se detectaron los niveles de TC21-GFP unido por western-blot, usando un anticuerpo anti-GFP.
- C** **La forma dominante negativa de TC21 se une preferentemente a la forma no fosforilada del ITAM A de CD3ζ.** Incubación de péptidos sintéticos correspondientes al ITAM A de CD3ζ en estado fosforilado o no fosforilado, con las diferentes formas de GST-TC21 (wt o mutantes). Se muestra el resultado de la precipitación con bolas recubiertas de estreptavidina. (Delgado et al., 2009)

CD3 $\zeta$  del TCR (Fig. R1 B), y no solo eso, sino que haciendo estudios con péptidos sintéticos que correspondían a la secuencia ITAM A de CD3 $\zeta$ , se comprobó que la unión del dominante negativo es mayor cuando el ITAM está en la forma no fosforilada (Fig. R1 C). También se demostró que TC21 interactúa constitutivamente con el BCR.

Finalmente se propuso, que TC21 es el

nexo de unión entre los dos tipos de receptores (TCR y BCR) y la proteína PI3K, la cual tiene un papel esencial en supervivencia.

Teniendo en cuenta la reorganización que el TCR sufre tras el contacto de la célula T con la CPA, surgió la necesidad de estudiar qué ocurre con TC21 y el TCR en el momento de la formación de la SI. Para ello se estimularon células T primarias transgénicas OT1 con



**Fig. R2** TC21 y el TCR se relocalizan en la sinapsis inmunológica con cinéticas similares

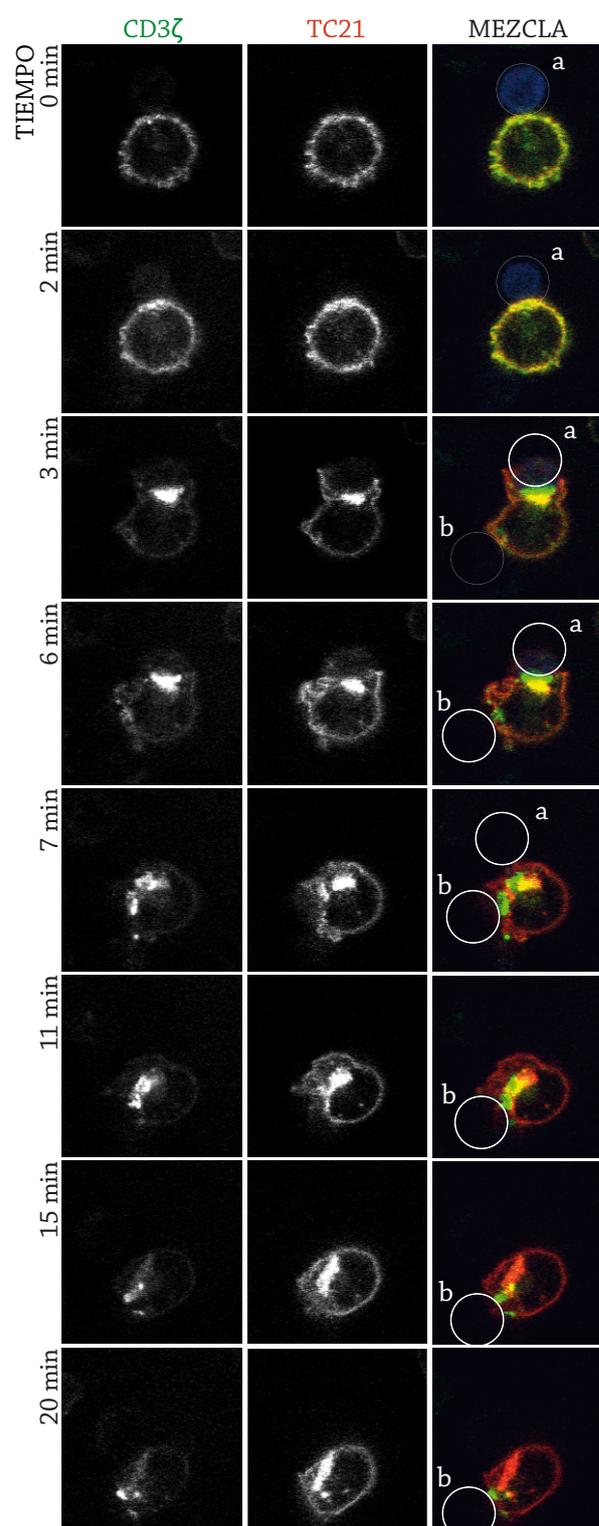
**A** Células T de bazo de ratón OT1, se estimularon con células de bazo C57B2/6 cargadas con OVAp y se prepararon conjugados para inmunofluorescencia. Se tiñó con los anticuerpos anti TC21 y anti CD3 (500A2). El tiempo de estimulación fue 30 min.

**B** Cuantificación de la acumulación de ambas proteínas en la SI con el tiempo, en 50 conjugados por punto.

células presentadoras cargadas con el OVAp. Las células se prepararon para detectar por inmunofluorescencia la localización del TCR y de TC21 endógenos (Fig. R2 A). Se pudo observar que ambas proteínas se acumularon en la SI, colocalizando. Se cuantificaron varias docenas de conjugados incubados diferentes tiempos y se pudo determinar que las cinéticas de relocalización de ambas proteínas eran similares y dependientes del estímulo a través del TCR (Fig. R2 B).

### 1.1. El TCR se internaliza desde la sinapsis por un proceso TC21 dependiente

Para seguir la dinámica de TC21 respecto al TCR en el momento de la formación de la SI, se transfectaron células JK con TC21 y CD3 $\zeta$ , fusionadas ambas moléculas a proteínas de fusión diferentes (CFP y YFP respectivamente). Estas células se usaron para hacer vídeo-microscopía (microscopía en células vivas) estimulándolas con células presentadoras Raji cargadas durante 20 min con SEE (Staphylococcal enterotoxina E). Como muestra la Fig. R3 (Vídeo 1), a los 2 min de interaccionar, ambas proteínas estaban concentradas y colocalizando en la sinapsis inmunológica (célula T y célula CPA "a"), apreciándose la distribución más interna de ambas proteínas, con respecto a la SI, en los minutos posteriores (3 y 6). En el minuto 7 la internalización ya fue completa, pudiendo encontrar vesículas doble positivas. Sin embargo, en este punto podemos apreciar que se formó una nueva sinapsis (célula CPA "b"), hacia la que se dirigieron las vesículas que contenían ambas proteínas (vesículas doble positivas para CD3 $\zeta$  y TC21) o, al menos una de ellas (CD3 $\zeta$  o TC21).



**Fig. R3**

**TC21 se co-internaliza junto con el TCR desde la SI**

Células JK transfectadas con las proteínas de fusión TC21-CFP (representada en rojo) y CD3 $\zeta$ -YFP (verde) son estimuladas con células Raji cargadas con SEE. Se captó la señal para cada fluorocromo de manera secuencial durante 20 min. En la figura están mostrados solo algunos de los tiempos seleccionados (Vídeo 1). Las dos células CPA que interaccionan con la célula T están indicadas como a y b por orden de contacto.

A los 20 min de haberse iniciado el proceso, el TCR estaba reexpresado en la membrana, en el punto de contacto de la nueva célula presentadora, mientras que TC21 permaneció en vesículas internas.

Estos resultados muestran que TC21 y TCR siguen una misma ruta de internalización desde la SI, llegando incluso a intuirse que TC21 podría estar implicado en la relocalización del TCR en otro punto de la membrana, para formar una nueva SI.

Basándonos en esta última conclusión, se quiso demostrar que TC21 podría realmente tener una función en la internalización del TCR desde la SI. Para ello se realizó de nuevo este tipo de experimentos, pero haciendo uso de dos formas mutantes de TC21:

- TC21 S28N: Una forma dominante negativa de TC21, que al presentar una afinidad mayor por GDP constituye una forma inactiva incapaz de interactuar con sus efectores. Se comporta, además, como un dominante negativo, ya que bloquea la activación de las GTPasas endógenas al competir con ellas por los GEF, a los que secuestra formando complejos inactivos.

- G23V: Una forma constitutivamente activa, cuya mutación bloquea la capacidad de hidrolizar el GTP unido, tanto la intrínseca como la inducida por GAP.

En ambos casos, las proteínas están fusionadas a fluorocromos, que permiten el seguimiento de su relocalización en el tiempo tras el estímulo de la célula T.

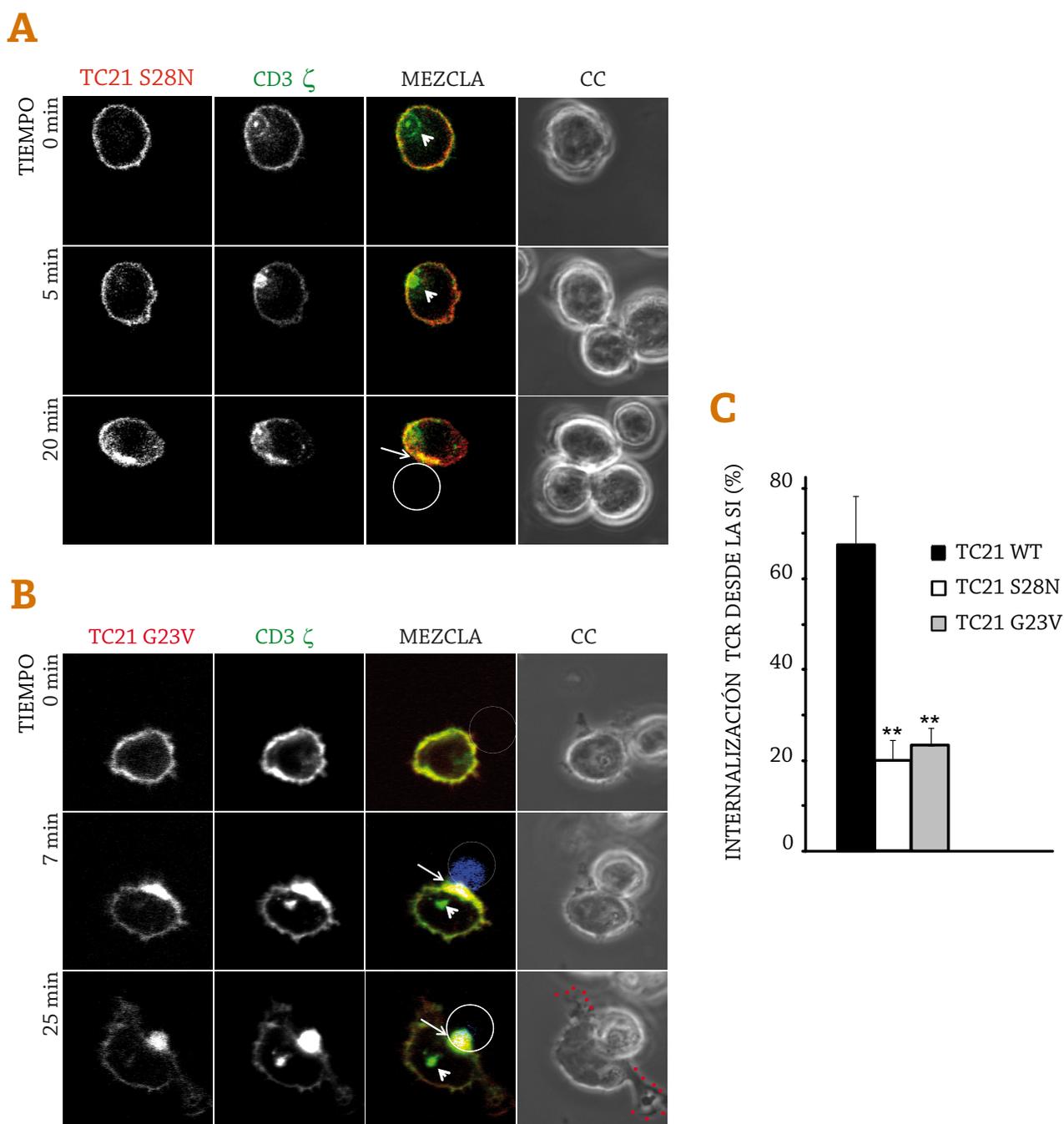
En el caso de la forma TC21 S28N (Fig. R4 A, vídeo 2) se pudo ver que tanto la relocalización de ambas proteínas como la progresión y formación de la SI ocurrieron normalmente,

mientras que la internalización y formación de vesículas doble o simple positivas para estas dos proteínas estuvo bloqueada. Ello indica que TC21 está implicado en la internalización del TCR pero no en la formación de la SI.

Por otro lado, los resultados obtenidos con la forma G23V no hicieron más que confirmar que esta pequeña GTPasa y su ciclo de activación/inactivación (GTP/GDP) es importante para el proceso de internalización del TCR, ya que como se puede observar en la Fig. R4 B (vídeo 3), la sinapsis se formó y progresó en los minutos iniciales de forma normal, pero no se dio una internalización del complejo formado de las 2 proteínas, que se acumularon en la zona de la interfase. Esta concentración de proteína en la región de contacto se mantuvo durante mucho tiempo. Aparecieron vesículas procedentes de la SI pero solo positivas para TCR, indicando que seguramente son vesículas que se internalizaron independientemente del proceso mediado por TC21.

El efecto de ambas formas mutantes de TC21 sobre la internalización del TCR, se cuantificó analizando el proceso en 10-15 conjugados de cada combinación, grabados por vídeo-microscopía (Fig. R4 C). Así, en base a la cuantificación realizada, se pudo concluir que la GTPasa TC21, está bajo el control de la internalización del TCR desde la SI.

Un aspecto importante que también se pudo concluir de los experimentos realizados con la forma G23V, es que en muchos de los conjugados realizados, a tiempos largos, la célula T, desarrolló una serie de lamelipodios y extensiones de membrana en la zona próxima al contacto con la CPA (Fig. R4 B, tiempo 20 min, línea discontinua roja), indicando que

**Fig. R4****El TCR es internalizado desde la SI por un proceso dependiente de TC21**

**A/B** (A) Formas dominante negativa (S28N) y (B) constitutivamente activa (G23V) de TC21 bloquean la internalización del TCR desde la SI. Células JK transfectadas con CD3 $\zeta$ -YFP y la forma mutante de TC21 S28N CFP (vídeo 2) y con CD3 $\zeta$ -GFP y la forma mutante de TC21 G23V Dsred (vídeo 3) fueron estimuladas con Raji cargadas con SEE. Las flechas en A y B indican la acumulación de ambas proteínas en la SI. La cabeza de flecha en A un acúmulo de CD3 $\zeta$  preexistente en el citoplasma de la células y en B parte del TCR internalizado desde la sinapsis por un proceso TC21 independiente, ya que no presenta colocalización con dicha GTPasa. La línea discontinua en el panel B indica las expansiones de membrana que causa la forma G23V de TC21.

**C** Cuantificación del efecto de las diferentes formas mutantes de TC21, analizando la aparición de vesículas procedentes de la SI, tras el contacto de la célula T con la CPA. Se cuantificaron de 10 a 15 conjugados de cada combinación, grabados por vídeo-microscopía. Los valores que se representan son la media y desviación típica de datos procedentes de 3 experimentos diferentes. (\*\*) $p < 0,005$ . Test de Mann-Whitney bidireccional).

TC21 debe estar controlando de alguna manera la remodelación del citoesqueleto de actina en la célula T.

## 1.2. EL proceso de internalización del TCR mediado por TC21 es un proceso de internalización independiente de clatrina pero dependiente de RhoG

### **TCR es internalizado por un proceso dependiente de TC21 pero independiente de clatrina.**

Como se ha descrito en detalle previamente (Introducción 6.2), numerosos trabajos han demostrado la existencia de dos rutas que puede seguir el TCR para su internalización. Una es dependiente de clatrina y es la que siguen los TCR no contactados por el antígeno. La otra es la que siguen los TCR contactados por el antígeno y pese a que se describe como clatrina independiente (Monjas et al., 2004), aún quedan muchas incógnitas relativas a la ruta molecular que la controla.

Ante la existencia de estas dos rutas descritas, se quiso determinar si la internalización del TCR dependiente de TC21 era mediada por clatrina o no. Para ello se prepararon muestras fijadas de células JK transfectadas con las proteínas de fusión de TC21 y CD3 $\zeta$ , y estimuladas con Raji cargadas con SEE. Se analizó la relación de las vesículas doble positivas para CD3 $\zeta$  y TC21 con transferrina marcada con AlexaFluor-633, añadida directamente al medio 10 minutos antes de fijar las células. Se ha demostrado que la transferrina, tras unirse a su receptor específico, es internalizado rápidamente por un proceso mediado por clatrina. Se vio claramente, que las vesículas doble posi-

vas para TC21 y CD3 $\zeta$  no colocalizaban en ningún momento con las vesículas que contenían transferrina (Fig. R5 A). Además se tiñeron los conjugados con un anticuerpo para la cadena pesada de clatrina, viendo que las vesículas de interés carecieron también de esta proteína (Fig. R5 A). Estos resultados demuestran la independencia de clatrina del proceso de internalización del TCR donde TC21 está implicado.

Ante los resultados que mostraban la ausencia de clatrina en las vesículas procedentes de la SI donde TC21 estaba presente, se planteó cómo podría estar la clatrina distribuida en la estructura supramolecular de la SI madura. Para ello, y en colaboración con el laboratorio de Andrey Shaw (Department of Pathology and Immunology, Washinton University School of Medicine, Saint Louis, USA) se usó como alternativa a la estimulación con células presentadoras, una superficie diseñada con diferentes ligandos proteicos que se conoce como superficie de array de sinapsis inmunológicas (Fig. R5 B). Esta superficie artificial tiene zonas recubiertas de moléculas de adhesión y puntos concretos de activación recubiertos de anticuerpo anti-CD3 (Doh and Irvine, 2006) y permite a la célula T migrar, adquirir su forma polarizada y unirse al punto de activación y formar una SI madura, con todos los acontecimientos celulares que eso conlleva.

El punto de activación muestra una estructura de SI madura, formada por una estructura concéntrica en la que el anticuerpo anti-TCR está rodeado de moléculas de adhesión (ICAM-I). Está demostrado que esta estructura fuerza la formación y estructuración de una SI madura.

Células CD4+, una vez depositadas sobre

esta superficie, contactaron con los sitios de activación formando una SI madura. A continuación se procesaron las muestras para microscopía electrónica con el objetivo de observar la organización de la parte citosólica próxima a la membrana donde el contacto estaba teniendo lugar (Fig. R5 C). Así, se observó la clara formación del cSMAC y pSMAC, y mientras en la zona de pSMAC el citoesqueleto estaba altamente polimerizado (Fig. R5 C, micrografía 1) y estructurado conteniendo las típicas estructuras de clatrina (Fig. R5 C, micrografías 2, 3 y 4), el cSMAC carecía prácticamente de estructuras polimerizadas y la clatrina estaba ausente en su totalidad (Fig. R5 C, micrografías 2, 3 y 4).

Estos resultados, junto con la ausencia de clatrina en las vesículas procedentes de la SI, indican que la clatrina no está implicada en la internalización que tiene lugar desde el cSMAC. Por tanto, la internalización del TCR mediada por TC21 es clatrina independiente, y corresponde a la que tiene lugar desde el cSMAC.

### **Las vesículas positivas para TC21 y TCR colocalizan con GTPasas implicadas en endocitosis y fagocitosis.**

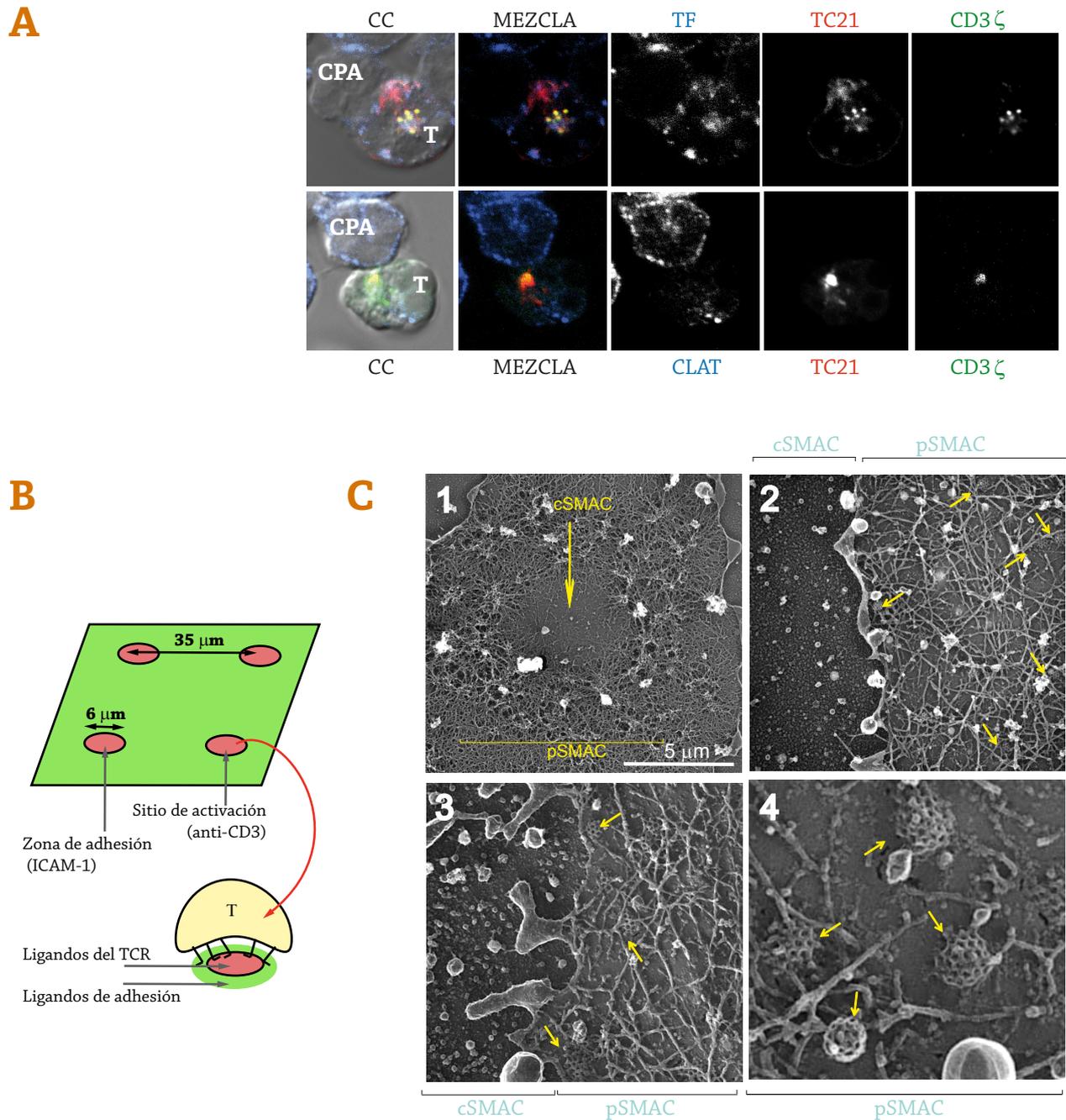
Al estar ante un proceso de internalización y tráfico vesicular, se cuestionó la relación de estas vesículas doble positivas para TC21 y CD3 $\zeta$  con la familia de proteínas Rab GTPasas dado su papel clave en procesos de tráfico intracelular.

Como se ha presentado en la introducción (introducción 7.1) hay diferentes tipos de proteínas Rab (aproximadamente hay 60 descritas). Se sabe que las proteínas Rab coordi-

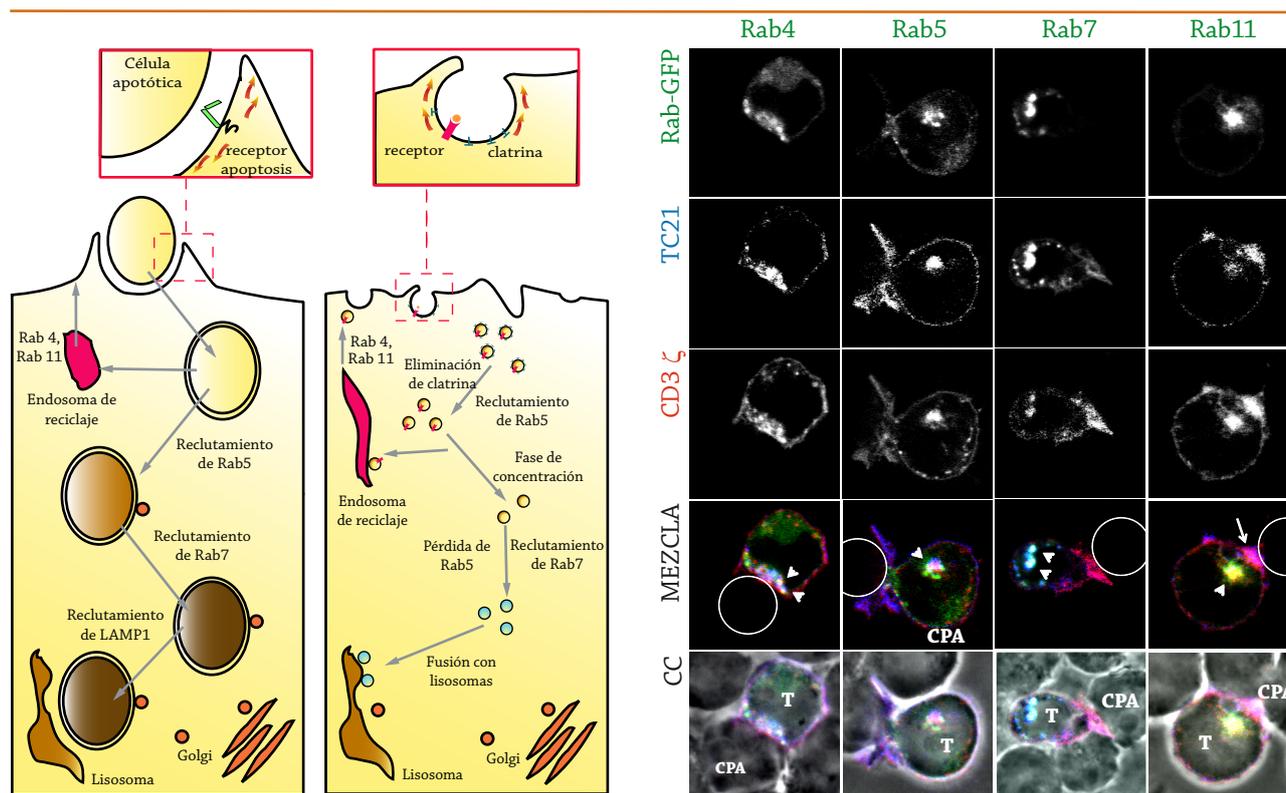
nan, junto con sus efectores, estados consecutivos de transporte que llevan a la formación de vesículas, la movilidad de éstas por el citoplasma a través de los microfilamentos y la fusión final de éstas con su destino intracelular. Para ello se distribuyen de manera diferencial por la estructura celular, determinando el camino a seguir por una vesícula recién formada a partir de la membrana plasmática. Además, las proteínas Rab participan en el proceso de internalización, tanto si éste es fagocítico (partículas > 1  $\mu\text{m}$ ) como endocítico (partículas < 1  $\mu\text{m}$ ), aunque es sabido que pese a que ambos procesos comparten proteínas Rab, y que interactúan en muchos puntos de la ruta descrita, se diferencian en los efectores implicados en cada caso, diferenciándose así dos rutas: una independiente de clatrina (fagocitosis) y otra dependiente de clatrina (endocitosis) (Fig. R6 A).

Para ver la posible implicación de estas GTPasas en la internalización mediada por TC21, de nuevo se transfectaron células JK y se estimularon con células Raji. En este caso se realizó una triple transfección, donde TC21 y CD3 $\zeta$  fueron constantes, combinándose con las diferentes Rab GTPasas.

Los resultados (Fig. R6 B) muestran una colocalización parcial de estas vesículas con Rab5 (endosomas tempranos), Rab7 (endosomas tardíos), Rab11 y Rab4 (endosomas de reciclaje), indicando que las vesículas que transportan el TCR de manera TC21 dependiente sufren una maduración similar a la que podría seguir un receptor unido a su ligando e internalizado por una ruta fagocítica (Fig. R6 A), incluso llegándose a reciclar, como se aprecia en la Fig. R3, lo que explicaría la colocalización

**Fig. R5****Internalización mediada por TC21 es independiente de clatrina**

- A** **Vesículas positivas para TC21 y CD3 $\zeta$  son negativas para marcadores de la ruta de endocitosis mediada por clatrina.** Células JK (T) transfectadas con CD3 $\zeta$  GFP y TC21 Dsred se estimularon con células Raji (CPA) durante 60 min. En el panel superior las células fueron incubadas con transferrina (TF) marcada directamente con Alexa-fluor 633, 10 minutos antes de fijar las células, y en el panel inferior se tiñó con un anticuerpo específico contra la cadena pesada de clatrina (CLAT) para ver su distribución en las vesículas que estaban siendo internalizadas. Estas imágenes son representativas de 50 imágenes tomadas de células en la misma condición.
- B** **Esquema de la superficie del array de Sinapsis Inmunológicas.** Diseño de la superficie artificial creada para la obtención de SI. Compuesta por puntos de activación que corresponden a puntos concéntricos de anticuerpo anti-CD3, rodeados de moléculas de adhesión. Se indica cómo la célula T interactúa con estos puntos de activación tras migrar por la superficie.
- C** **El cSMAC de una SI madura carece de estructuras recubiertas de clatrina.** Células primarias de ratón son depositadas en la superficie del array de SI. Las muestras son congeladas y procesadas para su observación por el microscopio electrónico. Se observa la estructura de cSMAC (micrografías 2, 3 y 4) carente de estructuras de clatrina, rodeada del pSMAC donde el citoesqueleto está altamente polimerizado y repleto de estructuras de clatrina (micrografías 1, 2, 3 y 4, las estructuras de clatrina están indicadas con flechas amarillas. Las micrografías 2, 3 y 4 corresponden a aumentos de la zona pSMAC o cSMAC).



99

## Fig. R6

### Implicación de Rab GTPasas en la internalización del TCR mediada por TC21

- A** **Proteínas RabGTPasas implicadas en procesos fagocíticos y de endocitosis.** El proceso fagocítico y la endocitosis mediada por receptor son procesos similares, pero se diferencian en los efectores que controlan el paso de un estadio a otro, lo que puede determinar el destino de las vesículas. (Modificado de Kinchen et al., 2008).
- B** **El proceso de internalización del TCR desde la SI mediado por TC21, colocaliza en parte con Rab GTPasas clásicamente implicadas en tráfico vesicular.** Células JK transfectadas con combinaciones de TC21 CFP y CD3ζ Cherry con diferentes RabGTPasas GFP (Rab4, 5, 7 y 11) fueron estimuladas con Raji cargadas con SEE (5 min para Rab4 /Rab5 y 15 min para Rab7/Rab11). Se indica con una cabeza de flecha la presencia de colocalización de las tres proteínas en cada caso.

con Rab11.

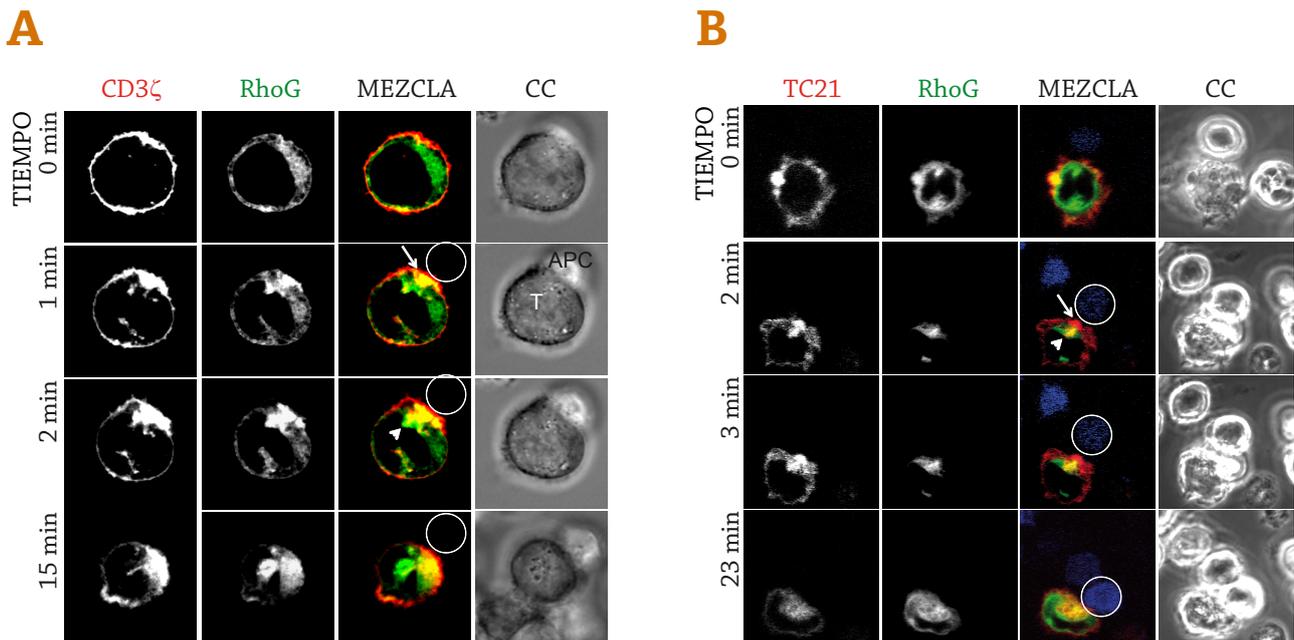
Sin embargo, la colocalización más intensa fue visualizada al transfectar células JK con CD3ζ y la GTPasa RhoG o ésta última con TC21 (Fig. R7 A y B. Vídeos 4 y 5). Esta colocalización se detectó haciendo vídeo-microscopía de estas células estimulándolas con células Raji.

Se vio que la coincidencia de RhoG con TC21 o CD3ζ en tiempo y espacio en la zona de la SI era muy evidente, además de temprana. A tiempos cortos tanto el TCR como TC21 colocalizaron con RhoG en la zona inferior de la SI (Fig. R7 A y B, flechas). A tiempos largos, TC21

(Fig. R7 B. Vídeo 5) se internalizó totalmente con RhoG, y en cuanto al TCR (Fig. R7 A. Vídeo 4) una gran fracción del acúmulo inicial también se internalizó coincidiendo con RhoG.

La presencia de colocalización entre RhoG y el TCR en vesículas provenientes de la SI, sugiere la implicación de RhoG junto con TC21 en la internalización del TCR desde la SI.

RhoG, como ya ha sido presentado en la introducción (Introducción 5.2) ha sido descrita en varios trabajos como una proteína implicada en procesos fagocíticos de células apoptóticas (deBakker et al., 2004; Henson, 2005). En

**Fig. R7****El TCR y TC21 son internalizados desde la SI en vesículas positivas para RhoG****A/B**

Células JK transfectadas con la forma silvestre de RhoG-GFP combinado bien con CD3ζ-Cherry (A) o con TC21-Dsred (B) (en sus formas silvestres), fueron estimuladas con Raji cargadas con SEE (marcadas con un círculo en la figura A y B, y en el último caso marcadas en azul) (Videos 4 y 5). La interacción se registró por video-microscopía. En A, RhoG colocaliza con el TCR en la zona de la sinapsis inmunológica (flecha) y a tiempos cortos empiezan a aparecer vesículas doble positivas provenientes de la SI (cabeza de flecha). En B, se aprecia la colocalización de TC21 y RhoG en la zona inferior de la SI (flecha), y cómo ambas proteínas se internalizan conjuntamente en tiempos posteriores (min 23).

estos casos la describen en una ruta donde queda por encima del control de la GTPasa Rac1, clásica GTPasa implicada en la polimerización de actina. Además RhoG ha sido implicada en procesos de endocitosis mediada por caveolina (proteína presente en balsas lipídicas) (Prieto-Sanchez et al., 2006). Dicha internalización se describe como clatrina independiente. Las células T no tienen caveolina, pero sí que tienen TCR que se internalizan asociados a balsas lipídicas en una ruta clatrina independiente (Monjas et al., 2004).

Por lo tanto, la implicación de RhoG en procesos fagocíticos, que por definición son clatrina independiente, y la presencia de RhoG en procesos de internalización mediados por caveolina (también clatrina independiente) lle-

vo a plantearse la implicación de esta proteína en el proceso de internalización del TCR desde la SI mediada por TC21.

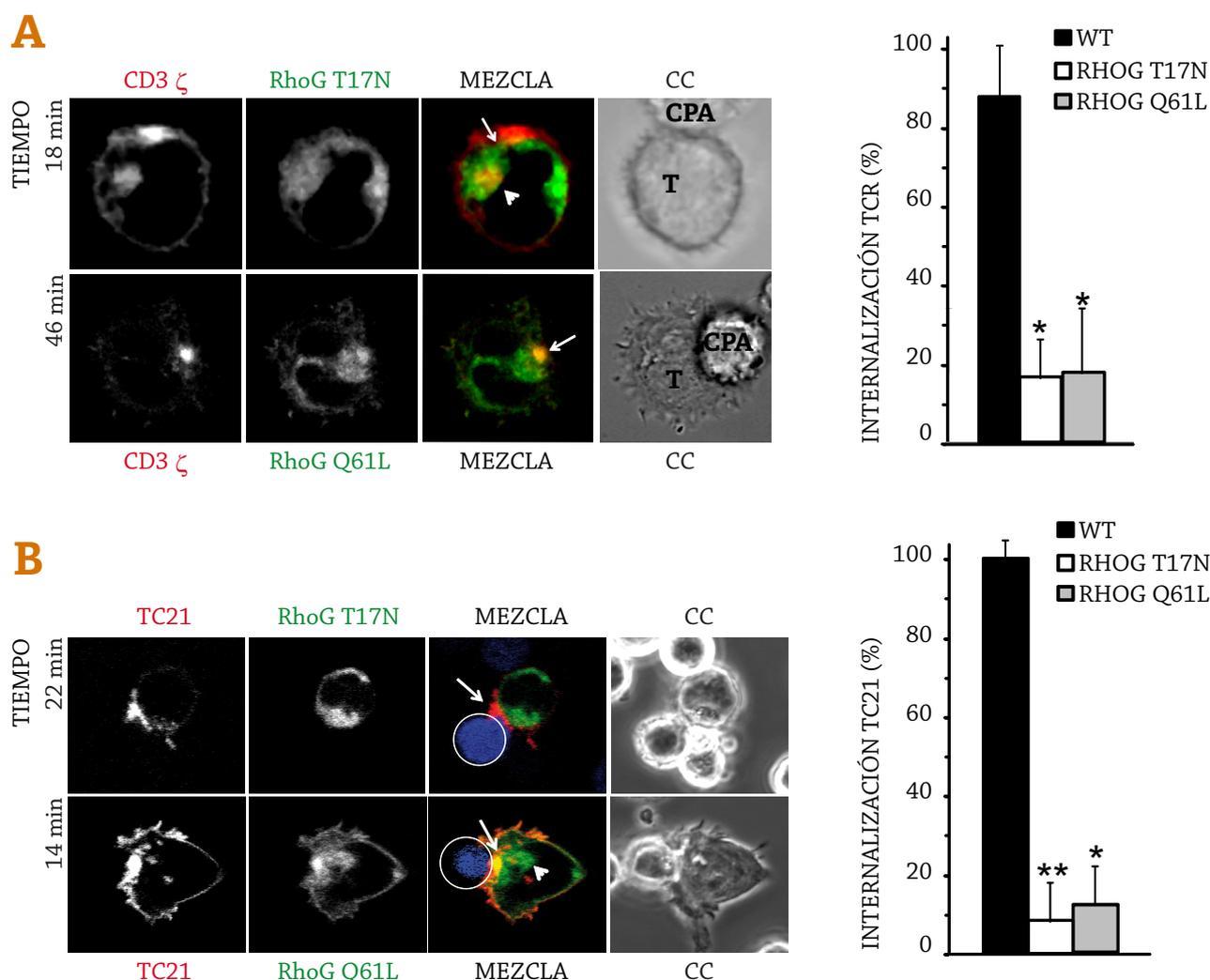
Para valorar su papel en dicho proceso, se realizaron de nuevo experimentos de transfección de células JK con las proteínas de fusión TC21 o CD3ζ en combinación con diferentes formas mutadas de RhoG (RhoG T17N y RhoG Q61L, dominante negativo y constitutivamente activo, respectivamente) (Fig. R8).

Estos experimentos mostraron que en un 80-90% de las SI registradas, la internalización del TCR desde la SI quedó bloqueada usando ambos tipos de mutantes (Fig. R8 A. Videos 6 y 8) al igual que la internalización de TC21 una vez acumulado (Fig. R8 B. Videos 7 y 9).

En base a estos resultados se pudo con-

cluir que la internalización del TCR y de TC21 requiere la actividad de RhoG y que por tanto, la internalización del TCR desde la SI, es in-

dependiente de clatrina, pero dependiente de TC21 y RhoG.



101

## Fig. R8

### La forma dominante negativa (T17N) y la constitutivamente activa (Q61L) de RhoG inhiben la internalización del TCR y de TC21 desde la SI

Células JK transfectadas con diferentes combinaciones CD3 $\zeta$ -cherry (A) o TC21-Dsred (B) con las diferentes formas de RhoG-GFP, se estimularon con Raji SEE.

**A** Tiempos tardíos de conjugados de células JK transfectadas con las formas mutantes de RhoG y con la forma silvestre de CD3 $\zeta$  (Videos 6 y 8). La flecha muestra la acumulación de TCR en la SI y la cabeza de flecha la presencia de vesículas intracelulares que no provienen de la SI.

**B** Tiempos tardíos de células JK transfectadas con las diferentes formas mutantes de RhoG y TC21 silvestre. Con una flecha se muestra la acumulación de TC21 en la SI. En el caso de RhoG Q61L, con una cabeza de flecha se indica la existencia de vesículas RhoG positivas, TC21 negativas que provienen de la SI. Las células Raji están marcadas de azul y con un círculo blanco para facilitar su visualización (Videos 7 y 9).

Ambos paneles (A y B) van acompañados de la correspondiente cuantificación obtenida a partir de la visualización de 15-20 conjugados por cada tipo de mutante de RhoG. Se muestra el porcentaje de los conjugados en los que se observó internalización de CD3 $\zeta$  o TC21. Se representa la media y la desviación típica correspondiente a 3 grupos de experimentos diferentes. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,005$  (Test bilateral de Mann-Whitney)

### 1.3. La ausencia de TC21 o RhoG en células primarias, bloquea la internalización del TCR desde la SI.

El trabajo realizado con la sobreexpresión de proteínas de fusión en células JK y el desarrollo de conclusiones a partir de sus resultados, siempre conlleva la duda del posible efecto que pueda tener en sí la expresión en grandes cantidades de una proteína exógena, que puede unirse a proteínas efectoras comunes a otras GTPasas. Por ésto se estudió el efecto de la ausencia de las dos proteínas de interés en la internalización del TCR desde la SI, en células primarias de ratón, que carecían genéticamente, de TC21 (RRas2  $-/-$ ) o RhoG (RhoG  $-/-$ ). Se usaron células T con el TCR transgénico AND ( $V\alpha 11.1 V\beta 3$ ) transducidas con CD3 $\zeta$ -GFP (pHR-CD3 $\zeta$ GFP), lo que permitía la visualización de la formación de la SI de forma dinámica tras la estimulación con una célula presentadora. Como células presentadoras se usaron células DCEK que expresan I-E<sup>k</sup> y CD80, la cuales se cargaron con el péptido específico para el TCR transgénico AND denominado MCC (péptido

procedente del citocromo c de polilla).

Los estudios de vídeo-microscopía (Fig. R9) mostraron que en linfocitos de genotipo silvestre (+/+) (Vídeo 10), el TCR se acumuló en la zona de contacto a los pocos minutos tras el contacto de la célula T con la célula CPA (2,7 min), iniciándose la aparición de vesículas conteniendo TCR desde esta SI al minuto siguiente (3 min). Sin embargo, los estudios realizados con células procedentes de los ratones carentes de TC21 (RRas2  $-/-$ ) (Vídeo 11) y RhoG (RhoG  $-/-$ ) (Vídeo 12), mostraron la acumulación en la SI de CD3 $\zeta$  (indicado con flechas), pero no su correcta internalización en vesículas, incluso a tiempos mayores de 10 min, como es en el caso de las células RRas2  $-/-$ .

El mismo resultado se obtuvo utilizando el sistema de células T transgénicas OT1 de los diferentes genotipos, usando CPA cargadas con OVAp. (Vídeos 17, 18 y 19).

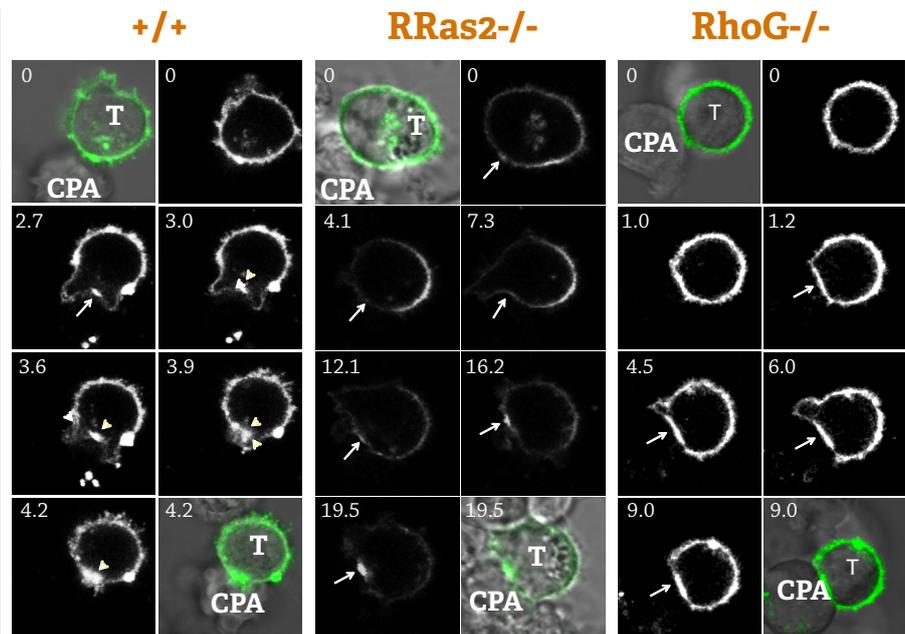
Con el objetivo de cuantificar el efecto sobre la internalización del TCR desde la SI, se prepararon conjugados de células T transgénicas AND con células DCEK cargadas con MCC.

**Fig. R9**

**El TCR es internalizado desde la SI por un proceso dependiente de TC21 y RhoG**

Células transgénicas AND de genotipo silvestre (+/+) (vídeo 10) o deficientes en TC21 (RRas2  $-/-$ ) (vídeo 11) o RhoG (RhoG  $-/-$ ) (vídeo 12) se transdujeron con CD3 $\zeta$ -GFP para seguir la formación de la SI y la internalización del TCR desde la SI mediante vídeo-microscopía tras la estimulación con CPA DCEK, cargadas con MCC.

Las flechas indican el punto de contacto entre la célula T y la CPA y con ello el lugar de acumulación del TCR durante la formación de la SI. Las cabezas de flecha señalan las vesículas conteniendo TCR procedentes de la SI.

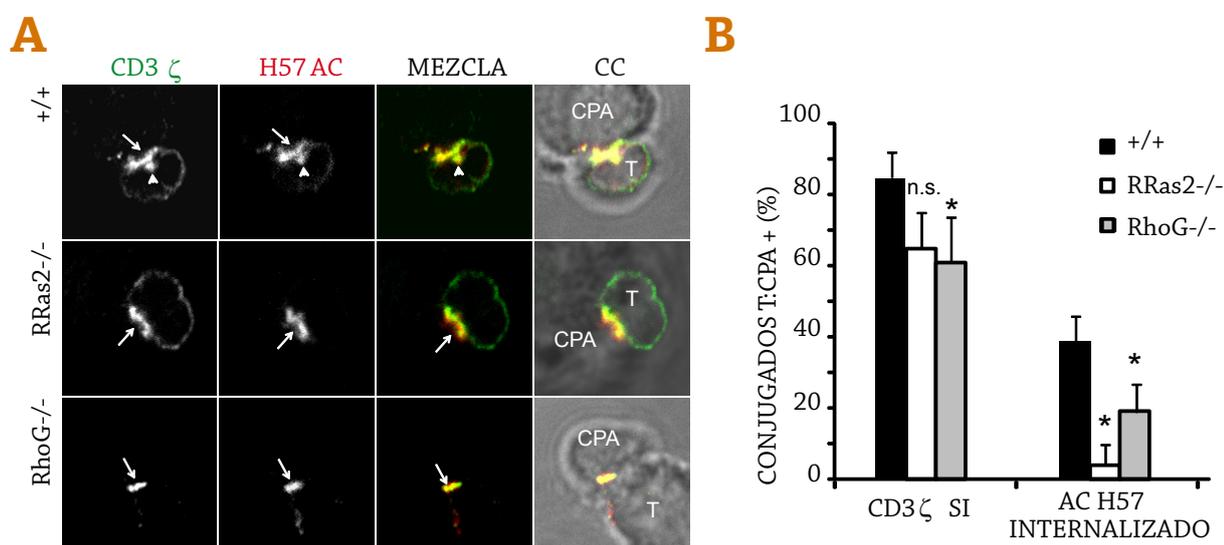


Debido al tráfico existente de TCR a través de la célula T después de iniciarse el contacto con la CPA, se planteó la necesidad de diferenciar las vesículas procedentes de la SI, frente a las vesículas que contienen TCR, pero que provienen de puntos distales de la SI (Das et al., 2004). Para ello, incubamos las células T previamente con un anticuerpo que reconoce la cadena  $\beta$  del TCR (H57-597), pero con poca capacidad estimuladora. A continuación se procedió a la estimulación de las células T con las CPA, esperando que los TCR, tras el estímulo con la presentadora, se internalizaran llevando consigo el anticuerpo H57-597, aspecto que nos daría información de la procedencia del receptor.

Las células se procesaron para detectar el anticuerpo anti- $\beta$  del TCR y marcando con anti-CD3 $\zeta$  para seguir la SI (Fig. R10 A). Se cuantificaron dos aspectos (Fig. R10 B), la acumula-

ción o no de TCR en el punto de contacto entre una célula T y la presentadora (formación de la SI) y la aparición de vesículas doble positivas para la cadena  $\beta$  y  $\zeta$  del TCR inmediatamente debajo de la SI, indicando que dichas vesículas corresponden a TCR internalizados desde la sinapsis.

Una vez realizada la cuantificación de múltiples conjugados de los diferentes genotipos (+/+ , RRas2<sup>-/-</sup>, RhoG<sup>-/-</sup>), se pudo concluir que ambas GTPas controlan la internalización del TCR desde la sinapsis, dándose, en su ausencia, la acumulación de TCR en la SI y la no finalización de ésta (Fig. R10 A). Estos resultados corroboraron los obtenidos previamente con células JK transfectadas para la sobreexpresión de las diferentes formas de TC21 y RhoG (Fig. R8 A y Fig. R4 A y B).



**Fig. R10**

**Cuantificación del efecto de la ausencia de TC21 y RhoG sobre la internalización del TCR desde la SI**

Células preteñidas a 0° C con anticuerpo anti-TCR $\beta$  (H57-597), se estimularon durante 30 min con células DCEK cargadas con MCC (10  $\mu$ M) a 37° C. Tras la tinción con anti-CD3  $\zeta$ , se cuantificó el número de sinapsis en función de la acumulación de CD3 $\zeta$  en el punto de contacto entre la célula T y CPA ( flechas), y la internalización del TCR en base a la presencia de vesículas doble positivas para TCR  $\beta$  y  $\zeta$  por debajo de la SI (cabeza de flecha).

Se analizaron 3 experimentos con 20-30 conjugados para cada genotipo. (\* $p$  < 0,05. Test de Mann-Whitney bilateral; n.s, no significativo).

## 2. La modulación negativa del TCR es defectuosa en células carentes de TC21 (RRas2 $-/-$ ) y RhoG (RhoG $-/-$ )

Cuando una célula T entra en contacto con la CPA, los niveles de TCR globales en la membrana disminuyen. Este proceso se conoce por el nombre de modulación negativa o “downmodulación” del TCR en la membrana (Das et al., 2004). Dados los resultados obtenidos tanto en células JK como en células primarias en relación al papel de TC21 y RhoG en la internalización del TCR desde la SI, se quiso estudiar el papel de ambas proteínas en el proceso global de modulación negativa. Para ello se usaron células primarias obtenidas a partir de nódulos linfáticos de ratones transgénicos AND (+/+, RRas2  $-/-$ , RhoG  $-/-$ ), que fueron estimuladas con células presentadoras DCEK cargadas inicialmente con diferentes concentraciones de MCC. Al ser células transgénicas para el TCR, pudimos seguir los niveles de este receptor marcando con V $\beta$ 3 (cadena  $\beta$  específica del TCR transgénico).

La estimulación de las células con diferentes concentraciones de MCC durante 3 h, mostró sólo un pequeño efecto inhibitorio (20% de inhibición) en las concentraciones más altas de MCC (10 y 100  $\mu$ m) (Fig. R11 A), y además se vio que la inhibición obtenida a estas altas concentraciones era solo evidente a tiempos largos (3 h) (Fig. R11 B).

Los resultados obtenidos indicaban en primer lugar que la cantidad de TCR modulado desde la sinapsis y que puede contribuir a la modulación negativa del receptor en la membrana, es una pequeña cantidad del total del

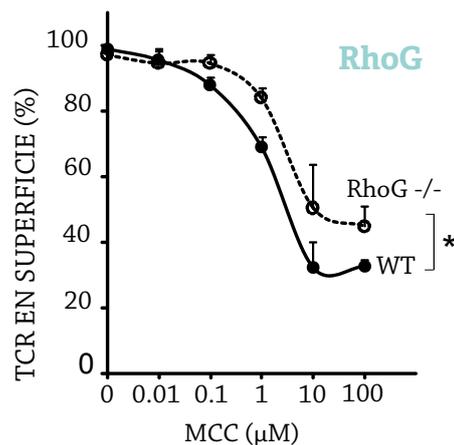
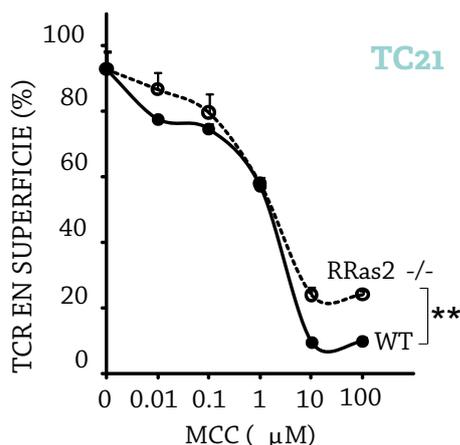
receptor que debe ser internalizado. Para poder apreciar el defecto que causa la ausencia de las dos GTPasas, se requiere una alta concentración de antígeno, indicando que la internalización desde el cSMAC es más importante cuanto más antígeno presente haya. Por otro lado, cabe resaltar que la ligera inhibición de la modulación se da solo a tiempos largos de incubación, tiempos que puede requerir la estructura de la sinapsis madura para resolverse (más de 3h).

En términos generales de internalización del TCR desde la membrana del linfocito T, se conoce muy bien la existencia de dos grupos diferentes de TCR, aquellos que llamamos contactados y los comodulados (San Jose et al., 2000), que se internalizan por rutas moleculares diferentes (Monjas et al., 2004): dependiente de balsas lipídicas y dependiente de clatrina respectivamente. En relación a la existencia de estos dos mecanismos nuestro grupo describió diferentes situaciones donde cada ruta era predominante en función del tipo de estimulación. Así una estimulación con anticuerpo soluble, daba lugar a una internalización dependiente de clatrina, mientras que el uso de anticuerpo pegado a placa desencadenaba mayoritariamente el mecanismo independiente de clatrina. En base a estas dos técnicas, se quiso averiguar cuál era la función de TC21 y RhoG respecto a estas dos rutas establecidas. Para ello, células primarias de ratón, fueron estimuladas 12 h con los dos tipos de estímulos:

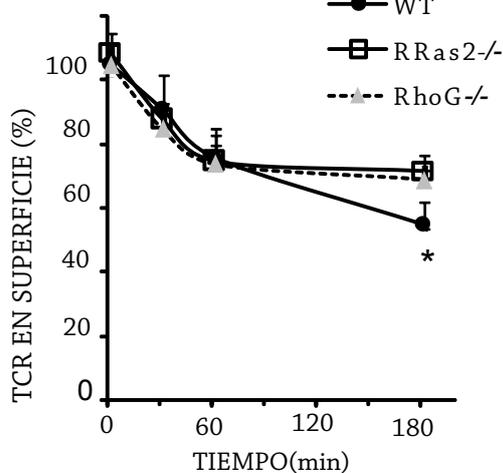
anti-TCR pegado a placa o soluble (145-2C11) a diferentes concentraciones. Tras la estimulación los valores de fluorescencia media para el TCR en membrana se detectaron por citometría de flujo (Fig. R11 C). Los resultados mostraron

una clara diferencia frente al tipo de estímulo, encontrándose solo un defecto en el caso de usar el anticuerpo pegado a placa, situación en la que la internalización independiente de clatrina juega un papel más importante.

A



B



**Fig. R11** La ausencia de TC21 y RhoG causa una inhibición débil en el proceso de modulación negativa del TCR

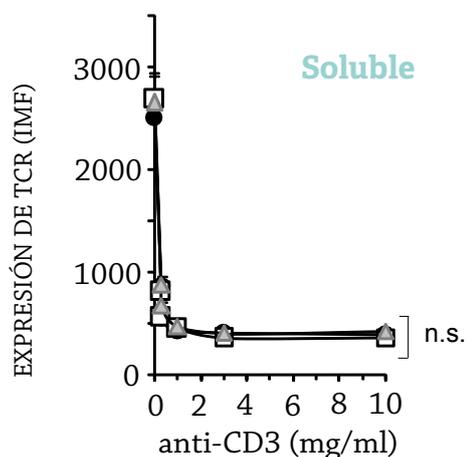
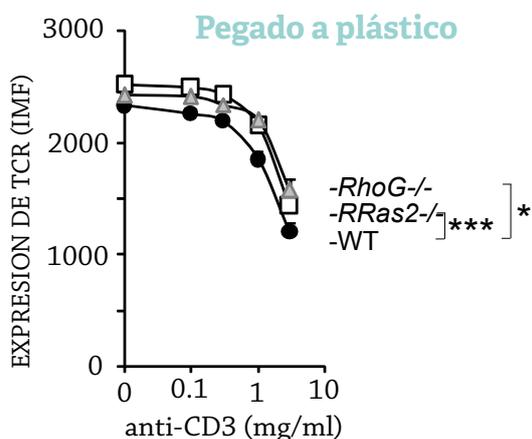
**A/B** (A) Células T AND (+/+, RRas2 -/- y RhoG -/-) fueron estimuladas durante 3h con células DCEK cargadas con MCC a diferentes concentraciones o (B) diferentes tiempos a la concentración de 100 µM de MCC.

Se detectaron los niveles de TCR en membrana usando un anticuerpo específico para el TCR transgénico AND (Vβ3), y analizando las células por citometría de flujo.

**C** Células T (+/+, RRas2 -/- y RhoG -/-) estimuladas con anticuerpo anti CD3, (145-2C11) pegado a placa o soluble.

Se midieron los niveles de TCR en membrana por citometría de flujo.

C

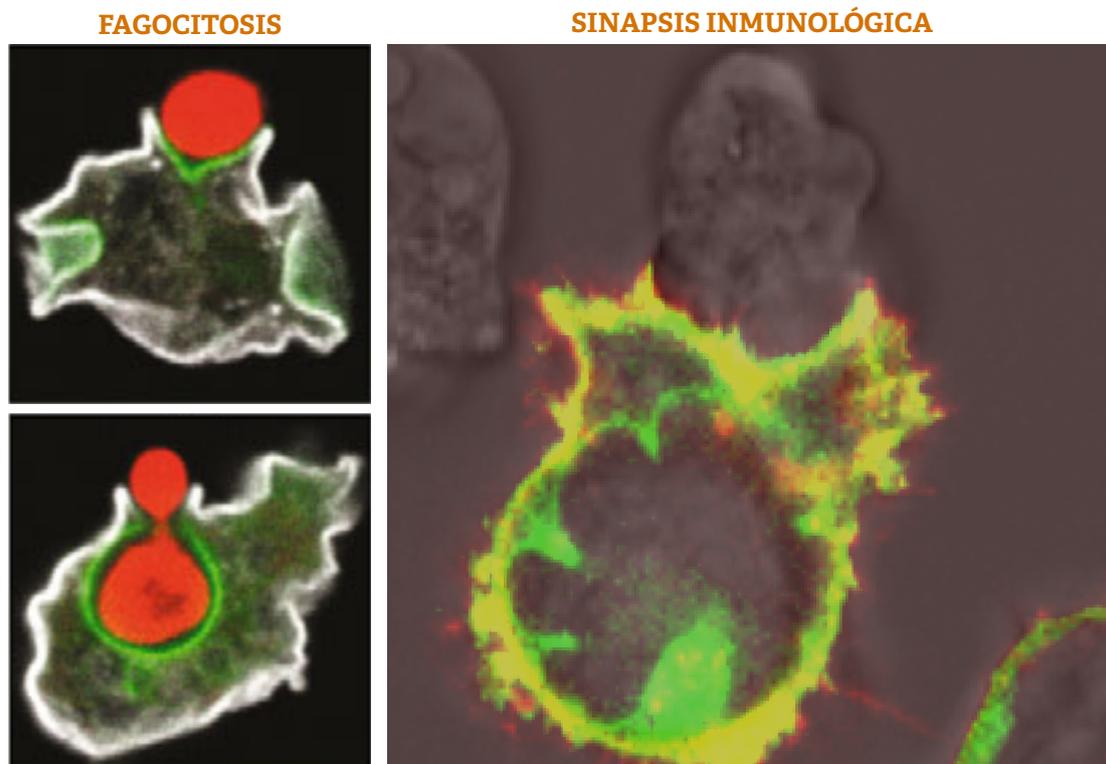


### 3. Las células T fagocitan a través del TCR por un proceso dependiente de TC21 y RhoG.

106

Para poder describir la ruta de internalización del TCR en la que están implicados TC21 y RhoG, hay que tener en consideración que RhoG ha sido implicada clásicamente en procesos fagocíticos en diferentes sistemas y organismos (deBakker et al., 2004; Henson, 2005). El hecho de que RhoG y TC21 estuviesen controlando una ruta fagocítica que permitiese la internalización del receptor desde la sinapsis, estaría acorde con la independencia de clatrina

descrita con anterioridad. Dicha independencia de clatrina es considerada como uno de los requisitos para catalogar un proceso como fagocitosis (Mayor and Pagano, 2007). Además, no hay que olvidar que cuando una célula T interacciona con una CPA, se crea una estructura similar a la formada por una célula profesional fagocítica interaccionando e internalizando su antígeno (Fig. R12). Cuando se produce el contacto entre una célula T y una célula CPA, la



**Fig. R12**

**Semejanza morfológica entre la fagocitosis y el contacto de una célula T con la célula CPA**

Se muestra un ejemplo de fagocitosis (adaptado de Mercanti et al., 2006) y un contacto en los minutos iniciales de una célula T JK transfectada con dos proteínas fluorescentes irrelevantes.

célula T “abraza” a la CPA, como un intento de engullir a ésta última en su totalidad, cosa que no es posible seguramente por una limitación del tamaño.

### 3.1. Las células T fagocitan partículas a través del TCR.

En base a estas observaciones se encontró interesante analizar la posible capacidad fagocítica de las células T, disminuyendo el tamaño de la célula presentadora a “fagocitar”. Para este fin, se utilizó una herramienta clásica establecida para el estudio de procesos fagocíticos: bolas de látex recubiertas con proteína (Desjardins and Griffiths, 2003). Este tipo de bolas de látex también han sido utilizadas en varios trabajos, para la estimulación de células T o incluso para el estudio de la SI (Batista et al., 2004; Glebov and Nichols, 2004). En este caso las bolas de látex que se usaron fueron de diferentes tamaños: 1, 3 y 6  $\mu\text{m}$ , asumiendo que por ser superiores a 0,75-1  $\mu\text{m}$  deben ser internalizados por un proceso fagocítico. Las bolas se unieron a un anticuerpo anti TCR para estudiar también si el TCR puede promover fagocitosis.

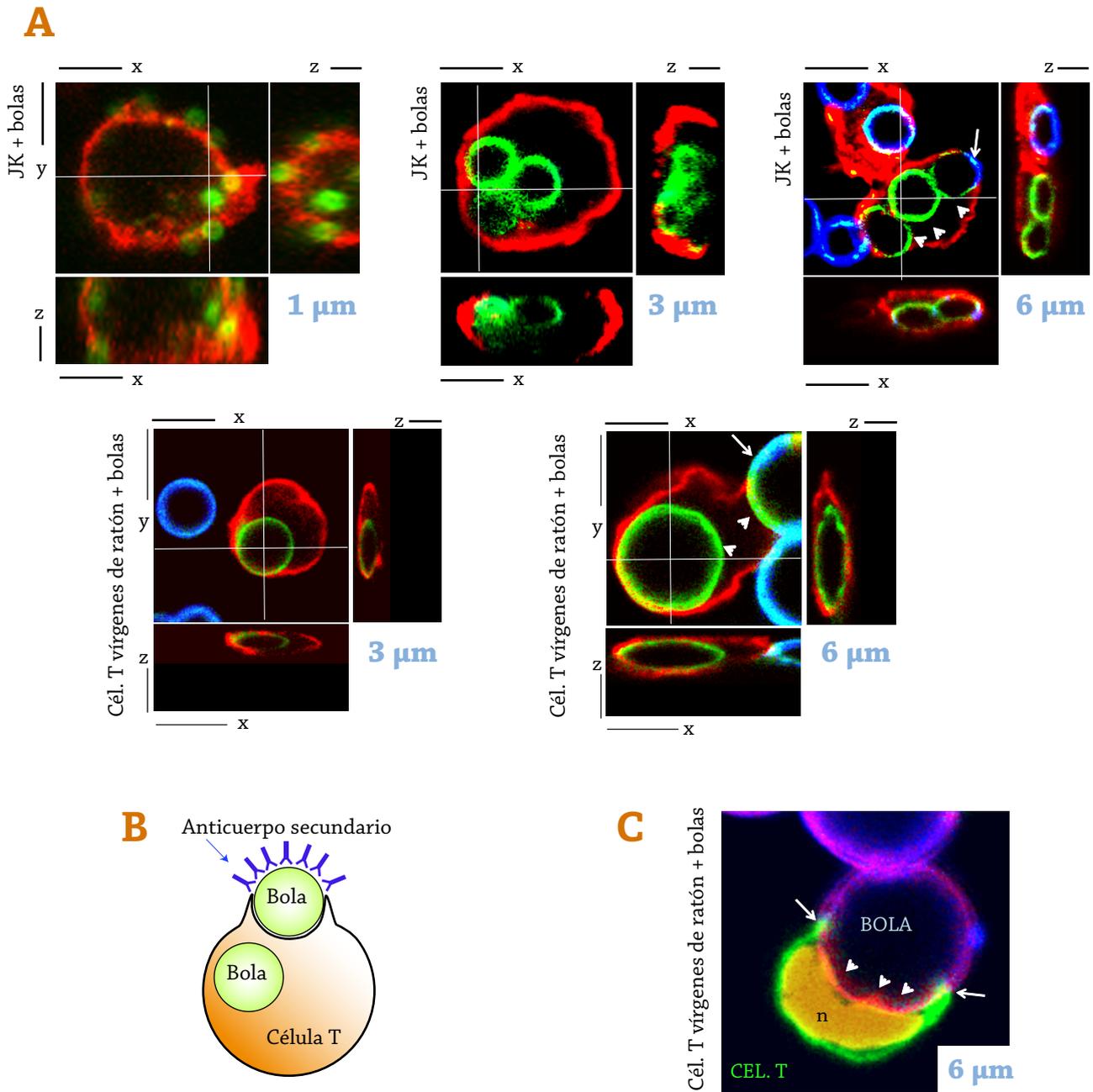
Los primeros resultados obtenidos verificaban la capacidad de las células JK de fagocitar bolas de 1, 3 y 6  $\mu\text{m}$  recubiertas de anticuerpo anti-CD3 (Fig. R13 A). Las bolas utilizadas eran fluorescentes, y al estar recubiertas por anticuerpo, se puede utilizar un anticuerpo secundario contra el tipo de Ig unido a la bola, conjugado a algún fluorocromo. De esta manera se pueden diferenciar perfectamente las bolas internas de las externas, incluso aquéllas que están en proceso de ser internalizadas (la célula no se permeabiliza y por lo tanto las bo-

las internas son inaccesibles al anticuerpo secundario) (Fig. R13 B). Este fenómeno no está restringido a líneas celulares, sino que células primarias de ratón (Fig. R13 A) y células primarias humanas presentan también esta capacidad (Fig. R16 B).

Para probar que esta nueva capacidad descrita para las células T, estaba realmente mediada por el TCR, se realizaron varios controles. Se usaron células JK incubadas con bolas recubiertas con anticuerpo anti-CD8 y células JK mutantes, carentes de TCR en membrana (no tienen la cadena  $\beta$  del complejo TCR) en contacto con bolas recubiertas en este caso con anti-CD3 (OKT3) (Fig. R14 A). En ambos casos las bolas se mantuvieron en el exterior celular, mostrando la especificidad y requerimiento del TCR para esta internalización.

Otro control que se realizó, fue probar que realmente estas bolas no podían ser internalizadas por receptores que están bajo el control de una ruta endocítica clatrina dependiente, como es el caso del receptor de transferrina, debido a su tamaño. Si la internalización del TCR unido a la bola de látex es mediada por una ruta fagocítica, el receptor de transferrina, una vez estimulado por la bola recubierta por anticuerpo anti-transferrina, no debería poder internalizarse llevando la bola con él al interior celular (Fig. R14 B). El resultado fue consistente con la hipótesis, dado que se comprobó que las bolas quedaron unidas a la membrana y accesibles al anticuerpo anti-ratón secundario aplicado (Fig. R14 B).

Un aspecto a resaltar de esta capacidad fagocítica por parte de las células T, es lo ilustrado en la Fig. R13 A y C, donde una célula primaria de ratón es capaz de fagocitar bolas



**Fig. R13**

**Células T son capaces de fagocitar bolas de látex recubiertas por anticuerpo anti-CD3**

- A** **Células JK y células T primarias fagocitan bolas de 1, 3 y 6  $\mu\text{m}$ .** Las células se incubaron con bolas de látex recubiertas de anti-CD3 (1, 3 y 6  $\mu\text{m}$ ) durante 30 min. Posteriormente fueron fijadas y teñidas con Faloidina para ver la actina cortical (mostrada en rojo). Además se muestra secciones a lo largo de los ejes xy, yz, para demostrar así la presencia de las bolas en el interior celular (cabeza de flechas). En el caso de las células con bolas de 3 y 6  $\mu\text{m}$  se añadió un anticuerpo secundario Alexa-647 anti-ratón (marcaje azul) para determinar si las bolas están fuera o dentro. De esta manera también se puede apreciar la existencia de copas fagocíticas donde las bolas están parcialmente accesibles al anticuerpo secundario (indicado con flechas).
- B** **Sistema basado en la accesibilidad de la bola al anticuerpo secundario** para diferenciar si las bolas están dentro o fuera.
- C** **Las células T, en la copa fagocítica, interaccionan con la bola creando un contacto hermético y ajustado que impide la accesibilidad del anticuerpo secundario a la zona ya internalizada.** Células T vírgenes de ratón se incubaron 30 min con bolas (6  $\mu\text{m}$ ) recubiertas de 145-2C11, posteriormente fueron fijadas y teñidas con anti-Hamster FITC (mostrado en azul), Faloidina TRITC (mostrado en verde) y To-Pro para visualizar el núcleo (n, mostrado en naranja). Las flechas indican la extensión del citoesqueleto de actina hacia la bola, creando una unión fuerte y hermética que impide la entrada del anticuerpo secundario en la parte de la bola que está ya en la zona interna de la célula (cabezas de flecha).

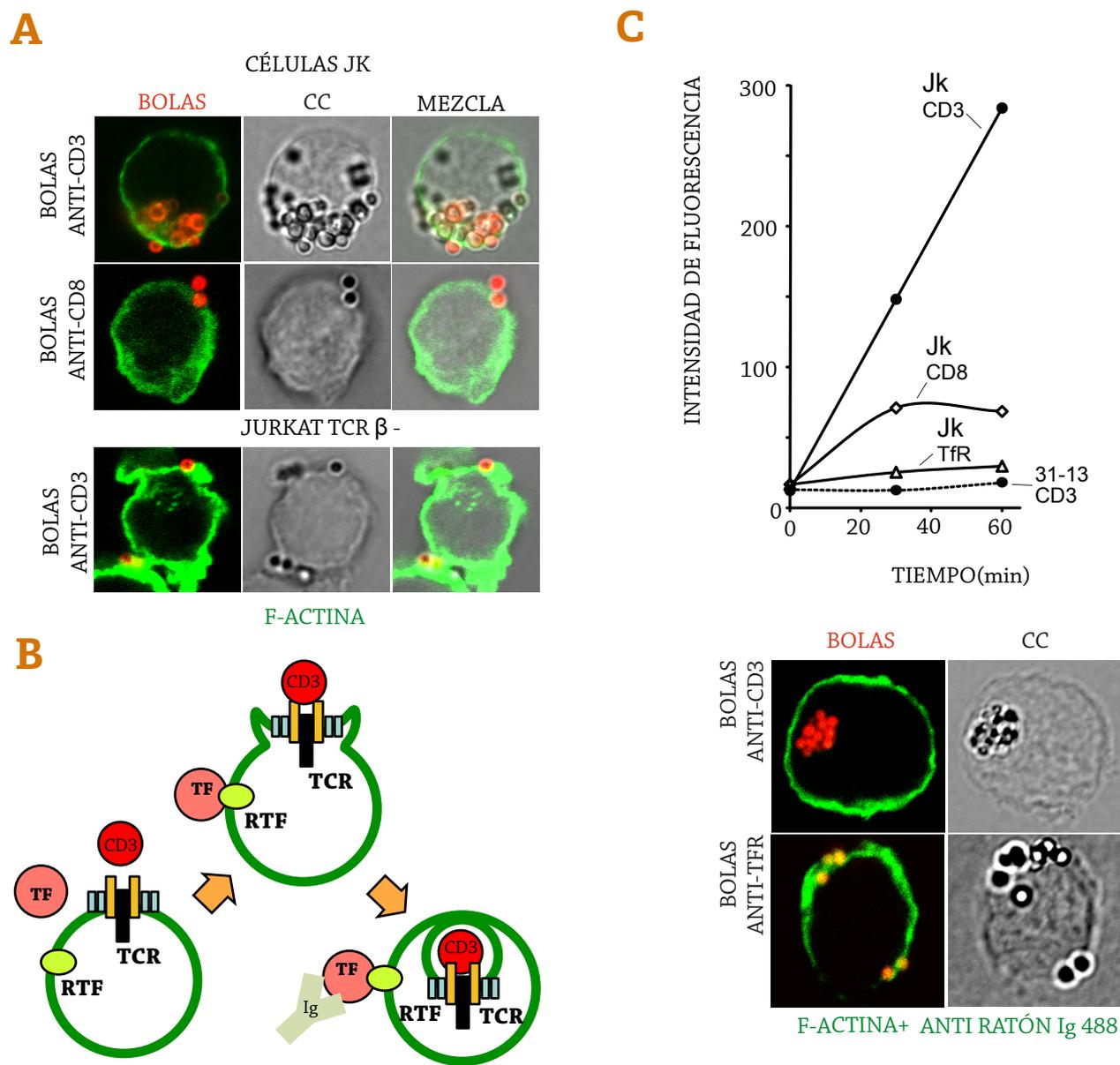


Fig. R14

## Proceso de Fagocitosis es TCR dependiente

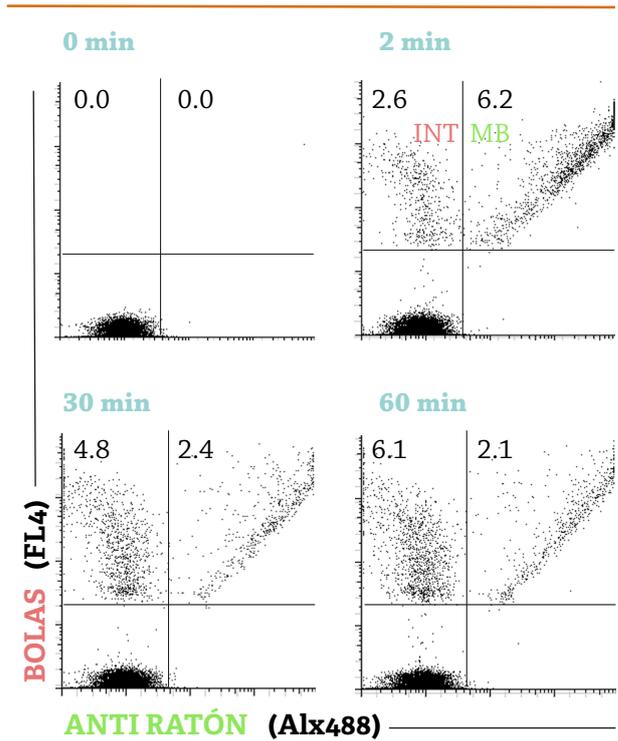
- A** Las células T fagocitan bolas recubiertas de anti-CD3 únicamente a través del TCR. Células JK y células JK mutantes que no expresan TCR en membrana (31.13  $\beta^-$ ) se incubaron con bolas de 1  $\mu$ m recubiertas con anti-CD3 (OKT3) o anti-CD8 (OKT8) (las células JK son CD8 negativas). Se incubaron 60 min. Las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con anti-ratón Ig-Alexa 594 (rojo) y con faloidina FITC para visualizar la actina cortical y poder diferenciar las bolas internas y externas.
- B** Solo la unión y estimulación del TCR, y no la unión a otro tipo de receptor que se internaliza por endocitosis (Receptor de Transferrina RTF), inicia el proceso fagocítico. Células JK son incubadas con bolas fluorescentes rojas (CRIMSON) de 1  $\mu$ m recubiertas de anticuerpo anti-CD3 (OKT3) o anti-receptor de transferrina (FG1/6) durante 60 min. Posteriormente a la fijación, y previo a la permeabilización, se añadió anticuerpo anti Ig Alexa-488, para marcar las bolas externas (las internas, no accesibles al anti Ig, permanecieron rojas). Posteriormente se tiñó la actina polimerizada de la membrana con faloidina FITC.
- C** Cuantificación por citometría de los controles realizados por microscopía (A y B). Células JK y 31.13 (JK mutantes sin cadena  $\beta$  del TCR), se incubaron con bolas de 1  $\mu$ m recubiertas de los anticuerpos especificados en la figura (cociente célula:bola 1:40) durante los tiempos indicados. Tras el tiempo de estimulación a 37°, las células se sometieron a un lavado ácido de 2 min, que retiró todo el anticuerpo de las bolas que quedaron en el exterior celular. Las células se fijaron y permeabilizaron para teñir con el anticuerpo anti Ig correspondiente conjugado a Alexa 488. Se cuantificó por citometría de flujo la intensidad media de fluorescencia.

de 6  $\mu\text{m}$  que le equiparan en tamaño. Esta internalización reflejada en la Fig. R13 C, muestra claramente la extensión de la membrana plasmática, sobre la superficie a fagocitar. Esta extensión o movimiento de la membrana sobre la diana permite la unión de nuevos receptores a su antígeno, creando un contacto hermético que como se puede apreciar en la Fig. R13 C (flechas) impide la difusión del anticuerpo secundario al interior celular.

En base a la técnica utilizada para microscopía confocal donde se diferencian las bolas internas de las externas en función de la accesibilidad de las bolas recubiertas por anticuerpo al anticuerpo secundario, se desarrolló una técnica equivalente para citometría que permite seguir la entrada de las bolas con el tiempo (Fig. R15). Así, en tiempos iniciales (2 min) se observó que el 70% de las células que entraron en contacto con las bolas recubiertas de anti-CD3 tuvieron bolas en su membrana y solo un 30% tuvieron únicamente bolas en el interior celular. Sin embargo esta última población aumentó con el tiempo, siendo del 75% a los 60 min, mostrando así que las células internalizan las bolas adheridas a su membrana.

### 3.2. El proceso fagocítico mediado por el TCR presenta características de una fagocitosis clásica.

En todos los experimentos realizados con bolas de látex se pudo observar la formación de copas fagocíticas, o estructuras que se asemejaban. La formación de esta estructura en una célula clásicamente fagocítica (p. ej. macrófago) requiere una coordinación de sucesos muy estrecha, iniciándose por el contacto del receptor con su ligando, seguido de la fosforilación



**Fig. R15**

#### Técnica cuantitativa del proceso fagocítico

Células JK se incubaron con bolas de 1  $\mu\text{m}$  fluorescentes rojas (CRIMSON) recubiertas de anti-CD3 (OKT3) a 0° durante 30 min (experimento de pulso y caza). Tras lavar para eliminar las bolas no unidas, se incubaron los tiempos indicados en los histogramas. Finalmente las células se tiñeron con el anticuerpo anti-ratón Alexa 488 para analizarlas por citometría de flujo.

de la parte citoplasmática de estos receptores y la creación de una zona de la membrana con características químicas diferentes al resto de la célula, lo que permite el reclutamiento de quinasas que crearán grupos de proteínas fosforiladas y lípidos modificados (Aderem, 2002; Swanson, 2008).

La modificación principal es la que realiza la enzima PI3K, y sus productos lipídicos que activan a pequeñas GTPasas que finalmente controlarán la polimerización de actina, que es el paso clave para permitir la extensión, retracción y creación del fagosoma incipiente. La clausura del fagosoma, requiere la continuidad de procesos sincronizados que permiten, por ejemplo, la despolimerización de actina.

### **El proceso fagocítico en las células T depende de la polimerización de actina**

Teniendo en cuenta estas características, se trató de ver hasta qué punto el proceso fagocítico llevado a cabo por la célula T se asemeja al proceso clásico. Haciendo uso del método de citometría de flujo presentado con anterioridad, se analizó la función del citoesqueleto de actina en la internalización de las bolas de látex de diferentes tamaños. Para ello, células JK se incubaron con Citocalasina D (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), inhibidor de la polimerización y elongación de los filamentos de actina, previamente al contacto con las bolas (1, 3 y 6  $\mu\text{m}$ ). Como se puede apreciar en la Fig. R16 A, el proceso de internalización estuvo totalmente bloqueado, independientemente del tamaño de la partícula, indicando que el proceso fagocítico mediado por el TCR es dependiente de la reorganización del citoesqueleto de actina.

Paralelamente, se observó por microscopía cuál era la distribución de la actina polimerizada y del receptor que media en el proceso (TCR) (Fig. R16 B). Se vio que la actina se encontraba polimerizada rodeando las bolas de látex en la parte más próxima a la membrana (cabezas de flechas Fig. R16 B), indicando que, como en los procesos fagocíticos clásicos, la actina rodea al fagosoma emergente pero se despolimeriza conforme el fagosoma se separa de la membrana para proceder con la maduración fagosomal (Aderem, 2002; Swanson, 2008; Zhou and Yu, 2008).

En cuanto al TCR, se visualizó el receptor endógeno y se detectó también colocalizando con las bolas (Fig. R16 B). Este aspecto es característico a su vez de procesos fagocíticos, donde el receptor es internalizado junto con el

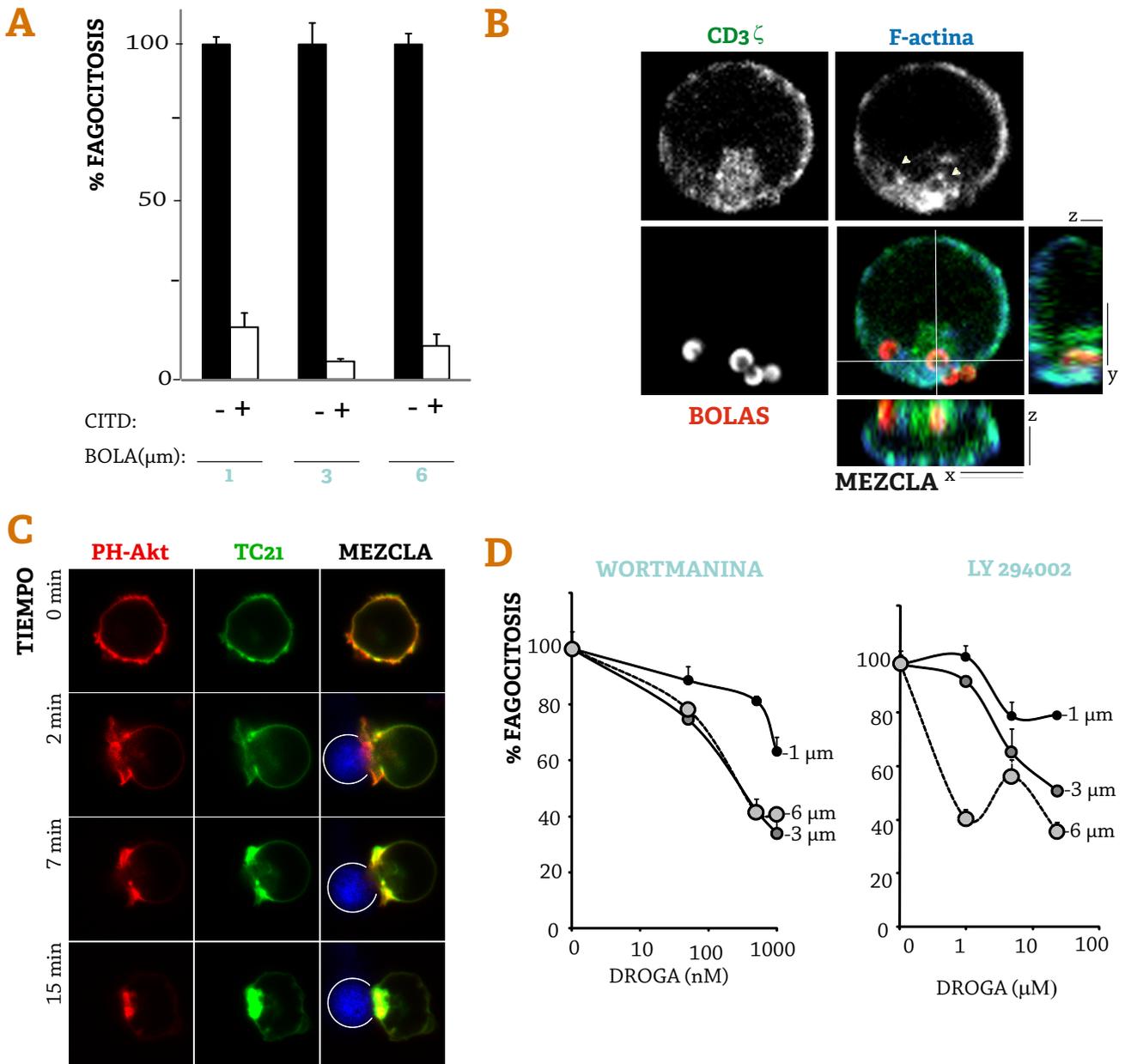
ligando, siendo luego en algunos casos reciclado o degradado (Kinchen and Ravichandran, 2008).

### **La función de PI3K es dependiente del tamaño de la partícula a fagocitar**

Como anteriormente se mencionó, la implicación de los productos de la actividad de la enzima PI3K y la existencia de diferentes olas de producción de PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, es esencial para la consecución del proceso fagocítico. Se ha descrito que la función de esta enzima es dependiente del tamaño de las partículas a fagocitar (Yeung and Grinstein, 2007), siendo esta dependencia más importante a medida que el tamaño aumenta, debido, en gran medida a que estos lípidos modificados son esenciales para la activación de pequeñas GTPasas cuyo objetivo esencial es la polimerización de actina y la extensión de la membrana sobre el ligando a fagocitar (a mayor tamaño se requiere mayor extensión de membrana).

En cuanto a la función de PI3K en la célula T, en trabajos previos ha sido descrita la producción de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> en la SI (Harriague and Bismuth, 2002). En base a ello, y haciendo uso de células JK transfectadas con TC21 y PH-Akt (dominio de Akt que se une a los productos PI(3,4,5)P<sub>3</sub>), pudimos ver la colocalización de ambas construcciones en la interfase entre la célula T y la CPA, mostrando la relación descrita previamente (Delgado et al., 2009a) entre PI3K y TC21 (Fig. R16 C, vídeo 13).

Para probar el posible papel de PI3K y sus productos en la internalización mediada por el TCR contactado por bolas de látex, tratamos las células JK con inhibidores de PI3K clase I (LY294002 y Wortmanina) antes de ponerlas

**Fig.R16****Proceso fagocítico mediado por el TCR presenta características de procesos fagocíticos clásicos**

- A** La fagocitosis iniciada por el TCR es dependiente de la polimerización de actina. Células JK se incubaron durante 30 min a 37° C con Citocalasina D (1 μg/ml). Posteriormente se incubaron durante 30 min a 37° C con bolas de látex de diferentes tamaños (1, 3 y 6 μm) recubiertas de anti-CD3 (OKT3). Se calculó el porcentaje de fagocitosis mediante el cociente de bolas dentro dividido por las bolas adheridas a la membrana.
- B** Las bolas fagocitadas colocalizan en zonas próximas de la membrana con actina polimerizada y con el TCR. Linfoblastos humanos se incubaron durante 60 min con bolas de 1 μm recubiertas de anti-CD3 (OKT3). Posteriormente se tiñeron con anti-CD3ζ y con faloidina para ver la actina cortical de la membrana. Se muestra la reconstrucción ortogonal de los ejes.
- C** Se sintetiza una gran cantidad de PI(3,4,5)P3 en la SI que permite el reclutamiento de Akt mediante su dominio PH. TC21 y Akt colocalizan en esas regiones de la membrana que está en contacto con la CPA. Células JK transfectadas con TC21-GFP y PH-Akt-Dsred se estimulan con células Raji cargadas con SEE. Se muestran diferentes tiempos de experimentos de video-microscopía (Video 13).
- D** El proceso fagocítico es dependiente de PI3K y del tamaño de la partícula a fagocitar. Células JK fueron tratadas con diferentes concentraciones de Wortmanina y de LY294002 durante 30 min a 37° C. A continuación, las células se pusieron en contacto con bolas de látex de tamaños 1, 3 y 6 μm, recubiertas con OKT3 y se incubaron durante 30 min. Posteriormente la entrada se cuantificó por citometría representado el % de fagocitosis como el cociente entre el % de las células con bolas dentro dividido entre el % de las células con bolas adheridas.

en contacto con diferentes tamaños de bolas (Fig. R16 D). La entrada fue cuantificada por citometría de flujo, y se detectó una clara inhibición del proceso, que se acentuaba al aumentar el tamaño de la bola a fagocitar.

### Las partículas fagocitadas se encuentran en compartimentos correspondientes a Cuerpos Multivesiculares

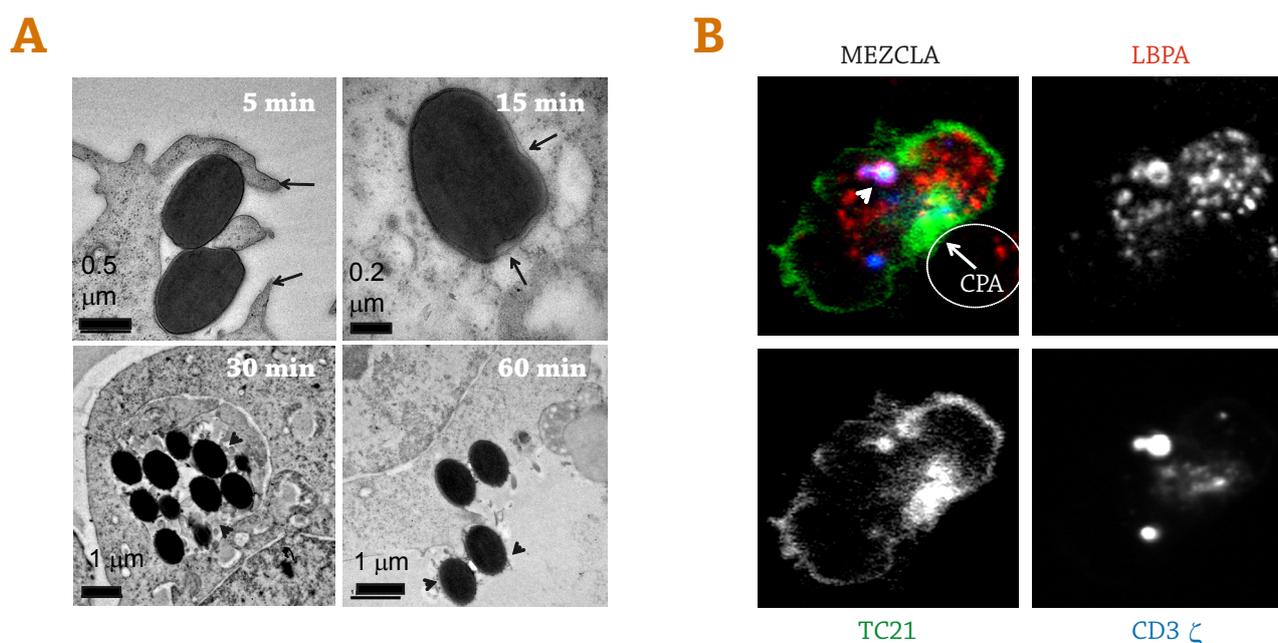
Tras un proceso de internalización mediado por una ruta fagocítica, la carga de los fagosomas recién creados sufre un proceso de maduración cuyo destino puede ser el recicla-

je o la degradación en lisosomas. Durante este proceso el ligando fagocitado va incluido en cuerpos vesiculares que van adquiriendo, por procesos de fusión/fisión características nuevas que determinan su destino.

Una vez demostrada la capacidad de las células T de llevar a cabo un proceso fagocítico a través del TCR, se quiso saber si las bolas se encontraban en el interior celular rodeadas de membrana. Para esto utilizamos la técnica de microscopía electrónica para visualizar las bolas internalizadas en células JK (Fig. R17 A).

A tiempos tempranos (5 min. Fig. R17

113



## Fig. R17

Las bolas de látex interiorizadas por las células T a través del TCR, están recubiertas de membrana en el interior celular y pasan por la estructura de cuerpos multivesiculares

**A** **Descripción de la internalización de las bolas por microscopía electrónica.** Células JK se pusieron en contacto con bolas de látex de 1 μm (OKT3) durante diferentes tiempos, y posteriormente se prepararon las muestras para microscopía electrónica.

A los 5 min las bolas están siendo englobadas por extensiones de membrana señaladas en la micrografía con flechas. A los 15 min las bolas están en el interior celular englobadas en una vesícula membranosa como señalan las flechas.

A los 30 min se pueden encontrar acúmulos de diferente número de bolas en estructuras que asemejan cuerpos multivesiculares, por la presencia de vesículas indicadas con cabezas de flecha, rodeadas por una membrana limitante externa.

A los 60 min, se pueden encontrar bolas externas recubiertas por membrana indicada con cabezas de flecha.

**B** **El TCR internalizado por el proceso dependiente de TC21 se acumula en CMV.** Células JK transfectadas con CD3ζ-YFP y TC21-CFP se incubaron con células Raji cargadas con SEE, durante 30 min. Tras esta estimulación, las células se tiñeron con LBPA, lípido intracelular característico de los CMV.

A) se pudo apreciar claramente que las bolas estaban en contacto directo con la membrana plasmática, apreciándose extensiones de membrana (indicadas con una flecha) típicas de la fagocitosis mediada por FcR $\gamma$ . Esta fagocitosis parece seguir un modelo “Zippering”, frente a la fagocitosis que sigue el modelo “Sinking” donde la partícula a fagocitar simplemente se hunde en la membrana contactada sin necesidad de extensiones de membrana (Aderem and Underhill, 1999). A tiempos más largos (Fig. R17 A 15, 30 min), se pudo apreciar que las bolas estaban dentro del citoplasma celular en compartimentos membranosos (flechas), donde varias bolas han convergido en estructuras que se asemejan a CMV, donde se puede apreciar una membrana más externa conteniendo un gran número de vesículas (indicadas con cabeza de flechas) junto con las bolas interiorizadas.

Cuando el tiempo de incubación era mayor (1 h, Fig. R17), se pudieron llegar a encontrar bolas en el medio extracelular, con membranas adheridas a su superficie (cabeza de flecha), lo que indica que estas bolas han sido interiorizadas en la célula y posteriormente han salido de nuevo. Esta última observación es acorde con una de las características o funciones de los CMV: la de fusionar a la membrana plasmática la membrana más externa de la vacuola que contiene las múltiples vesículas internas y permitir la expulsión de éstas al exterior celular (exosomas) (Kleijmeer et al., 2001).

La colocalización del TCR y de TC21 con marcadores de CMV maduros (LBPA) por microscopía confocal, donde células JK se estimularon con Raji, no hizo más que confirmar que

seguramente, uno de los destinos intermedios del proceso de fagocitosis del TCR son los CMV (Fig. R17 B).

### 3.3. La fagocitosis iniciada por el TCR requiere de la correcta actividad de TC21 y RhoG.

Una vez se caracterizó la capacidad fagocítica de las células T a través del TCR, se planteó la posibilidad de que dicho proceso pudiese estar relacionado con la internalización del TCR desde la SI mediada por TC21 y RhoG, proceso descrito como independiente de clatrina.

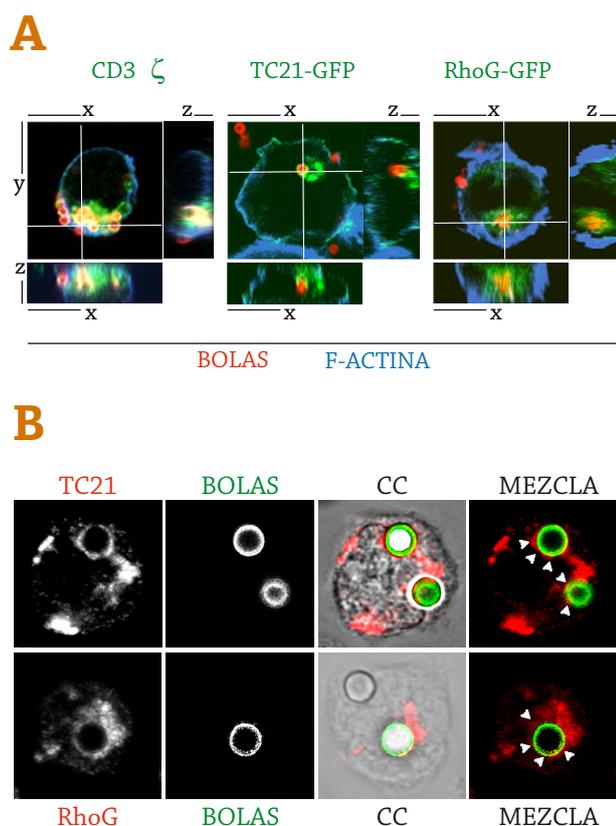
#### **Las proteínas TC21 y RhoG están localizadas en los mismos compartimentos que las bolas de látex al ser fagocitadas**

Se estudió la localización de TC21 y RhoG en el interior celular, en relación al proceso fagocítico de las bolas de látex a través del TCR. Tanto usando células JK donde se sobreexpresaron las proteínas de interés fusionadas a GFP (Fig. R18 A), como en el caso de las muestras preparadas para ver las proteínas endógenas de estas células teñidas con anticuerpos específicos para TCR, TC21 y RhoG (Fig. R18 A y B), se pudo apreciar que el TCR y las dos GTPasas se encontraban en contacto con las bolas fagocitadas por la célula.

Estos resultados sugirieron la posible relación entre el proceso de fagocitosis mediado por el TCR y las GTPasas TC21 y RhoG.

#### **El proceso fagocítico mediado por el TCR, depende de TC21 y RhoG**

Se realizaron experimentos para cuantificar el proceso de fagocitosis mediante ci-

**Fig. R18**

**TC21, RhoG y el TCR se encuentran en el mismo compartimento celular que bolas de látex que han sido fagocitadas desde la membrana**

**A** Las bolas de látex están asociadas con las proteínas de fusión TC21-GFP y RhoG-GFP. Células JK transfectadas con TC21-GFP o con RhoG-GFP fueron incubadas con bolas de látex CRIMSON de 1  $\mu\text{m}$  recubiertas de anticuerpo anti-CD3 (OKT3) durante 60 min. Se tiñeron con faloidina para visualizar la actina cortical. Se muestran también células JK sin transfectar estimuladas con las mismas bolas durante 60 min, y posteriormente teñidas para ver el TCR endógeno con un anticuerpo específico (448 anti CD3 $\zeta$ ). Se muestran los diferentes planos ortogonales para evidenciar que las bolas están dentro de la célula.

**B** Las bolas de látex se localizan también con las proteínas endógenas TC21 y RhoG de la célula JK. Células JK sin transfectar se pusieron en contacto con bolas de 3  $\mu\text{m}$  (Yellow Orange, YO) recubiertas de anti-CD3 (OKT3) durante 30 min. Posteriormente se realizó la tinción con anticuerpos específicos para TC21 y RhoG.

115

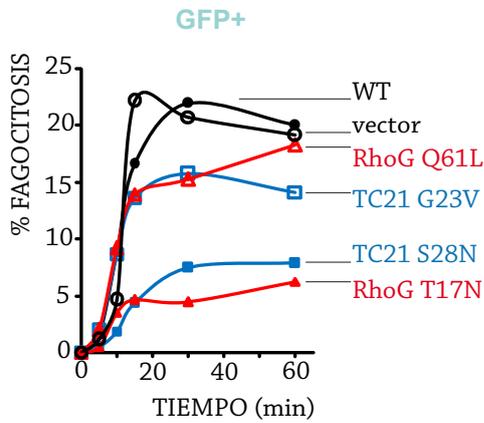
tometría de flujo, para medir la capacidad fagocítica de células JK transfectadas con las diferentes formas (silvestre, constitutivamente inactiva y constitutivamente activa) de las proteínas TC21 y RhoG fusionadas a GFP. Estos experimentos mostraron una dependencia de la capacidad fagocítica, de la actividad de ambas proteínas, al verse drásticamente inhibida dicha competencia en el caso de las formas constitutivamente inactivas (TC21 S28N y RhoG T17N) (Fig. R19 A) e inhibida, aunque menos, en presencia de las formas constitutivamente activas (TC21 G23V y RhoG Q61L). Esto último indica que TC21 y RhoG deben poder ciclar entre las formas GDP y GTP para que se concluya el proceso, como ocurre en otros procesos fagocíticos (Lerm et al., 2007).

Al estar usando proteínas fusionadas a

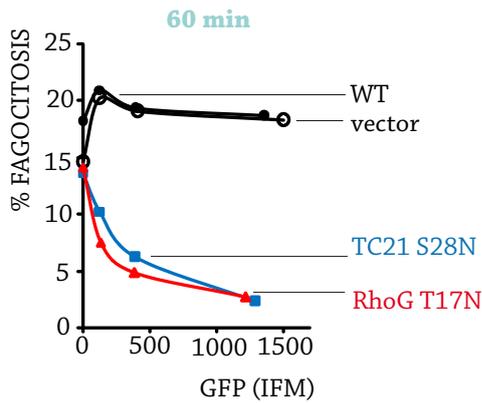
GFP, se pudo ver la relación entre el nivel de expresión de las proteínas constitutivamente inactivas y la inhibición. Así aquellas células que tenían mayores niveles de expresión de la proteína mutada (altos niveles de intensidad media de fluorescencia, IMF) presentaban una mayor inhibición de la fagocitosis (Fig. R19 B). Esta relación no se apreciaba en el caso del vector con la proteína silvestre o el vector vacío.

Ante el posible problema que la sobreexpresión de proteínas de fusión puede causar en este tipo de experimentos, se probó la misma capacidad fagocítica en células primarias de ratón procedentes de ratones carentes de TC21 (RRas2  $-/-$ ) o RhoG (RhoG  $-/-$ ). En ambos casos se obtuvo el mismo resultado: TC21 y RhoG son necesarias para la fagocitosis de bolas de látex promovida por el TCR (Fig. R19 C).

A



B



C

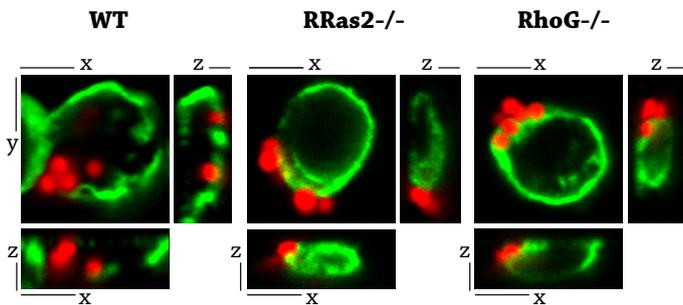


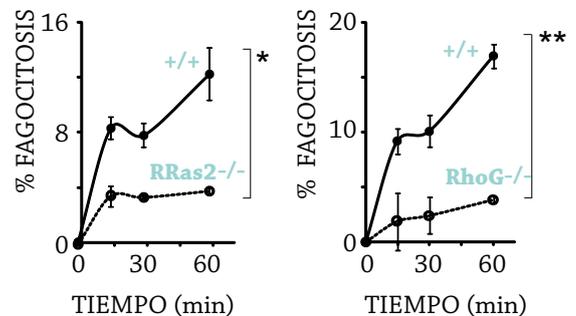
Fig. R19

La fagocitosis a través del TCR es dependiente de TC21 y RhoG

**A** La correcta actividad de las proteínas TC21 y RhoG es necesaria para la fagocitosis por el TCR. Células JK transfectadas con las diferentes formas de TC21 (la forma silvestre WT, dominante negativa S28N o constitutivamente activo G23V) y de RhoG (versión silvestre WT, dominante negativa T17N o constitutivamente activa Q61L) se pusieron en contacto con bolas de látex CRIMSON (rojas) de 1  $\mu\text{m}$  recubiertas de anti-CD3 (OKT3) por tiempos diferentes. La entrada de las bolas se cuantificó mediante citometría de flujo según el cociente de bolas dentro/fuera en la población GFP positiva.

**B** El nivel de inhibición del proceso fagocítico, es proporcional al nivel de expresión de las proteínas mutadas. Se cuantificó en el caso de 60 min, la capacidad fagocítica en diferentes poblaciones de las células transfectadas, en función de la intensidad media de fluorescencia para GFP. Como controles siempre tenemos células transfectadas con el vector silvestre (WT) y con el vector vacío (Vector).

**C** La capacidad fagocítica está inhibida en células de ratón deficientes en TC21 (RRas2<sup>-/-</sup>) o RhoG (RhoG<sup>-/-</sup>). Células de ganglios linfáticos de ratón (+/+, RRas2<sup>-/-</sup> o RhoG<sup>-/-</sup>) se incubaron con bolas CRIMSON (rojas) de 1  $\mu\text{m}$  recubiertas de anti-CD3 (145-2C11) durante 60 min. Luego se procesaron para microscopía confocal, tiñendo para ver la actina cortical (verde) y con ello la entrada de las bolas. Paralelamente, estas mismas células se incubaron varios tiempos con las bolas CRIMSON (1  $\mu\text{m}$ ) y se cuantificó, por citometría, el porcentaje de fagocitosis según el cociente de bolas dentro/fuera. Cada dato representado muestra la media y desviación típica de 3 experimentos diferentes. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,005$ . (Test de Mann-Whitney bidireccional).



## 4. La ausencia de TC21 y RhoG se traduce en un sostenimiento de las señales tempranas

La función de la SI ha sido cuestionada en numerosos trabajos (Davis and Dustin, 2004). Actualmente, parece coger peso la idea de que un péptido agonista presentado por CPH, señala a través de TCR presentes en grupos de 10-20 receptores (nanoclusters). Se piensa que la señalización se inicia en la zona distal de la SI (dSMAC) rica en actina (Campi et al., 2005; Krummel et al., 2000) y que dichos agregados van convergiendo en el cSMAC, donde la activación cesa y los receptores son destinados a procesos degradativos, lo que explica la presencia de CMV en la zona (Varma et al., 2006). En una situación normal los MC recién formados en la periferia solo tardan unos 2 min en converger en el cSMAC, y cualquier proceso que modifique este correcto transporte hacia el centro de la estructura, modifica la respuesta celular, dando lugar a una activación aumentada y mantenida con el tiempo (Andre et al., 1997; Mossman et al., 2005; Vardhana et al., 2010). Si el transporte de los MC al cSMAC y la internalización del receptor desde este punto son necesarios para la correcta finalización de la activación, el bloqueo del TCR en la SI, causado por la ausencia de TC21 y RhoG debería dar lugar a un incremento de la señal del TCR.

Para demostrar esta hipótesis, lo primero que se realizaron fueron estudios de los sucesos más proximales que tienen lugar tras el contacto del antígeno con la célula T (Nel, 2002). Tales sucesos incluyen la fosforilación

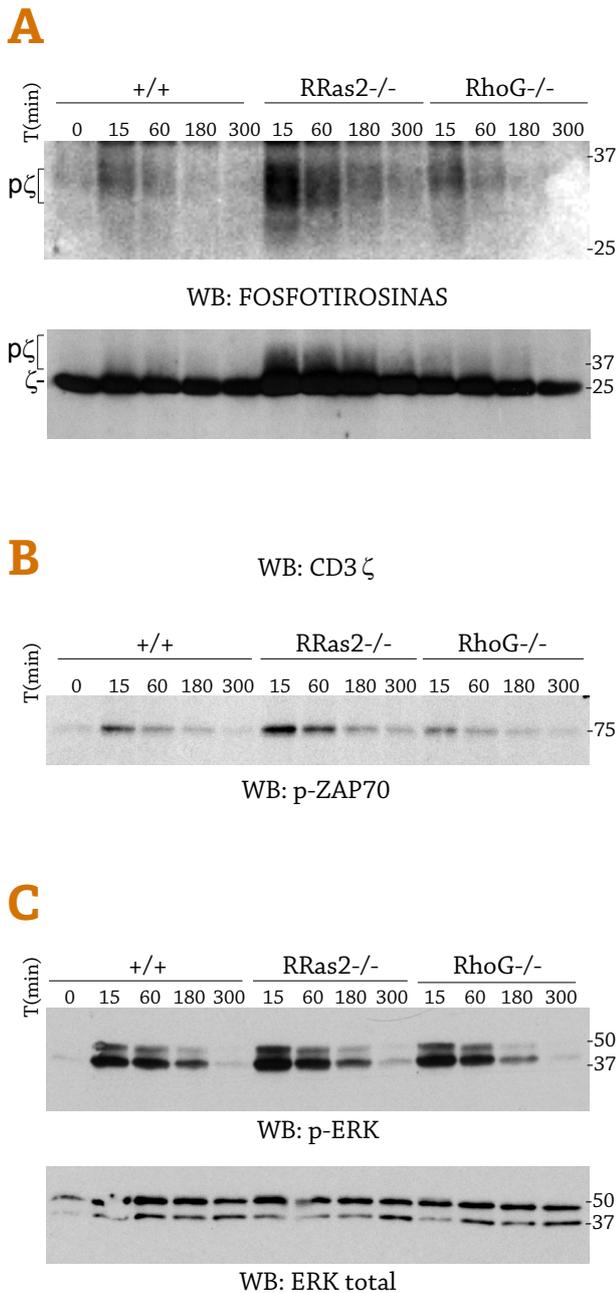
de los ITAM ((D/E)XXYXXL(X)<sub>6-8</sub>YXXL) mediado por quinasas Src, y la unión y posterior fosforilación de Zap70. La cantidad de tirosinas fosforiladas de los ITAM (hay 10 en las cadenas citoplasmáticas del TCR) depende de la calidad del antígeno, pudiendo detectarse por SDS-PAGE diferentes tamaños de  $\zeta$  en función del grado de fosforilación. Tras esta ola de fosforilaciones se inicia la movilización de calcio y con ello la activación de múltiples rutas como la activación de la familia Ras y MAPK, y la activación transcripcional de múltiples genes (p. ej. IL2).

Se observó que la fosforilación de CD3 $\zeta$  y de Zap70 estaba incrementada en la ausencia de RhoG y sobretodo de TC21 (Fig. R20).

También comprobamos cómo se afecta la fosforilación de ERK; mostrando que en las células carentes de TC21 y RhoG se producía un ligero incremento en dicha fosforilación (Fig. R20 C).

Para estudiar el efecto en señalización más tardía, estimulada por la activación del TCR, se recurrió a la detección de los niveles de CD69 e IL2 producida tras 24h, y la proliferación tras 72 h. Para ello se estimularon células T no transgénicas con bolas de látex de diferentes tamaños (1, 3, 6  $\mu$ m), o células T transgénicas para el TCR AND con el péptido específico MCC presentado por DCEK (Fig. R21 y Fig. R22).

En el caso de usar las bolas de látex como



**Fig. R20** **Procesos tempranos tras la activación del TCR modificados por la ausencia de TC21 y RhoG**

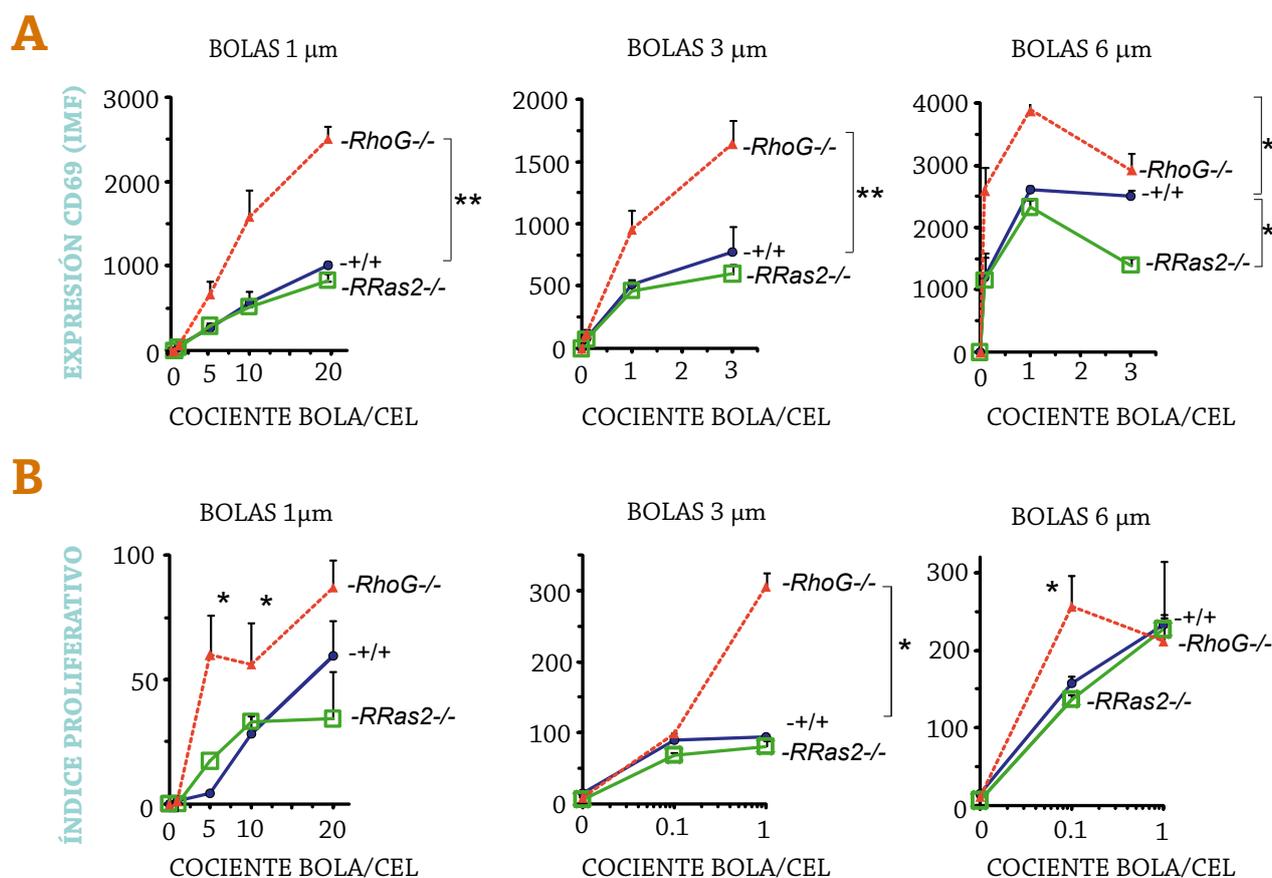
Lisados celulares correspondientes a diferentes tiempos de estimulación de Células T AND (+/+, RRas2<sup>-/-</sup>, RhoG<sup>-/-</sup>) con DCEK (10  $\mu$ M de MCC). Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se inmunodetectaron por Western Blot hibridando con anticuerpos específicos (indicados en la figura). A la derecha de cada gel se indica el tamaño correspondiente de los marcadores de peso molecular.

estímulo (Fig. R21), la incapacidad de internalizar las bolas por parte de la célula T, se traduce, en el caso de las células carentes de RhoG (RhoG<sup>-/-</sup>) en una mayor estimulación, reflejada en valores más altos de CD69 (24 h) y un índice proliferativo mayor (72 h).

La diferencia entre células silvestres y células carentes de RhoG se vió disminuida a medida que aumentaba el tamaño de la bola (p. ej. 6  $\mu$ m). La explicación de esta disminución es, probablemente, que las células T primarias no pueden internalizar con facilidad las partículas mayores, cosa fácilmente entendible si atentemos a la relación entre el tamaño de la célula y la bola (ver Fig. R13 C). Por lo tanto, las bolas quedan más tiempo en contacto con la membrana incluso en células de genotipo silvestre.

Es interesante resaltar, que esta diferencia en activación, no es extensible en este caso a las células carentes de TC21 (RRas2<sup>-/-</sup>) (Fig. R21). Esto puede ser debido a que TC21 debe estar ejerciendo, en tiempos largos, otra función en la señalización celular a través del TCR, como es el caso de su papel en supervivencia como ha sido descrito en (Delgado et al., 2009).

En el caso de células T AND estimuladas con antígeno (Fig. R22), la ausencia de TC21 y RhoG se tradujo en una estimulación exacerbada, reflejada a las 24h en mayor CD69 en membrana (Fig. R22 A) y mayor producción de IL2 en el sobrenadante celular (Fig. R22 B). Estos resultados se explican si tenemos en cuenta que al no ser internalizado el TCR desde el cSMAC, la señal es mantenida con el tiempo y eso se traduce en mayor activación. Sin embargo, los resultados del índice proliferativo a las 72 h (Fig. R22 C), es menor en ambos ca-

**Fig. R21****Células carentes de TC21 y RhoG estimuladas con bolas presentan una activación anómala**

**A** Células T (silvestres +/+, RRas2 -/- y RhoG -/-) se estimularon con bolas de 1, 3 y 6  $\mu\text{m}$  (145-2C11) durante 24 h. Se tiñeron con el anticuerpo específico para ver expresión de CD69 en membrana en la población CD4.

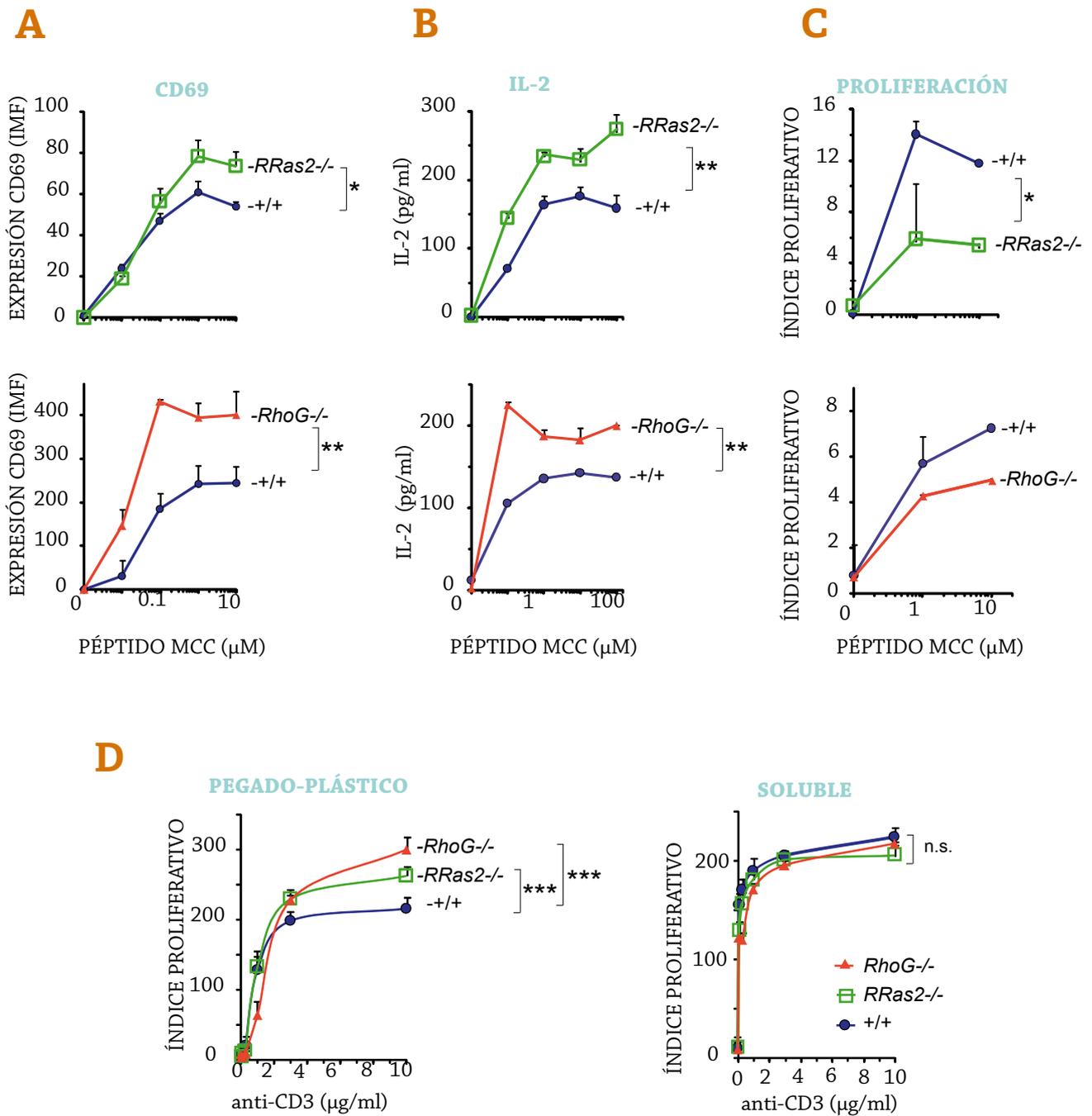
**B** Células T se marcaron con CFSE y se incubaron con las bolas de látex durante 72 h. Se analizó la fluorescencia remanente de CFSE por citometría en la población CD4.

Las medias y desviaciones típicas representadas fueron obtenidas a partir de tres grupos de datos.  $P^* < 0,05$ ,  $p^{**} < 0,005$  (Test de Mann-Whitney bilateral). Datos representativos de 3 experimentos diferentes.

tos (RRas2 -/- y RhoG -/-), y más notable en el caso de TC21 (RRas2 -/-). Este último resultado, junto con los obtenidos para células carentes de TC21 y estimuladas con bolas (Fig. R21), son un reflejo más, de que estas GTPasas deben ser requeridas para otras rutas moleculares, de manera adicional a su función en la internalización del TCR desde la SI.

Si se recurre a otro tipo de estimulación,

como es el caso de usar anticuerpo pegado a placa o soluble (internalización independiente y dependiente de clatrina respectivamente) nos muestra de nuevo la clara implicación de TC21 y RhoG en los procesos de internalización independiente de clatrina, ya que la activación solo está aumentada (en términos de índice de proliferación), cuando el estímulo fue un anticuerpo inmovilizado (Fig. R22 D).



## Fig. R22

### La ausencia de TC21 y RhoG afecta a la activación de las células T

**A/B** Células T AND transgénicas fueron estimuladas con DCEK cargadas con diferentes concentraciones de MCC. (A) Por citometría de flujo se cuantificaron a las 24 h los niveles de CD69 en membrana de las células CD4 y (B) los niveles de IL2 en el sobrenadante celular.

**C** Células T AND transgénicas marcadas con CFSE se estimularon con DCEK a diferentes concentraciones y a las 72 h se analizó el índice proliferativo en las células CD4.

**D** Células T procedentes de ratones de diferentes genotipos y marcadas con CFSE, se estimularon con anticuerpo anti-TCR (145-2C11) a diferentes concentraciones durante 72 h. El anticuerpo se presentó o soluble o pegado a placa.

Las medias y desviaciones típicas representadas fueron obtenidas a partir de tres grupos de datos.  $P^* < 0,05$ ,  $p^{**} < 0,005$  (Test de Mann-Whitney bilateral). Datos representativos de 3 experimentos diferentes.

## 5. RhoG se activa tras la estimulación del TCR por un mecanismo dependiente de TC21 y PI3K

Ya es conocida la relación estrecha que existe entre TC21 y el TCR (Delgado et al., 2009), donde TC21 se une a este receptor, actuando de nexo de unión entre el TCR y PI3K, controlando así fenómenos de supervivencia celular. Sin embargo, nada es sabido sobre la activación de RhoG a través del TCR y de su relación con TC21. Lo primero que se quiso probar, fue la relación de TC21 y PI3K ya establecida (Delgado et al., 2009a), pero esta vez, en lugar de estimular con anticuerpo soluble, se sometió a las células a una activación fisiológica (MCC presentado por DCEK) o un proceso fagocítico (bolas de látex de 1  $\mu\text{m}$  recubiertas con 145-2C11). Para ello se midió la actividad de la enzima PI3K detectando los niveles de fosforilación de Akt en presencia y ausencia de TC21, en células primarias de ratón (+/+ y RRas2 -/-) (Fig. R23 A). En ambos casos, se mostró una inhibición de la fosforilación de Akt en ausencia de TC21 (tanto en intensidad como en duración), mostrando que también, en procesos que conllevan fagocitosis del receptor estimulado, TC21 es requerido para la activación de PI3K.

Una vez demostrado que TC21 también controla la actividad de PI3K tras la estimulación del TCR, se quiso evaluar la actividad de RhoG en dichas condiciones. Para poder visualizar su activación, nos basamos en la unión descrita de RhoG en su estado GTP (activado) con la proteína ELMO (deBakker et al., 2004;

Henson, 2005). Así, se estimularon células JK a través del TCR, con bolas de látex de 1  $\mu\text{m}$  (recubiertas de anti-CD3, OKT3), con el objetivo de favorecer la ruta donde RhoG debía ejercer su papel (fagocitosis). Los lisados celulares se incubaron con la proteína GST-ELMO (extremo N terminal) unida a la matriz de glutatión sefarosa, lo que nos permitió detectar los niveles de RhoG-GTP presentes en la célula en ese momento y describir la clara activación de esta GTPasa a través del TCR (Fig. R23 B). Simultáneamente, se detectaron los niveles de ERK fosforilado, para comprobar que realmente el contacto de la bola con el TCR suponía la activación del mismo.

Teniendo en cuenta la relación de TC21 y RhoG en los procesos de fagocitosis, pensamos que ambas proteínas, al estar bajo el control del TCR, debían estar en la misma ruta de señalización. Para demostrar esta relación se midió la activación de RhoG a través del TCR en células transgénicas para el TCR (AND) carentes de TC21 (RRas2 -/-) estimuladas con DCEK cargadas con MCC (Fig. R23 C). Dicho experimento mostró que la activación de RhoG estaba parcialmente inhibida en el caso de las células deficientes en TC21.

Para poder relacionar ambas proteínas en el contexto de una ruta de señalización, se recurrió a las relaciones conocidas de la proteína RhoG en otros sistemas, donde está implicada en procesos de migración y fagocitosis.

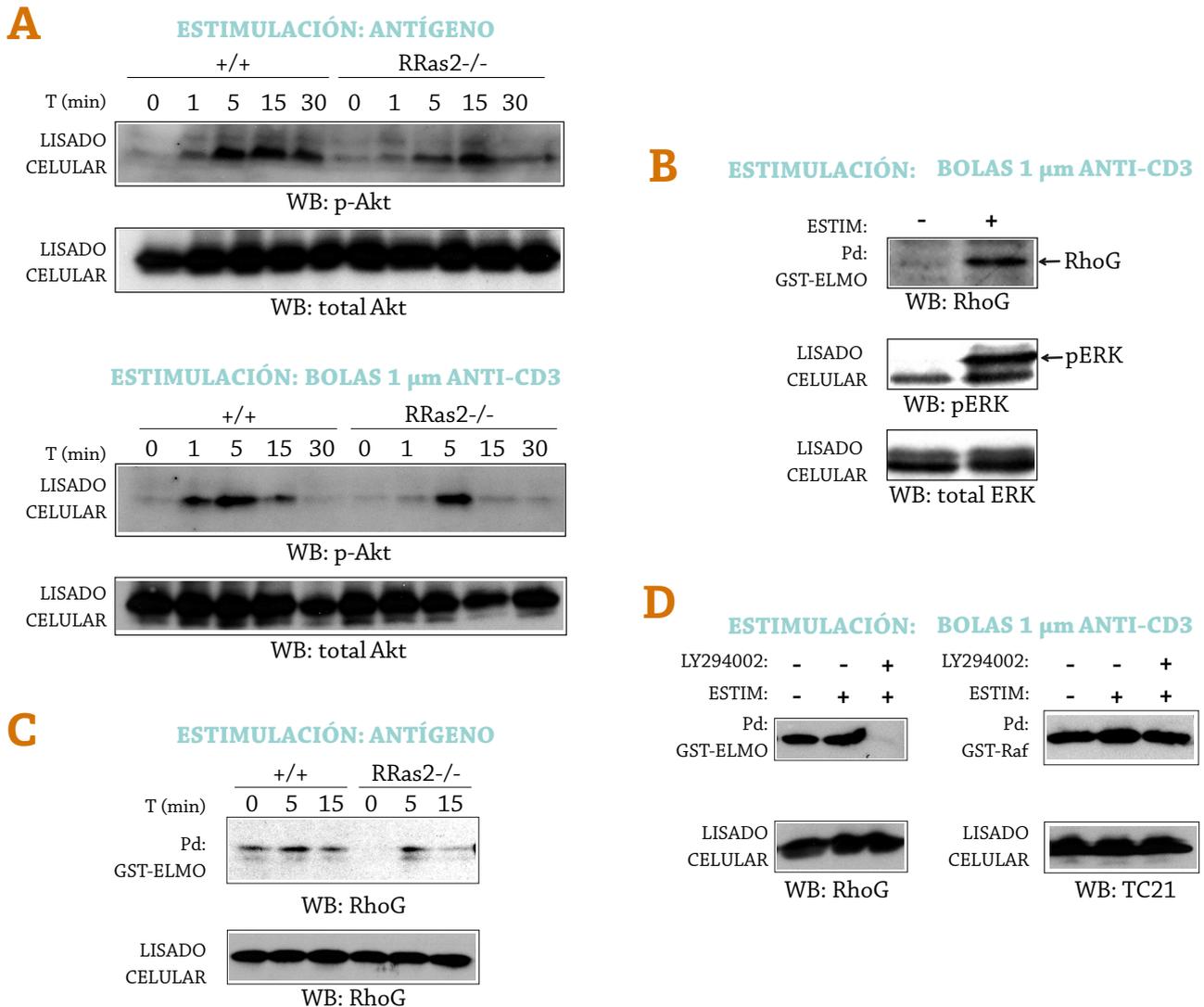


Fig. R23

### RhoG es activado a través del TCR por un mecanismo dependiente de TC21 y PI3K

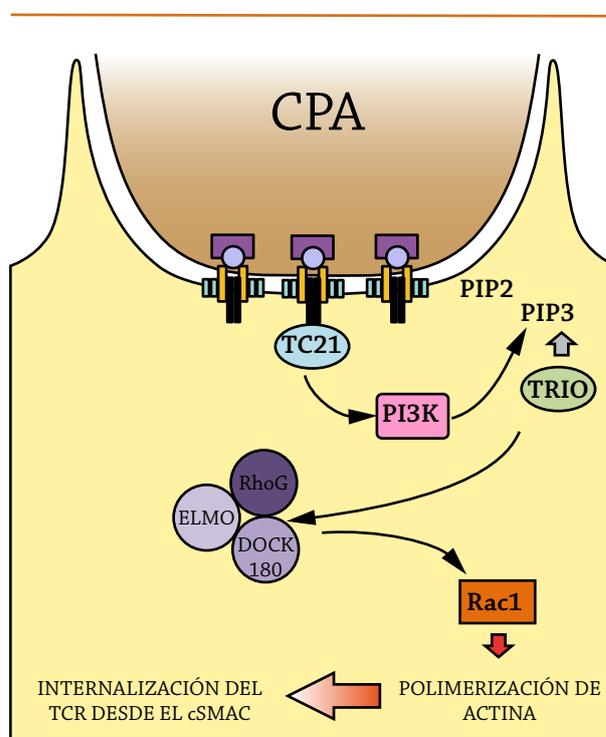
- A** La activación de PI3K por el TCR es TC21 dependiente. Células AND transgénicas de los genotipos indicados fueron estimuladas durante diferentes tiempos con péptido MCC (10 μM) presentado por DCEK o con bolas de látex de 1 μm recubiertas con anti-CD3 (145-2C11). Las células se lisaron y las proteínas totales se procesaron por SDS-PAGE y por western blot, para detectar los niveles de Akt fosforilado hibridando con un anticuerpo específico.
- B** RhoG se activa tras la estimulación del TCR con bolas de látex. Células JK se estimularon durante 2 min con bolas de látex recubiertas con anti-CD3 (OKT3) en una proporción de 40:1 (bolas:célula). Los lisados celulares se sometieron a un Pull-Down (Pd) con proteína GST-ELMO unida a glutatión-sefarosa. La cantidad de RhoG unido a ELMO se determinó tras separar las proteínas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y transferirlas a una membrana de nitrocelulosa la cual se hibridó con el anticuerpo específico anti RhoG.
- C** La estimulación de RhoG mediada por el TCR es TC21 dependiente. Células primarias de ratón silvestres o carentes de TC21 (RRas2<sup>-/-</sup>) fueron estimuladas con células DCEK cargadas con MCC durante diferentes tiempos. Tras obtener los lisados celulares e incubarlos con GST-ELMO se comprobó por western blot la cantidad de RhoG activo presente.
- D** La activación de RhoG por el TCR es PI3K dependiente. Células primarias de ratón fueron estimuladas con bolas de 1 μm recubiertas con anti-CD3 (145-2C11) en una proporción de 20:1 (bolas/célula) durante 5 min en presencia o ausencia del inhibidor LY294002 a 50 μM (las células se preincubaron durante 30 min con el inhibidor). Tras la estimulación, se procesaron las células para obtener los lisados celulares y proceder con un Pull-down (Pd) usando GST-ELMO. Se detectó la cantidad de RhoG unido a ELMO por western blot.

TRIO ha sido descrita como la GEF de RhoG en procesos fagocíticos y de migración (deBakker et al., 2004; Henson, 2005). Dada la conexión entre RhoG, TRIO y los fosfatidilinositoles (TRIO presenta dominios PH), nos planteamos la posible implicación de la enzima PI3K en todo este proceso. La relación directa entre la activación de PI3K y RhoG, no ha sido nunca demostrada, aunque sí la relación de PI3K con la actividad de Rac. Para estudiar esta posible relación, se analizó la activación de RhoG a través del TCR en presencia del inhibidor de PI3K LY249002. Se usaron células primarias de ratón estimuladas con bolas de látex de 1  $\mu\text{m}$  (recubiertas de 145-2C11) para promover con ello la implicación de la ruta que está bajo el control de la fagocitosis. En estas condiciones se vio que la unión a ELMO de RhoG, tras la estimulación, estaba totalmente inhibida (Fig. R23 D), sin embargo la activación de TC21 (medida por su unión al dominio RBD de Raf) no se veía afectada. Estos resultados suponen la primera demostración de que la activación de RhoG está bajo el control de PI3K. Además, corroboran que TC21 está por encima de esta enzima, ya que su activación no se vio afectada.

Dada la dependencia de RhoG de la actividad de PI3K, y la existencia de un control de la actividad de RhoG por parte de TC21, se puede plantear una posible ruta molecular donde el paso final es la polimerización de actina mediada por Rac. Este paso se llevaría a cabo por la unión de RhoG, una vez activado, a ELMO y a Dock180, formando un complejo trimérico que permite la función de Dock180, el cual es un GEF descrito para Rac (deBakker et al., 2004; Henson, 2005).

En base a todas las relaciones proteicas presentadas, el modelo que se plantea (Fig. R24) se basa en la interacción de la célula T con la CPA, donde los TCR contactados convergen todos en el cSMAC, promoviendo la activación de PI3K y RhoG a través de la activación de TC21. Todo esto lleva a la polimerización de actina y a la internalización desde ese punto de los TCR, dicho proceso permite la internalización de las bolas de látex, cuando es éste el estímulo utilizado.

123



**Fig. R24** Modelo en el que se integra a TC21 y RhoG en una ruta fagocítica iniciada por la activación a través del TCR

La unión del TCR con el péptido presentado por el CPH y la posterior activación da lugar a la formación de la SI donde el TCR y los CPH convergen en el centro de la estructura (cSMAC). La activación de TC21 por el TCR da lugar al reclutamiento directo de p110 $\delta$ , subunidad de PI3K. Esta enzima fosforila fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato (PI(4,5)P2) a fosfatidilinositol (3,4,5) trisfosfato (PI(3,4,5)P3), aumentando la concentración de este último en la zona. TRIO a través de estos productos y de la unión de su dominio DH/PH activa a RhoG, el cual crea un complejo trimérico con ELMO-Dock180. Éste último es un GEF para Rac, el cual es activado y promueve la polimerización de actina necesaria para iniciar la internalización de los TCR contactados, por un proceso fagocítico.

## 6. TC21 y RhoG median el proceso conocido como Trogocitosis

124

A pesar de la clara evidencia de la capacidad fagocítica mediada por el TCR, no se pretende con ello, presentar a las células T como posibles células fagocíticas en el complejo funcionamiento del sistema inmune. La herramienta de las bolas de látex y el seguimiento del proceso fagocítico, ha permitido, hasta el momento, implicar a TC21 y RhoG en un proceso de internalización del TCR desde la sinapsis, donde ambas proteínas estarían controlando una ruta de endocitosis independiente de clatrina, y que permite la internalización de partículas de gran tamaño (ruta fagocítica en cuanto a características y moléculas implicadas). Sin embargo, es interesante plantearse qué están internalizando estos TCR (de manera TC21 y RhoG dependiente) cuando en lugar de estar en contacto con la bola de látex, están en estrecha comunicación con la CPA, formando la SI.

En múltiples ocasiones se ha descrito un proceso denominado Trogocitosis (del griego Trogo que significa “mordisquear”) (Ahmed et al., 2008). Dicho fenómeno se caracteriza por la transferencia de material de una célula a otra. Se ha encontrado en diferentes tipos de interacciones entre las células del sistema inmune. Sin embargo, uno de los más estudiados es el transporte desde la CPA a la célula T (Hudrisier and Bongrand, 2002).

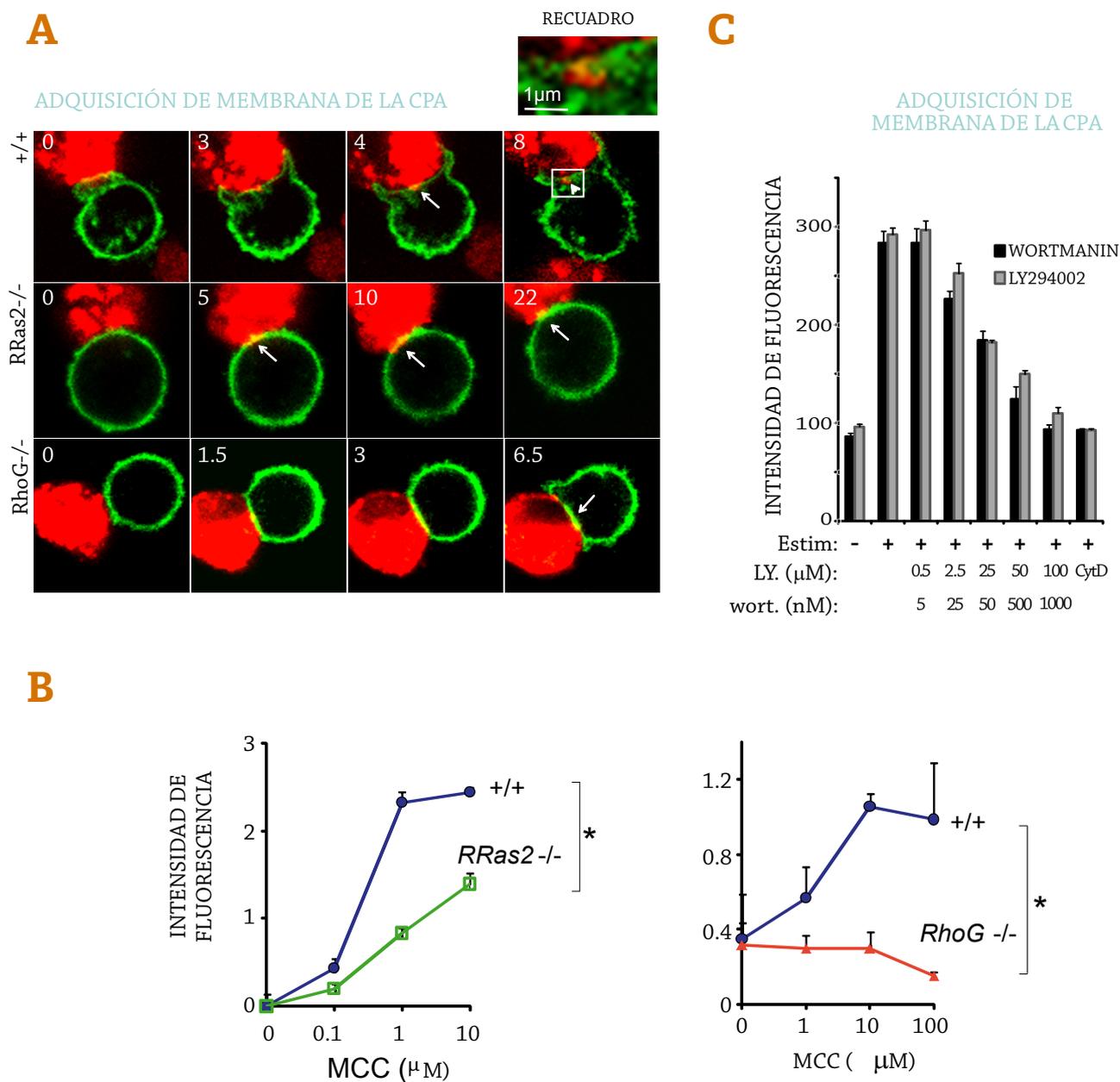
Hasta el momento, no se conoce cuál es la ruta molecular que permite la internaliza-

ción del TCR junto con el material de la CPA. Se piensa, que el contacto entre ambas células en la zona dSMAC y el transporte de los MC hacia el cSMAC, conlleva también el transporte de los CPH hacia el centro de la estructura, donde convergen y de alguna manera, son internalizados desde ahí al interior celular, debido en parte a una fuerza creada por el citoesqueleto de actina, que permite la escisión del material de la CPA.

Dada la capacidad de las células T de interiorizar bolas de grandes tamaños a través del TCR y la participación de actina en este proceso, quisimos saber si el papel de TC21 y RhoG en la fagocitosis de bolas, reflejaba una función de estas proteínas en el proceso trogocítico.

### 6.1. La adquisición de fragmentos de membrana de la CPA está mediado por TC21 y RhoG

Para poder visualizar y analizar la adquisición del material de la CPA por parte de la célula T a través de la SI, se usaron células T AND (+/+, RRas2 -/- y RhoG -/-) transducidas con CD3ζ-GFP (nos permite seguir la formación de la SI en el tiempo) en contacto con células DCEK marcadas con el fluorocromo lipofílico PKH26 (rojo) y cargadas con MCC. Los conjugados se visualizaron por vídeo-microscopía, adquiriendo las imágenes cada 30 seg, ya que el proceso es muy rápido (Fig. R25 A). Se pudo



125

## Fig. R25

### TC21 y RhoG median el proceso trogocítico

#### A/B TC21 y RhoG controlan la incorporación de material de membrana de la célula CPA.

**A** **Vídeo-microscopía de células T transducidas con CD3 $\zeta$ -GFP.** Estas células se pusieron en contacto con células DCEK marcadas con PKH26 y cargadas con MCC (10  $\mu\text{M}$ ). La formación de la SI y la incorporación de vesículas a través de dicha estructura se siguieron a lo largo del tiempo. Las flechas indican la acumulación de CD3 $\zeta$ -GFP en el punto de contacto con la CPA, la cabeza de flecha indica la aparición de vesículas ricas en material de la CPA. El recuadro indica la imagen ampliada. (Vídeos: +/+ 14, RRas2 -/- 15, Rho G -/- 16)

**B** **Cuantificación por citometría de flujo, de la incorporación de la membrana de la CPA en la célula T.** Células T AND de los genotipos indicados, se pusieron en contacto con células DCEK cargadas con diferentes concentraciones de MCC y marcadas con PKH26. Se midió la fluorescencia media del material de membrana en la población CD4 de las células T.

**C** **El proceso trogocítico requiere de la polimerización de actina y de la actividad PI3K.** Células incubadas con el inhibidor de la polimerización de actina (Citocalasina D, Cit D) o con los inhibidores de PI3K (LY 294002, LY o Wortmanina, Wort) se pusieron en contacto con DCEK cargadas con MCC (10  $\mu\text{M}$ ) y marcadas con PKH26. Se representa la fluorescencia correspondiente a la membrana de las CPA en la población de célula T CD4 analizadas por citometría de flujo.

observar cómo a través de la sinapsis se adquirirían trozos de membrana procedentes de la CPA, visualizándose pequeños fragmentos (0,5-1  $\mu\text{m}$ ) de membrana (Fig. R25 A) (vídeo 14). Además y de forma importante, este fenómeno no se percibía en el caso de las células carentes de ambas GTPasas, donde se formaba la SI (Fig. R25 A. Vídeos 15 y 16), pero no aparecían vesículas como en el caso de las células de genotipo silvestre.

El mismo resultado se obtuvo en experimentos realizados con células T CD8 procedentes de ratones transgénicos OT1 (células T transducidas con CD3 $\zeta$ -GFP, estimuladas con CPA marcadas con PKH26 y cargadas con OVA<sub>p</sub>). (Vídeos 20, 21 y 22).

Para poder hacer un análisis más cuantitativo, se examinó este proceso trogocítico por citometría de flujo, representando los niveles de fluorescencia correspondientes a la membrana de la CPA (IMF de FL2), en la población CD4 de las células T AND (Fig. R25 B). La comparación entre las células silvestres y las células carentes de TC21 o RhoG, mostró de nuevo la implicación de ambas proteínas en el fenómeno trogocítico.

## 6.2. El proceso de trogocitosis requiere la correcta polimerización de actina y la actividad de PI3K

Sabiendo que la fagocitosis mediada por TC21 y RhoG, es completamente dependiente de la polimerización de actina y de la correcta actividad de la quinasa PI3K, se realizó la cuantificación del proceso trogocítico en presencia de inhibidores para ambos elementos (Fig. R25 C).

Usando Citocalasina D a 1  $\mu\text{g/ml}$  para

inhibir la polimerización de actina, se bloqueó por completo la adquisición de membrana de la CPA. En cuanto LY294002 y Wortmanina (inhibidores de PI3K) se obtuvo una inhibición del proceso dependiente de la concentración de la droga, llegando a niveles próximos a los conseguidos con la Citocalasina D cuando se usó una concentración máxima de ambos compuestos.

Los resultados expuestos hasta aquí demuestran la implicación en la trogocitosis de TC21, RhoG, PI3K y de la polimerización de actina. Estas observaciones sugieren que el proceso clásicamente conocido como trogocitosis a través del TCR, es en realidad un proceso fagocítico remanente en las células T, que se da desde el centro de la SI, una vez los TCR contactados convergen en el cSMAC.

## 6.3. En el proceso de trogocitosis/fagocitosis, TC21 y RhoG también median la adquisición y reexpresión de CPH-II

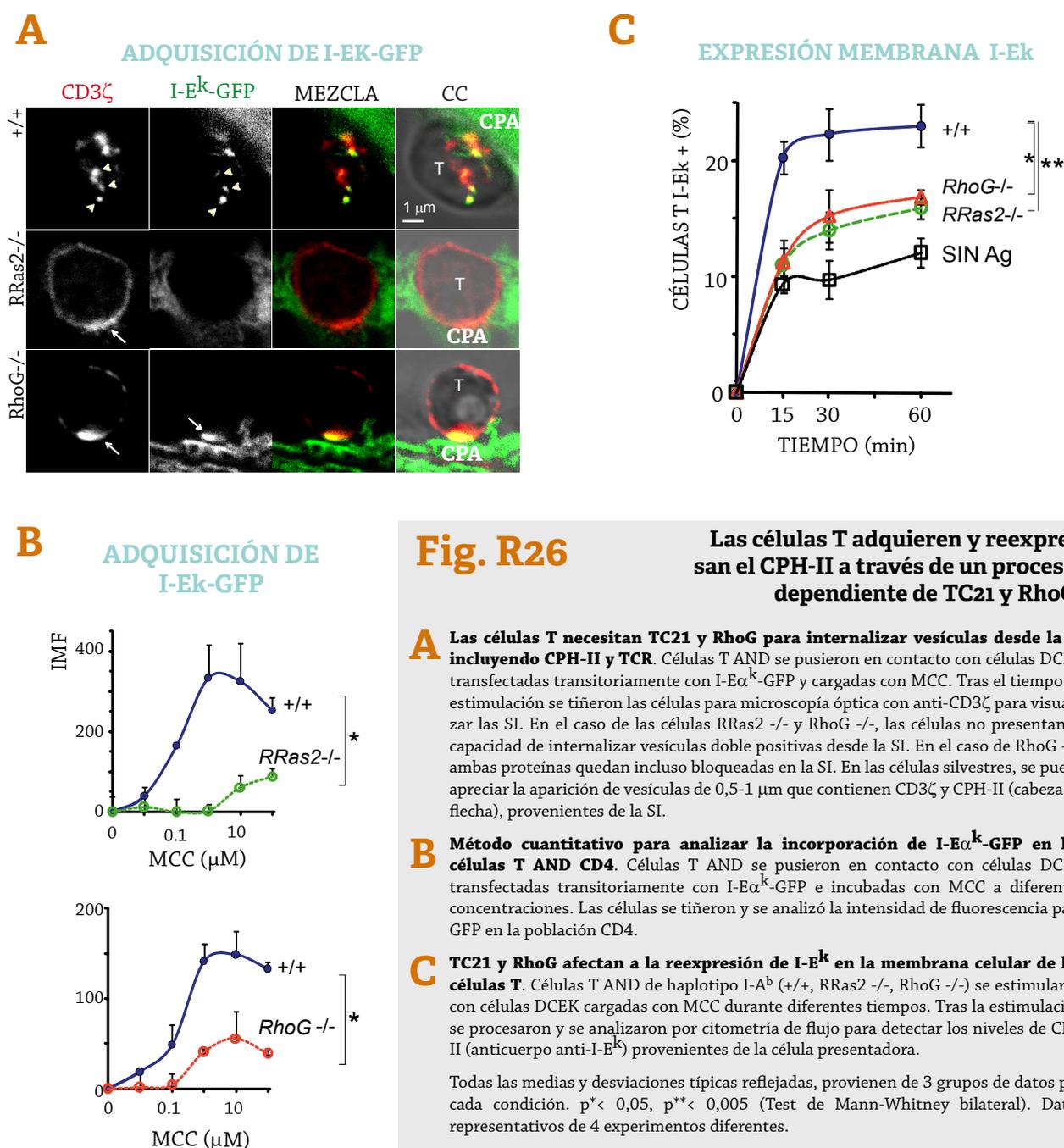
En el proceso trogocítico, se ha visto que mediante la internalización de la membrana, la célula T adquiere un grupo de proteínas específicas, las cuales se incorporan de forma mayoritaria de manera antígeno específica (He et al., 2007; Huang et al., 1999). Este grupo de proteínas son los dos tipos de CPH (I y II), B7, CD54, CD40, OX40L y 41BBL, las cuales colocalizan en la SI en el momento de estrecho contacto entre la célula T y la célula CPA (He et al., 2007). Se ha determinado, que adicionalmente al proceso trogocítico dependiente del TCR, el correceptor CD28 puede dar lugar al mismo fenómeno, pero de manera antígeno independiente, uniéndose a B7 en la célula CPA (Hwang et al., 2000).

A pesar de haber obtenido una clara in-

hibición del proceso en dependencia de la concentración del péptido presentado (Fig. R25 A y B), se vio necesario comprobar, que realmente, en el caso de las células deficientes en TC21 o RhoG, la incorporación del CPH específico, el cual es contactado por el TCR, se veía afectado, comprobando así la dependencia con la internalización del receptor. Con este objetivo, se transfectaron transitoriamente células

DCEK con I-E $\alpha^k$ -GFP, las cuales se incubaron con el péptido MCC. Dichas células se usaron para obtener conjugados con las células T AND (de diferentes genotipos), que posteriormente fueron teñidas con anti-CD3 $\zeta$  para visualizar por microscopía óptica la formación de SI. En el caso de células silvestres (+/+) se pueden apreciar vesículas positivas para el CPH-II y el TCR (Fig. R26 A, cabeza de flecha) (Huang

127



et al., 1999), indicando que ambas proteínas se internalizan conjuntamente desde la SI, en vesículas de aproximadamente 0,5-1  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, en el caso de las células que carecen de TC21 y RhoG, dicha internalización no se da, incluso en el caso de RhoG  $-/-$ , parece que ambas proteínas quedan bloqueadas colocándose en la SI.

Para obtener una cuantificación más exacta del proceso, se analizó mediante citometría de flujo la incorporación de I-E $^k$ -GFP en las células T CD4, que se pusieron en contacto con células DCEK transfectadas y cargadas con MCC a diferentes concentraciones. De nuevo, en este caso, se mostró una clara inhibición en ausencia de ambas GTPasas (Fig. R26 B), donde las células tenían una respuesta, en función de la concentración del antígeno, muy inferior a la observada para las células silvestres. Esta inhibición específica de la incorporación del CPH, indica de nuevo que TC21 y RhoG están bajo el control del proceso trogocítico mediado por el TCR cuando se internaliza desde la SI.

La capacidad trogocítica remanente que muestran las células RRas2  $-/-$  y RhoG  $-/-$  (Fig. R26 B), debe corresponderse a la internalización mediada por CD28 o a redundancia con otras GTPasas.

Conjuntamente con la descripción de la capacidad trogocítica de las células T, se ha de-

mostrado, en varios trabajos, la capacidad de reexpresar las proteínas internalizadas en su membrana (Huang et al., 1999) y de convertirse en células T-CPA para otras células T de la misma especificidad (Umeshappa et al., 2009; Xia et al., 2006; Xiang et al., 2005).

Dados los resultados que implican a TC21 y RhoG en el proceso trogocítico/fagocítico, se planteó la posibilidad de comprobar si esto se traduciría en una menor expresión de CPH-II en la membrana de los linfocitos T. Para ello se recurrió a ratones transgénicos AND, cuyas células pueden ser seleccionadas positivamente en el timo en presencia de I-E $^k$  o I-A $^b$ . Usando ratones de haplotipo I-A $^b$ , se puede detectar con facilidad la incorporación I-E $^k$  a linfocitos T I-A $^b$  positivos para un proceso de trogocitosis.

Se usaron células DCEK, las cuales presentan al péptido MCC a través del I-E $^k$ , para estimular células AND (I-A $^b$ ) con los diferentes genotipos (+/+ , RRas2  $-/-$  . RhoG  $-/-$ ). Aplicando tras la estimulación un anticuerpo anti-I-E $^k$ , se pudo detectar la adquisición y expresión de I-E $^k$  antígeno dependiente (Fig. R26 C). En ausencia de TC21 o RhoG, los niveles de expresión de I-E $^k$  fueron próximos a los obtenidos con CPA sin péptido. Esta deficiencia, por parte de las células que carecen de TC21 y RhoG, puede ser debida a la incapacidad de adquirir directamente el CPH desde la SI.

## 7. Células T como células presentadoras

### 7.1. La capacidad de presentación del antígeno por parte de la célula T está dificultado en ausencia de TC21 y RhoG

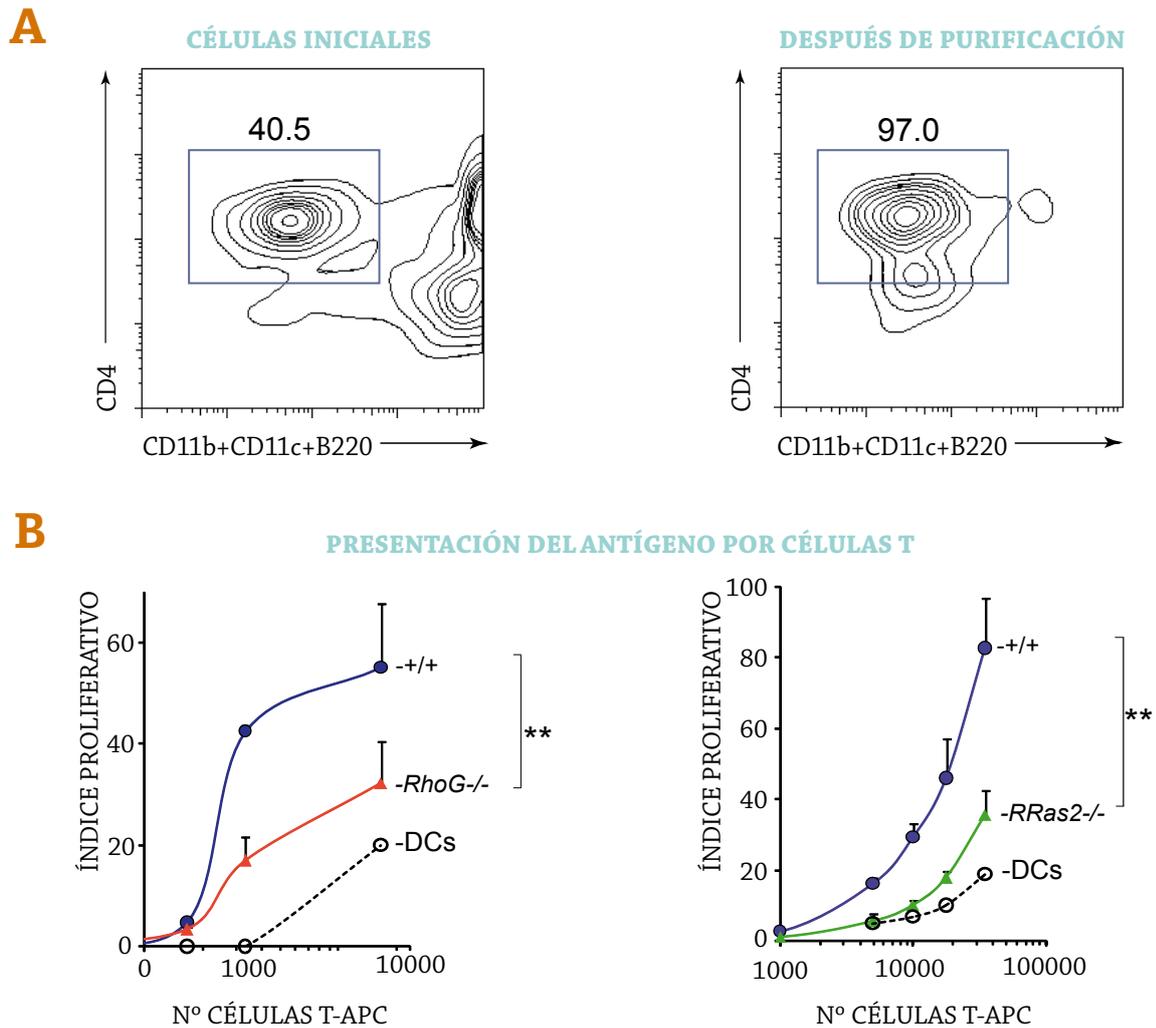
Las células T humanas activadas expresan CPH-II mientras que las células de ratón no lo hacen. Sin embargo, como hemos mostrado en la Fig. R26 sí que pueden adquirir CPH-II procedentes de las CPA. No se sabe muy bien la función que la expresión en membrana de las células T del antígeno pueda tener. Hay argumentos que apoyan un papel negativo en la respuesta contra antígeno. Primero se piensa que la capacidad presentadora de las células T debe ser muy débil, por la poca eficiencia de incorporar antígeno por parte de estas células (Tsang et al., 2003). Segundo, que pueda servir para limitar la expansión clonal al disminuir los complejos péptido-CPH de las CPA (Tsang et al., 2003). Tercero que pueda servir para eliminar células CD8 citotóxicas ya que al adquirir el péptido-CPH ellos mismos se convertirían en blanco (Umeshappa et al., 2009). Sin embargo otros autores dan un papel activador.

Para abordar el estudio de la posible función de la célula T convertida en CPA, decidimos utilizar las células deficientes en TC21 o RhoG como herramienta. Para ello, células T procedentes de ratones AND de fondo I-A<sup>b</sup> (+/+, RRas2 -/-, RhoG -/-), se incubaron con DC de fondo I-E<sup>k</sup> cargadas con MCC, con el objetivo de permitir la trogocitosis/fagocitosis de los CPH cargados con el péptido. Tras la incubación, se purificaron las células T, disgregando los conjugados formados y eliminando por tinción y posterior aislamiento con bolas mag-

néticas (Dynabeads) las células que no eran T CD4. Dicho proceso de purificación, clave para los pasos posteriores, se analizó por citometría de flujo, y se calculó la contaminación, que aunque mínima, había remanente en cada condición de células T (Fig. R27 A). Tal proceso de purificación daba lugar a una población de células T mínimamente contaminadas con DC (alrededor del 3-4 %).

Las células T-CPA CD4, se usaron para estimular células AND silvestres, y por lo tanto de la misma especificidad antigénica por el MCC, marcadas con CFSE, para seguir su proliferación. Las células T-CPA, se diluyeron para tener diferentes cocientes finales de células CPA y células respondedoras (estas últimas se pusieron en un número fijo). Esta dilución tenía como objetivo poder minimizar la cantidad de células “contaminantes” presentes en el cultivo, y conseguir ver, por tanto, la estimulación proveniente solo y únicamente de las células T-CPA. No obstante, como control del efecto de las DC contaminantes, llevamos en paralelo un experimento de estimulación de la proliferación de AND silvestres en respuesta a un número de DC cargadas con antígeno calculado en función de la contaminación de las T-CPA.

El índice de proliferación se calculó tras 4 días de estimulación por citometría de flujo. Los resultados (Fig. R27 B) mostraron que las células T silvestres inducían una activación por encima de la que causaban el número de DC teóricamente presentes en el cultivo. Sin embargo, en el caso de las células T carentes de TC21 o RhoG, la activación que causaban

**Fig. R27****Las células T como células presentadoras de antígeno**

**A** **Pureza de la población T-CPA usada para estimular células T de la misma especificidad.** Histogramas de citometría de flujo donde se representan los niveles de CD4 (canal FL1, verde) y la señal para los marcadores CD11b, CD11c, B220 y CD8, correspondiente a la tinción con una mezcla de los anticuerpos específicos conjugados a biotina y detectados con estreptavidina (canal FL4, rojo lejano). Se muestra los resultados con la población antes y después de la purificación usando bolas magnéticas recubiertas de estreptavidina.

**B** **Las células T requieren TC21 y RhoG para convertirse en células presentadoras de antígeno.** Células T CD4 AND de fondo I-A<sup>b</sup>, se incubaron con células dendríticas cargadas con MCC a 100  $\mu$ M procedentes de un ratón de fondo I-E<sup>k</sup> durante 2 horas, para permitir la trogocitosis de I-E<sup>k</sup>-MCC por parte de las células T. Transcurrido el tiempo, las células T CD4 AND, fueron purificadas por selección negativa y usadas en la cantidad indicada, para estimular células T CD4 AND de fondo I-A<sup>b</sup> marcadas con CFSE. Se midió por citometría de flujo la dilución del CFSE tras 4 días de estimulación para determinar el índice de proliferación. La proliferación teórica causada por las células dendríticas contaminantes (en el caso de la población purificada de +/-) se indica como DC.

Cada media y desviación típica representada, proviene de grupos de 3 datos diferentes. P\*\*<0,005 (Test de Mann-Whitney bilateral). Representación de 5 experimentos diferentes.

era menor, quedándose próxima a la activación causada posiblemente por las DC.

Estos resultados muestran tres puntos clave: las células T adquieren CPH-II y son capaces de actuar como CPA para otras células T de manera antígeno específica. En ausencia de

antígeno, las células silvestres no son capaces de estimular, indicando que la internalización independiente de TCR no tiene la capacidad de convertir a la célula en presentadora (datos no mostrados, por quedarse los puntos de estimulación al nivel del eje de abscisa). Por último,

TC21 y RhoG, debido a su papel en la internalización del TCR desde la SI, trogocitando/fagocitando el CPH unido al antígeno específico, ejercen un papel clave para la conversión de las células T CD4 en células presentadoras.

## 7.2. La capacidad presentadora de las células T

Clásicamente, las células presentadoras se dividen en dos grandes grupos: profesionales y no profesionales, siendo las primeras aquellas que expresan altos niveles de CPH-II y moléculas coestimuladoras. Como células profesionales se puede citar por oren de capacidad presentadora a las DC, los macrófagos y los linfocitos B (Croft et al., 1992; Guery and Adorini, 1995). Se piensa que las DC poseen una mayor eficacia presentadora por sus altos niveles de CPH-II y de correceptores como CD80 y CD86.

Las células T, como células nucleadas que son, presentan la capacidad de expresar antígenos intracelulares por CPH-I, sin embargo se les atribuye una baja eficacia de presentación. En cuanto a su faceta de presentar antígenos extracelulares adquiridos por el CPH-II (o CPH-I) trogocitado/fagocitado por el TCR, no es conocido con exactitud su capacidad estimuladora. Con el objetivo de comprobar la capacidad de presentación y por lo tanto de estimulación de las células CD4 T-CPA sobre células T de la misma especificidad, se purificaron células T que habían estado en contacto con DC cargadas con péptido MCC (igual que en el proceso de purificación representado en la Fig. R27 A). Tanto células T-CPA, como DC cargadas con la misma concentración de péptido, se llevaron a una dilución límite para llegar a tener 1 célula por pocillo. El número de células respondedo-

ras, marcadas con CFSE, se dejó fijo.

Tras 7 días de estimulación, se calculó el número de células que había respondido ante el estímulo de una única célula presentadora como se muestra en la Fig. R28 A. Los resultados (Fig. R28 B) indican una clara capacidad estimuladora de ambos tipos de presentadoras, activando una media de 20 células T por presentadora. Dichos resultados muestran que la capacidad estimuladora de ambos tipos celulares es similar.

## 7.3. La trogocitosis como factor limitante de la expansión clonal

Ante la entrada de un patógeno en el organismo, debe tenerse en cuenta el bajo número inicial de CPA infectadas. Se ha planteado, que la existencia de la trogocitosis, y la transferencia del antígeno presentado y procesado en el CPH, debe permitir la accesibilidad del antígeno a un mayor número de células T, aumentando así la respuesta inmunológica (Tsang et al., 2003).

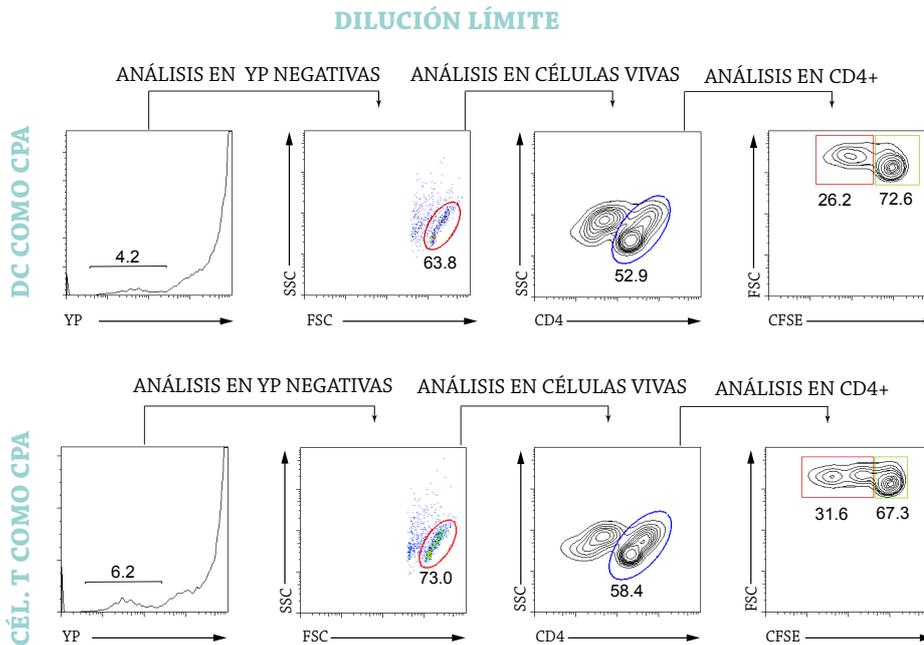
Para demostrar este hipótesis comprobamos la respuesta de las células T en función de su genotipo (+/+, RRas2 -/-, RhoG-/-) a un número limitado de DC presentadoras. Si las células T respondedoras tienen la capacidad trogocítica/fagocítica intacta y por lo tanto de tomar los complejos péptido-CPH y presentarlos a otros linfocitos T respondedores, la respuesta proliferativa sería mayor que en una situación donde solo las DC pueden actuar como presentadoras (Fig. R29 A).

Cuando las respondedoras eran +/+, tanto en presencia de DC como T-CPA se obtuvo una respuesta proliferativa medible. Sin em-

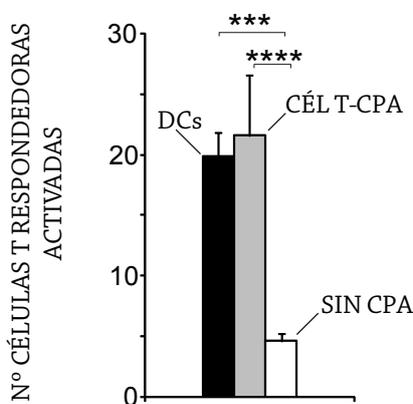
bargo, cuando las células respondedoras eran deficientes en el proceso trogocítico (RRas2<sup>-/-</sup> y RhoG<sup>-/-</sup>) las células no proliferaron. Este defecto fue mucho mayor que el mostrado en experimentos realizados con un número alto de presentadoras, donde éstas no son limitantes (Fig. R22 C).

Estos resultados muestran por tanto que la trogocitosis expanden la señal proliferativa, aumentando el número de células presentadoras presentes en el organismo, al convertirse las células T en CPA. TC21 y RhoG son esenciales en este proceso.

**A**



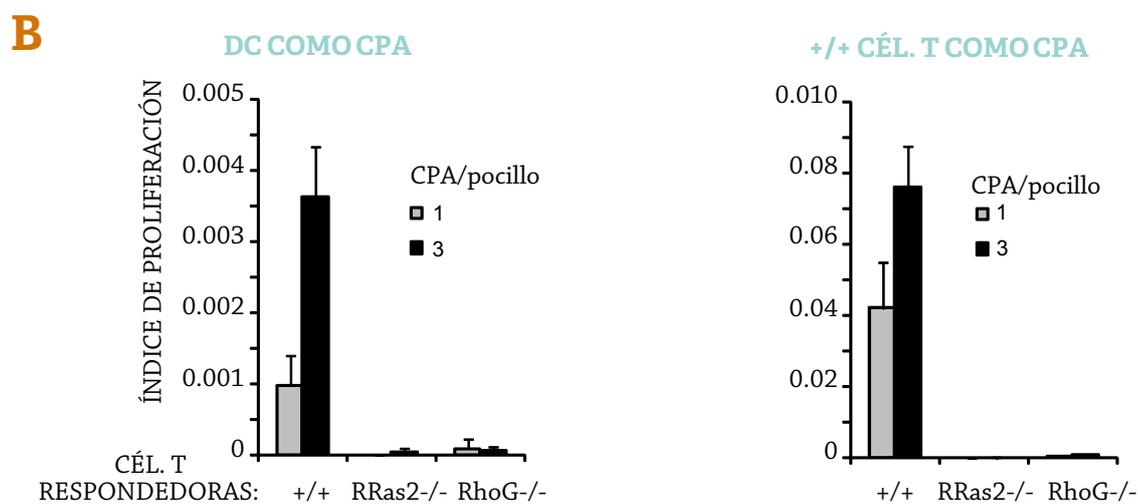
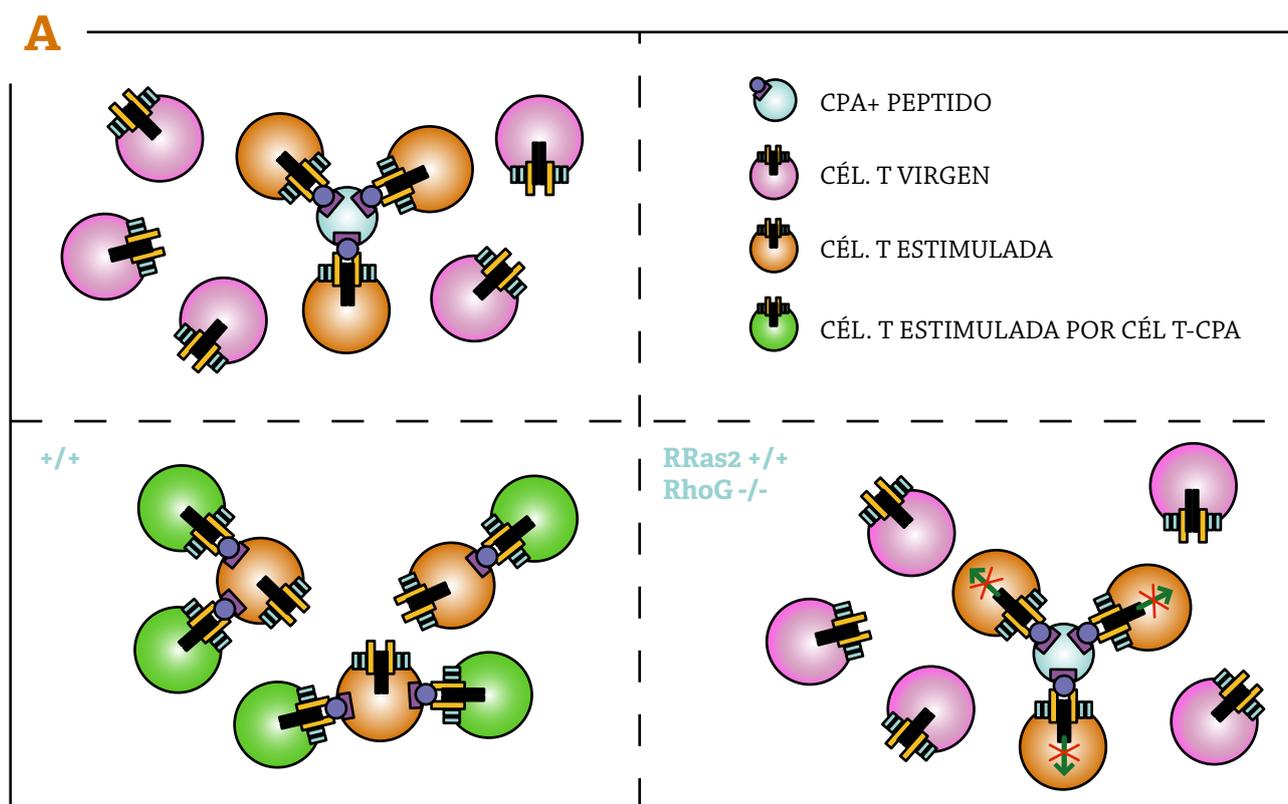
**B**



**Fig. R28** Las células T-CPA y las células DC, presentan a nivel singular, la misma capacidad de presentación y estimulación sobre células T

**A** **Análisis del ensayo de proliferación en condiciones de dilución límite de las células presentadoras.** Representación del análisis realizado sobre los datos obtenidos por citometría de flujo. Dentro de la población negativa para Yoduro de propidio (YP), se tomaron como células vivas aquellas que presentaban un perfil de FSC/SSC blástico. Además dentro de esta población, se analizaron los niveles de CFSE en la población CD4 positiva. Consideramos el porcentaje de las células en proliferación los niveles encuadrados en rojo. Las células en el recuadro verde corresponden a células CD4 positivas que no han proliferado.

**B** **Capacidad estimuladora de las células T-CPA frente a las células dendríticas.** Células T AND I-A<sup>b</sup> que habían estado en contacto con células dendríticas cargadas con MCC a 100  $\mu$ M, y células dendríticas, se diluyeron al límite para poner una célula por pocillo, y para estimular 1,4  $\times 10^5$  células T AND, marcadas con CFSE. Se midieron los niveles de CFSE tras 7 días de estimulación. P\*\*\* < 0,000002, p\*\*\*\* < 0,0000002 (Test de Mann-Whitney bilateral). Datos representativos de 3 experimentos.



## Fig. R29

**El proceso trogocítico permite la expansión de la señal, transfiriendo el antígeno a las células T que actúan como nuevas células presentadoras**

**A** **Modelo de la implicación del proceso trogocítico ante la presentación del antígeno cuando las células presentadoras profesionales están en un número limitado.** En condiciones normales, las células T con el TCR específico para el antígeno presentado por la CPA, interactúan e internalizan el MHC con el antígeno, volviéndolo a presentar en su membrana y convirtiéndose en célula CPA para otras células T, evitando así el problema de la poca disponibilidad de antígeno. En el caso de las células carentes de TC21 o RhoG, esta toma y re-expresión del antígeno, no tiene lugar.

**B** **TC21 y RhoG son esenciales en procesos de proliferación, cuando las células presentadoras profesionales están en un número limitado.** Células dendríticas incubadas con MCC (100  $\mu$ M) o células T purificadas tras la incubación con células dendríticas con péptido a la misma concentración, se diluyeron al límite para estimular  $1,4 \times 10^5$  células T AND marcadas con CFSE. Tras 7 días se calculó el índice de proliferación de las células T respondedoras.



## **Discusión**



Los datos presentados en este trabajo demuestran la existencia de una ruta fagocítica, no descrita previamente, que controla diferentes aspectos de la naturaleza de las células T. Además, se describe al TCR, TC21 y RhoG como moléculas implicadas en el control específico de dicha ruta. La capacidad fagocítica de los linfocitos T queda evidenciada por la adquisición de bolas de látex de diferentes tamaños de manera específica a través del TCR, asociando por tanto a este receptor, una ruta específica de internalización tras su estimulación con ligandos inmovilizados. También se demuestra la activación de RhoG a través de TC21 tras la estimulación del TCR.

La inhibición de la captación de material de la CPA, junto con la disminución de la reexpresión de este material en la membrana

de células procedentes de ratones carentes de TC21 y RhoG, nos ha llevado a describir la implicación de estas dos proteínas en el proceso conocido como trogocitosis.

El análisis minucioso de todos los resultados obtenidos y la caracterización del proceso trogocítico, nos ha permitido relacionar la capacidad fagocítica de las células T, con la trogocitosis y con la internalización de los TCR contactados desde el cSMAC. Nuestras observaciones y datos experimentales nos dirigen a un modelo en el que la formación de la SI constituye un intento de “fagocitar” la célula presentadora, dando como resultado el proceso trogocítico. Dicho proceso otorga unas funciones características de células CPA a las células T, suponiendo un nuevo elemento a tener en cuenta en la respuesta inmune global.

137

## 1. Fagocitosis en células T: La forma y los modos

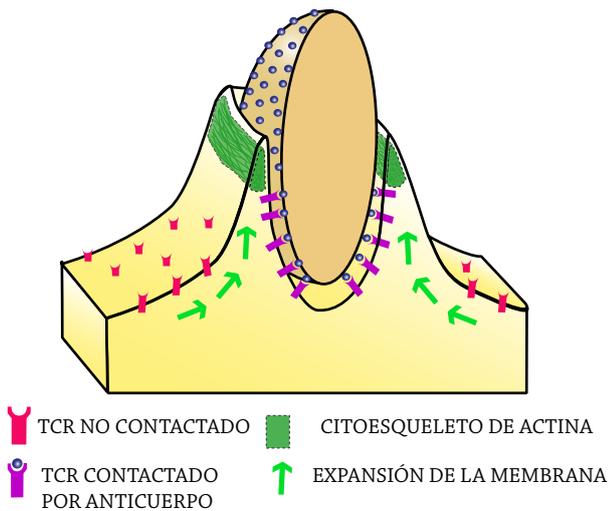
### 1.1. De la Sinapsis inmunológica al “Trogosoma”

La función de la SI ha sido y es un punto controvertido en el campo de la inmunología. Son múltiples las técnicas desarrolladas para su abordaje, siempre con el objetivo de atribuir a la SI una función activadora o degradativa.

La función “artificial” de fagocitar bolas de látex de gran tamaño a través de la activación del TCR, se debe plantear como una herramienta que ha permitido demostrar la capacidad fagocítica de los linfocitos T a través de una ruta controlada por TC21 y RhoG (Fig. D1). Dicha capacidad de fagocitar bolas muestra la existencia de una ruta fagocítica asocia-

da al TCR y ha permitido resolver una relación inconexa hasta el momento: formación-resolución de la SI y trogocitosis.

La existencia de la maquinaria y de la capacidad fagocítica, obliga a reanalizar todas las conclusiones obtenidas a partir de situaciones experimentales en las que se han usado células T en contacto con bicapas lipídicas. El TIRF (“total internal reflection fluorescence microscope”), técnica estrechamente ligada a la utilización de bicapas, ha permitido un gran avance en la resolución de imagen obtenida. Sin embargo, esta metodología no permite estudiar lo que ocurre más allá de los 100-200 nm de la membrana plasmática, lo que implica que en una fagocitosis, donde la membrana se curva



**Fig. D1** La célula T posee la maquinaria necesaria para la internalización de partículas de gran tamaño (1-6  $\mu\text{m}$ )

La célula T es capaz de englobar partículas esféricas simulando una fagocitosis de tipo cremallera ("zipper"). A través del contacto del TCR con anticuerpos estimulatorios localizados en la superficie de bolas de látex, se induce la polimerización del citoesqueleto de actina y con ella, la expansión de la membrana alrededor de la partícula hasta su completa internalización. De este modo se multiplica el contacto de los TCR con los anticuerpos presentes en la superficie de la esfera y aparecen así, TCR contactados en la copa fagocítica, que iniciarán las cascadas de señalización proximales requeridas.

y se internaliza, podría perderse información e incluso interpretar de forma errónea la aparición o desaparición de determinadas estructuras. Así por ejemplo, se ha descrito que en condiciones de utilización de bicapas lipídicas, aparece cerca del cSMAC un compartimento endosomal que contiene CD45 y glicolípidos (abundante en balsas lipídicas). Sin embargo, dichas estructuras no están presentes en condiciones más fisiológicas, donde la bicapa lipídica es sustituida por una CPA (Dustin, 2002; Johnson et al., 2000).

Parte de este trabajo está basado, como punto de partida, en la similitud "visual" del proceso del reconocimiento de la célula T de la CPA, con el fenómeno fagocítico, donde una célula profesional interacciona con el patógeno y expande su membrana sobre la partícula

para englobarla e internalizarla a través de receptores específicos. Como ya se ha comentado con anterioridad dicho fenómeno causa en ambos casos una profunda remodelación del citoesqueleto de actina, que permite tanto la extensión de la membrana como la formación del fagosoma en la zona próxima a ésta. Cómo ocurre la expansión de membrana cuál es la implicación del citoesqueleto de actina y las moléculas señalizadoras y cómo acontece la formación del fagosoma (o sus equivalentes) en las células T, es algo que hay que presentar paso a paso.

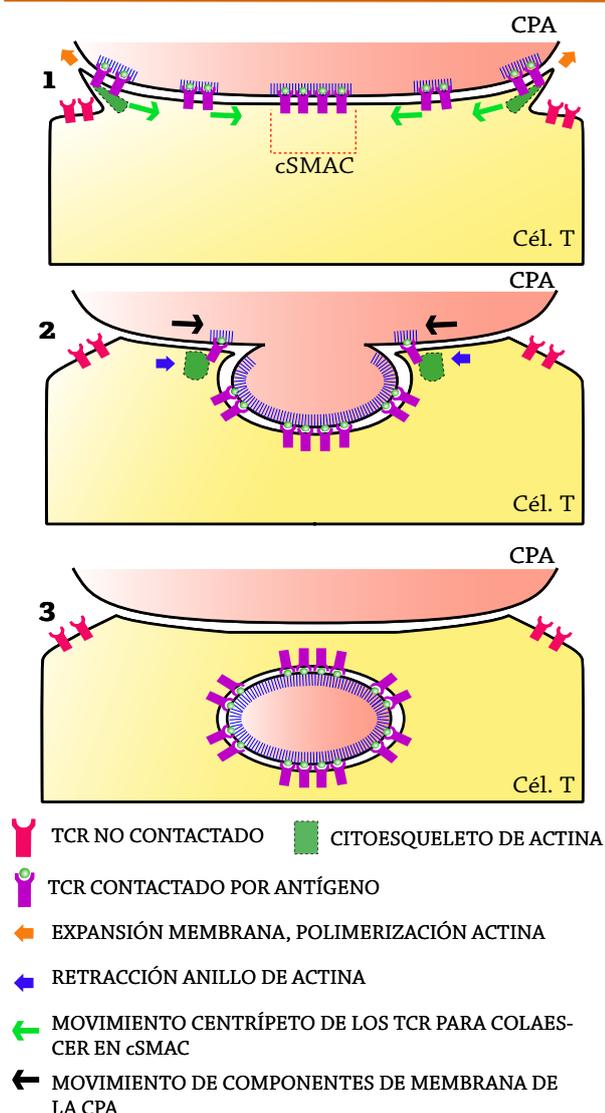
Mediante la utilización de bicapas lipídicas, ha sido demostrado que el grado de expansión de la membrana depende del elemento estimulatorio y de su distribución, constituyendo en ambos casos un método de rastreo por parte de la membrana y de los receptores de antígenos localizados en su proximidad. Así, el tamaño y la cantidad de antígeno son determinantes en el caso de la fagocitosis y SI respectivamente.

Por lo que se refiere al citoesqueleto, en los dos tipos de interfase aparece de manera característica un anillo periférico de actina, formado en la zona más externa del punto de contacto inicial. En las células T, en este punto inicial se originan los MC produciéndose con ello el inicio de la señalización (Barda-Saad et al., 2005; Gerisch et al., 2009). Parece claro que este anillo delimita una zona de actuación donde quedan constreñidas todas las moléculas señalizadoras y está acompañado de un flujo centrípeto de polimerización hacia el centro de la SI, permitiendo el transporte de los MC, y con ello la separación de los diferentes dominios de la SI (DeMond et al., 2008; Kaizuka et

al., 2007). En un fenómeno fagocítico el anillo de actina sería necesario para originar una fuerza tensora que mediaría la incorporación de la partícula a fagocitar y la aparición del fagosoma (Fig. D2).

En la fagocitosis clásica, el entrecruzamiento entre los receptores para las partículas patogénicas y la fuerza adecuada de adhesión entre la célula y el patógeno son aspectos necesarios para la consecución del proceso y la aparición del fagosoma (Bongrand and Golstein, 1983; Capo et al., 1982). Además, la partícula enfrentada debe cumplir unas características clave como oponerse con una constitución

fuerte y una forma determinada, que haga efectivas las tensiones originadas en la célula efectora. La fuerza de la unión de los TCR al péptido-CPH y la oposición que la célula T puede encontrar, son dos aspectos a tener en cuenta. Hace ya varias décadas se estudiaron mediante diferentes técnicas las fuerzas establecidas entre una célula T y su CPA con antígeno específico. La fuerza de adhesión era tal, que para perturbar la unión del conjugado formado había que aplicar una gran cantidad de fuerza y además implicaba la escisión de parte del material unido al receptor (Bongrand et al., 1983). La afinidad del TCR por su ligando es baja, sin



**Fig. D2**

**La Sinapsis Inmunológica es un proceso fagocítico remanente en la célula T, adaptado a un tipo específico de antígeno y de receptor**

- 1** Cuando la célula presentadora es demasiado grande para ser fagocitada, la célula T extiende su membrana sobre la CPA mediante un movimiento iniciado por los TCR que están siendo contactados por los CPH, dando lugar a una ola de polimerización de actina (verde). La ola de polimerización tiende a expandirse mas y mas hasta alcanzar un máximo. Los TCR contactados señalizan a través de los MC localizados en la parte más periférica de la interfase creada (representados como dímeros) los cuales tienden a coalescer en el centro de la estructura (cSMAC).
- 2** El transporte centripeto de los TCR promueve una retracción del anillo de actina o viceversa, lo que origina que la membrana plasmática de la célula T englobe a la evaginación de la membrana de la CPA la cual presenta una serie de características físicas determinadas por la acumulación de dominios específicos en la zona.
- 3** Las características de la membrana de la célula diana, y la acumulación de TCR contactados en la zona (cSMAC), los cuales se caracterizan por una fuerte unión a su ligando, confieren la fuerza necesaria para la escisión de la estructura membranosa en forma de fagosoma. La incapacidad de fagocitar toda la CPA, da lugar a la fagocitosis (trogocitosis) de un pequeño fragmento de la membrana de la CPA y con ello la internalización de los TCR contactados y localizados en el cSMAC. En este contexto existen dos tipos de TCR, los contactados y los no contactados (los cuales pueden localizarse en la interfase por tráfico intracelular o difusión lateral en la membrana). Solo los contactados son incorporados en el cSMAC y por lo tanto solo estos serán los internalizados desde ese punto.

embargo, cuando los TCR son transportados a la zona del cSMAC, la unión se vuelve prácticamente indisoluble (Grakoui et al., 1999).

En el caso de la CPA, no hay ningún trabajo que la haya considerado como diana de fagocitosis por parte de la célula T. Sin embargo, hay que tener en cuenta tanto su gran tamaño respecto a la célula efectora como la reorganización de su membrana en el momento de la formación de la SI (He et al., 2007). Durante esta reorganización, los diferentes complejos CPH junto con algunas de las moléculas coestimuladoras que juegan un papel esencial en la SI, son agregadas en el centro de la interfase, junto con dominios lipídicos característicos de membrana. De esta forma, los complejos CPH colocalizan en espacio y tiempo con el TCR en el cSMAC, constituyendo una zona potencialmente capaz de ejercer la resistencia necesaria para permitir la fagocitosis.

Se ha descrito que las células fagocíticas, modifican su forma de actuación en presencia de una partícula de tamaño limitante. De esta manera sería posible que ante la CPA, donde ni el tamaño, ni la consistencia celular son las adecuadas, el anillo de actina no pueda limitarse a unirse fuertemente a los límites de la partícula a fagocitar ya que no encuentra la resistencia adecuada. De esta manera, a través del movimiento centrípeto de los TCR hacia el cSMAC, y gracias a la modificación de las condiciones físicas de la membrana de la CPA y al aumento de afinidad del par TCR-péptido-CPH en este punto, se puede dar la escisión de la fracción de la membrana tras la retracción del anillo de actina alrededor de esta zona. De esta manera se origina una vesícula correspondiente a la zona del cSMAC, conteniendo material protei-

co localizado en ese punto, como por ejemplo los TCR (Fig. D2).

Al igual que en la interfase creada en los procesos fagocíticos, en estudios donde se usan CPA para estimular células T, se aprecia que la polarización del citoesqueleto de actina de la célula T hacia la CPA no es homogénea, sino que deja un “punto limpio” en el centro de la interfase donde se puede apreciar una invaginación de la membrana (Singleton et al., 2006). Esta ausencia de actina durante el proceso fagocítico es clásica, y permite la curvatura de la membrana y la consiguiente formación del fagosoma (Singleton et al., 2006). Este último hecho exige de nuevo la reinterpretación de los datos obtenidos en bicapas lipídicas, donde se describe siempre un espacio correspondiente al cSMAC, libre de actina. Este punto carece de actina seguramente por dos motivos: el posible fagosoma incipiente se ha internalizado a una profundidad mayor de 200 nm, lo que impide su visualización, observándose únicamente el anillo de actina que está permitiendo o “intentando” en parte su escisión. Un segundo motivo es que la vesícula incipiente debe sufrir una rápida despolimerización de actina, que en condiciones de fagocitosis normales (no frustradas) se origina nada más el fagosoma se separa de la membrana. Sin embargo, en este caso las condiciones son diferentes y es donde se debería crear el fagosoma, donde se aprecia esta despolimerización.

Por lo tanto, este trabajo, a través de la descripción de la capacidad fagocítica de las células T, plantea la internalización de los TCR desde la SI como el mecanismo que ejerce la fuerza requerida para la generación de fagosomas de un tamaño aproximado de 1  $\mu\text{m}$ , a las

cuales nos referiremos a partir de ahora como trogosomas. Éstas contienen tanto proteínas de membrana como citosólicas de la célula diana junto con los TCR contactados. La diferencia de la composición de las membranas implicadas (quizá balsas lipídicas frente a zonas de no balsas lipídicas) e interacciones proteína-proteína favorecen el proceso trogocítico desde el cSMAC, donde todas estas condiciones se ven favorecidas y quizá potenciadas.

La cuestión que queda sin resolver es la intensidad y origen de la fuerza necesaria para la consecución del proceso y que debe tener como origen la célula T. Esto último está de acuerdo con resultados que muestran que el proceso trogocítico no queda inhibido si se bloquea la polimerización de actina en la CPA, excluyendo la posibilidad de la existencia de una fuerza ejecutada por parte de esta célula “donante”. Por otro lado, la existencia de un límite de concentración de antígeno para promover la incorporación de material de membrana, muestra que el proceso trogocítico requiere una densidad crítica de interacciones antígeno-TCR específico.

## 1.2. Ruta trogocítica: TCR-TC21-RhoG

El concepto fagocitosis no puede entenderse sin la implicación de dos tipos de receptores, el Fc $\gamma$ RI, y el BCR, que juegan un papel esencial en la internalización de partículas a través de rutas fagocíticas. La relación entre estos receptores y el TCR se hace evidente al comprobar que todos ellos presentan una secuencia denominada ITAM. En la proteína Fc $\gamma$ RI, el ITAM está situado en la cadena  $\gamma$ , que

está relacionada filogenéticamente con la cadena CD3 $\zeta$  del TCR y cuya función está relacionada con la transmisión de señales del exterior al interior celular.

No hay que olvidar el concepto evolutivo dentro del sistema inmune, como un sistema que ha sufrido una evolución continua y por lo tanto una adaptación. La existencia de la ruta trogocítica en las células T, y la implicación de los ITAM asociados a moléculas o rutas de señalización presentes en otras células donde ejercen una función fagocítica, hace plantear a la trogocitosis como un ejemplo de cooptación, término ya presentado por Darwin, donde un rasgo ancestral como la fagocitosis, ha sido explotado en muchos linajes para funciones diferentes. Por lo tanto el mecanismo, o los elementos estructurales y funcionales, se mantienen pero se adaptan a nuevas funciones, en este caso a la incorporación de pequeños fragmentos de membrana, cuya finalidad se discutirá más adelante.

Al ser internalizados, el FcR y el BCR se llevan consigo el ligando, pese a que éste está unido a membrana, y en algunos casos este proceso lo realizan por un mecanismo trogocítico (Batista et al., 2001). Por lo tanto, ¿No podría la célula T ejecutar dicha función a través del TCR?.

La participación de los ITAM en el proceso de trogocitosis queda implícito por la implicación de TC21, está íntimamente ligado a la señalización a través del TCR y del BCR uniéndose a estos dominios. A pesar de que no ha sido descrita la implicación de TC21 en los ITAM de los receptores Fc $\gamma$ RI, es curioso observar la alta expresión relativa de TC21, a nivel de RNA, en diferentes tipos celulares, como

células B, T y células dendríticas, estas últimas células fagocíticas profesionales, con altos niveles de FcR, lo que puede suponer una indicación de la función de esta proteína también en este tipo celular (Wu et al., 2009). También encontramos, en células fagocíticas, una expresión elevada de RhoG, lo cual es lógico dado el papel descrito de esta proteína en estos tipos celulares. La existencia de esta maquinaria común entre los receptores TCR y Fc $\gamma$ R ha sido descrita en el caso de Bcl10, una fosfoproteína que ejerce un control sobre la polimerización de actina inducida por el Fc $\gamma$ R y el TCR (Rueda et al., 2007).

Como proponemos en esta memoria, tras la estimulación del TCR, el TC21 asociado promueve la activación de RhoG. A su vez, RhoG, una vez localizado en membrana, activa a otras GTPasas encargadas de la modificación del citoesqueleto de actina para permitir la fagocitosis/trogocitosis y con ello la internalización del TCR desde la SI y del material de la CPA.

Ya introducida la complejidad del proceso de activación de las pequeñas GTPasas, surgen varias preguntas aún sin responder: ¿Cómo está controlada la actividad de TC21? y ¿cómo es exclusivamente activado TRIO para la activación de RhoG, a pesar de la existencia de otro dominio DH/PH capaz de activar otras rutas diferentes y en algunos casos opuestas? (RhoA) (Nakaya et al., 2006). En este aspecto, no descartamos que RhoA tenga un papel positivo en la trogocitosis mediada por el TCR, tal y como ocurre en el caso del receptor del complemento.

TC21 se caracteriza por su localización en membrana y por su alta tasa intrínseca de intercambio GDP/GTP, requiriendo o exigien-

do un control de su actividad aún por describir. Aunque ha sido descrita su unión preferente al dominio ITAM no fosforilado en su estado GDP, ha sido demostrada, a su vez, su activación y por lo tanto relación con la estimulación del TCR (Delgado et al., 2009). Sin embargo, muchas son aún las incógnitas por desvelar: si una vez activado permanece unido al TCR y qué factor o GEF activa a TC21, incluso si existe tal factor, son solo algunas de ellas.

El papel de TC21 en la SI, ha sido demostrado mediante microscopia confocal. Gracias a esta técnica se ha podido comprobar que a pesar de su activación tras la estimulación del TCR, esta pequeña GTPasa permanece en membrana, redistribuyéndose a lo largo de toda la zona de la interfase y delimitando un área de actuación donde colocaliza con CD3 $\zeta$ , sin que se sepa todavía si TC21 y CD3 $\zeta$  permanecen unidos o no a través de los ITAM. La zona delimitada tiene una estructura similar a la copa fagocítica, que requiere de la delimitación de una zona de actuación para su consecución. En esta región se deben acumular y sobrepasar unos niveles determinados de lípidos modificados y de moléculas señalizadoras, necesarios para inducir el proceso fagocítico. De nuevo, teniendo en cuenta la posibilidad de que un proceso fagocítico esté teniendo lugar en el momento de formación de la SI, la acumulación de TC21 unido al TCR en gran cantidad en una zona determinada y limitada de la membrana de la célula (seguramente por el anillo de actina) puede hacer aumentar en gran cantidad los niveles de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> producidos por PI3K Clase I, diana directa de TC21. Esta acumulación puede ser un punto de anclaje para TRIO, el cual a través de su dominio PH

puede ser reclutado a estas áreas y por lo tanto ejercer su función de GEF sobre proteínas como RhoG presentes en la membrana.

Otro posible mecanismo, además de la señalización a través de lípidos fosforilados, puede ser la relación entre filamina-A (proteína de unión a actina) y TRIO. Se ha demostrado la interacción de TRIO con Filamina-A en células epiteliales humanas (HeLa), a través del dominio DH/PH GEFD1 (el componente activador de RhoG/Rac) (Bellanger et al., 2000) de esta proteína. Este hecho convierte a filamina-A en una posible plataforma de organización espacial de la activación de proteínas bajo el control de TRIO, el cual queda localizado en zonas concretas por la presencia de esta proteína.

Filamina-A y la SI parecen estar íntimamente relacionadas: se ha descrito la relocalización de filamina-A en la interfase celular entre la célula T y la CPA en el momento de su formación. Además filamina-A parece interactuar directamente con CD28 y a su vez con PKC- $\theta$ , constituyendo un elemento clave en la señali-

zación de la célula T, y en la reorganización del citoesqueleto y agregación de las balsas lipídicas en la SI (Hayashi and Altman, 2006; Tavano et al., 2006). La posible relocalización de TRIO en la zona de la SI a través de la acumulación de filamina-A es importante teniendo en cuenta que la afinidad de TRIO por los fosfatidilinositoles es baja a no ser que RhoG esté presente en la zona, aumentando así su afinidad.

Por lo tanto, teniendo en cuenta la conexión potencial entre filamina-SI-TRIO, podría ser que la acumulación de la proteína de unión a actina, controlase, junto con la alta tasa de producción de lípidos modificados por parte de PI3K, la colocalización de TRIO en la zona delimitada de la SI o más concretamente del cSMAC. En esa región particular, se presentan las condiciones adecuadas para que RhoG, situado en la membrana por un mecanismo aún no descrito, sea activado, causando la reorganización de actina requerida para la particularización del trogosoma y su internalización/fagocitosis.

## 2. Modulación negativa del TCR: dependiente de clatrina vs trogocitosis (clatrina independiente)

En algunos trabajos se ha concluido que la ruta que produce la internalización de los TCR contactados está mediada por PTK (como Lck), mientras que en otros, se afirma la no implicación de esta ruta de señalización y se describe una nueva ruta de endocitosis independiente de clatrina y cuya transducción de señales asociada no ha sido definida hasta el momento (Geisler, 2004; Monjas et al., 2004; San Jose

et al., 2000). En base a los resultados presentados en este trabajo, y asumiendo la existencia de un proceso trogocítico y el requerimiento de una estabilización fuerte y resistente entre los receptores contactados y el antígeno, podemos explicar con mayor claridad estos resultados tan dispares.

Cuando la estimulación del TCR se realiza con una metodología que no implique la

resistencia fisiológica aportada por una CPA, como es la utilización de anticuerpos solubles, los TCR contactados no se van a internalizar por un mecanismo “fagocítico”. El TCR se modulará por una ruta dependiente de PTK y seguramente de clatrina. Sin embargo, la formación de la SI y por lo tanto la creación de condiciones de adhesión fuerte y acumulación de receptores, ocasionan la entrada de los TCR localizados en el cSMAC de manera independiente de clatrina, por un proceso trogocítico.

Por lo tanto, el trabajo realizado por Monjas et al. (2004) que mostraba la existencia de un mecanismo dependiente de colesterol, temperatura y dinamina, y totalmente independiente de PTK y de clatrina, se explica de acuerdo al nuevo fenómeno de internalización descrito en este trabajo; ya que el proceso “fagocítico/trogocítico” es descrito como independiente de clatrina pero dependiente de dinamina y del citoesqueleto de actina y PI3K, a través de la activación por parte de TC21.

Sin embargo para poder englobar todo el proceso en uno, y poder entender los datos referentes a los experimentos de modulación negativa realizados en esta tesis, hay que tener en cuenta varios aspectos:

- Solo un pequeño porcentaje de TCR en la membrana son contactados (San Jose et al., 2000).
- La modulación que tiene lugar en los primeros momentos del proceso corresponde mayoritariamente a la internalización de los receptores no contactados (Utzny et al., 2006). A mayores tiempos y mayor concentración del antígeno, se hace más evidente la importancia del proceso mediado por trogocitosis.

- La similitud del modelo utilizado con las condiciones naturales que tienen lugar en el contacto de la célula T con la CPA son esenciales, dada la importancia de los pares proteicos de interacción entre las dos membranas, que como hemos propuesto, son los mediadores de las fuerzas requeridas para la escisión de la membrana de la CPA.

Con todo ello, y teniendo en cuenta los diferentes modelos utilizados para el estudio de las rutas implicadas en los procesos de modulación, es importante reconsiderar las condiciones y los resultados. Así, en los experimentos donde se usa anticuerpo soluble claramente la célula no desarrolla la clásica SI, ni se encuentra ninguna resistencia física que requiera de la implicación de la fagocitosis y por lo tanto de la remodelación de la membrana. Sin embargo, tanto cuando se usan células presentadoras, como anticuerpo pegado a placa, se fuerza tal remodelación.

El TCR no es ni mucho menos el único receptor que puede presentar dos rutas diferentes de internalización en función de la naturaleza o tipo de ligando, así por ejemplo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFr) presenta también dicha característica. La maquinaria asociada a la internalización de este receptor depende de la dosis del ligando, siendo dependiente de clatrina ante dosis bajas pero independiente ante dosis altas, ambas concentraciones dentro del rango fisiológico. Esta segunda ruta, se relaciona con la ubiquitinación y con la participación de proteínas colocalizadas en dominios ricos en caveolina (Sigismund et al., 2005).

En cuanto a la ubiquitinación del TCR, ya se ha comentado en la introducción, que una de

las implicaciones de la actividad PTK asociada a la activación del TCR y que se interpreta en algunos estudios como la acción responsable de la internalización de los TCR contactados, depende de la actividad de Lck y de la ubiquitinación de CD3 $\zeta$ . En el trabajo de Monjas. et al.(2004), donde se excluye la participación de PTK para mediar el proceso de internalización de los TCR contactados, hay que tener en cuenta la utilización de un sistema quimérico como receptor del antígeno, pudiendo estar anulando la participación de otras rutas, aunque constituya de este modo la demostración de que una ruta independiente de esta señalización tiene lugar para la internalización de ese grupo de TCR. En relación a esto, el modelo trogocítico como mecanismo de internalización de los TCR contactados, no descarta la implicación de otras rutas de internalización desde el cSMAC o desde el trogosoma recién formado, donde modificaciones como la ubiquitinación podrían determinar el destino diferencial de los TCR englobados como un todo en esta gran vesícula.

Cabe resaltar que la existencia de la trogocitosis desde el cSMAC es una teoría más que contradice la ya antigua suposición del “Serial triggering” mediante el cual Lanzavecchia

y colaboradores propusieron que un complejo péptido-CPH es capaz de estimular y modular negativamente desde la membrana a más de 100 TCR diferentes, al volver a estar disponible tras la estimulación e internalización del TCR previamente contactado. Este modelo fue refutado tras la descripción del proceso de comodulación del TCR (Niedergang et al., 1997), y la trogocitosis no hace más que apoyar esta teoría, constituyendo un fenómeno que supone la internalización de TCR contactados en gran cantidad desde el cSMAC, pudiendo estar en contacto con el péptido específico o con uno endógeno. Además, la internalización del TCR junto con el material de la CPA (CPH y péptido entre otros) hace imposible la disposición de tal complejo para nuevas reexposiciones a TCR próximos.

Por lo tanto, la trogocitosis, proceso fagocítico adaptado en el caso de las células T, constituye el mecanismo, hasta ahora desconocido, que permite la internalización de los TCR contactados, descrita previamente como independiente de clatrina y dependiente de dinamina. Cabe ahora preguntarse si esta trogocitosis/fagocitosis desempeña un papel fisiológico además del de la propia modulación del TCR.

### 3. Destino y función del material trogocitado

Los TCR contactados, y englobados en el trogosoma, tienen la función de llevar consigo material y por lo tanto “información” a la célula receptora, lo que sugiere la existencia de un procesamiento específico. Sin embargo, los no contactados o comodulados, que no son englobados en el cSMAC y por tanto tampoco en

el trogosoma, carecen de material asociado y constituyen, en principio, un grupo de receptores disponible para nuevas interacciones inmediatas, lo que concuerda con su relación con PKC y su localización en endosomas de reciclaje (Alcover and Alarcon, 2000; Bonefeld et al., 2003; Geisler, 2004; von Essen et al., 2006).

### 3.1. Del “trogosoma” a los cuerpos multivesiculares

El trogosoma, como vehículo de transporte de TCR junto con otros materiales como componentes lipídicos, se forma en la parte proximal de la membrana plasmática que está formando parte de la interfase. En base a los resultados presentados en este trabajo, esta vesícula colocaliza parcialmente con diferentes Rab-GTPasas, lo que nos indica que sufre un proceso clásico o similar a la maduración fagosomal, finalizando en estructuras similares a CMV ricos en LBPA. Los datos obtenidos mediante el uso de bicapas lipídicas, apoyan la teoría del cSMAC como punto degradativo de la SI, por localizarse en éstas moléculas como LBPA y Cbl-1 (Vardhana et al., 2010). Ambas proteínas están relacionadas con los CMV, cuya implicación, por tanto, coincide con nuestra hipótesis.

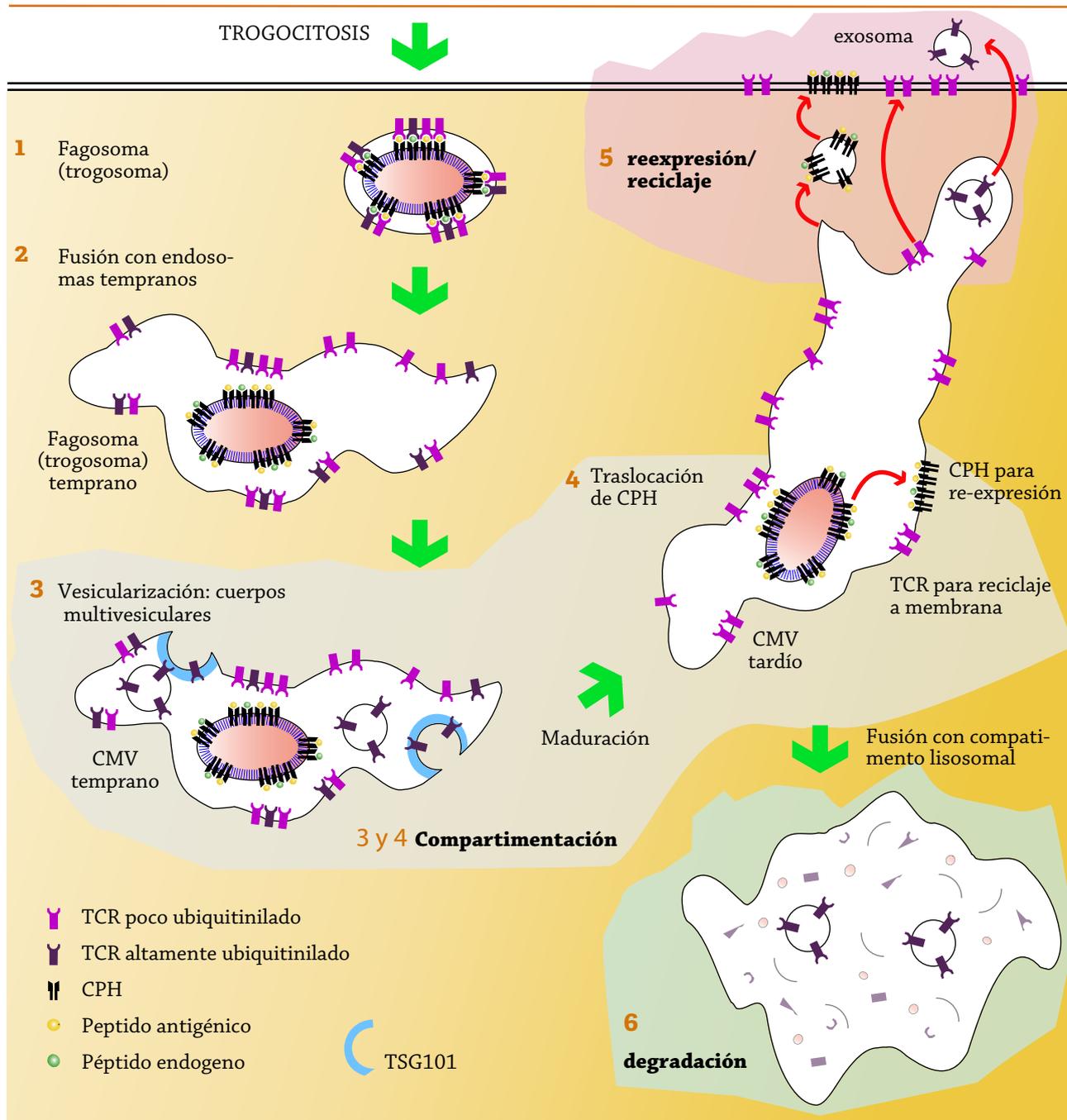
En base a lo expuesto (Fig. D3, el trogosoma (o vesículas conteniendo bolas de látex) sería procesado, interaccionando con diferentes componentes del sistema endosomal, adquiriendo y perdiendo diferentes GTPasas para finalmente configurar lo que se conoce como CMV temprano. Según lo descrito para estos orgánulos en otros tipos celulares, diferentes proteínas del CMV temprano serían destinadas a reciclaje o degradación por su compartimentalización en la membrana limitante o en las vesículas internas respectivamente (Fig. D3. Paso 3).

### 3.2. Función del cSMAC: degradación y reutilización mediados por el trogosoma

Si consideramos el cSMAC como lugar de formación del trogosoma, podemos atribuir

a tal estructura las funciones asociadas a la formación de esta vesícula: degradación y re-expresión del material. Estas funciones están íntimamente relacionadas con el destino que parece tener esta partícula membranosa, es decir los CMV, los cuales funcionan a modo de plataforma de clasificación de proteínas (compartimentalización), permitiendo la degradación de unas y reexpresión/reciclaje de otras en la membrana. En base a lo descrito en trabajos previos de otros grupos acerca de la función de las proteínas TSG101 o HRS en células T (Vardhana et al., 2010) (componentes del complejo ESCRT (Raiborg and Stenmark, 2009; Wollert and Hurley, 2010)), y a la información que sugieren nuestros datos, podemos hipotetizar un modelo de maduración del trogosoma incipiente a través de una ruta controlada por TC21 tras la activación del TCR (Fig. D 3).

El destino de las proteínas de membrana a vesículas intraluminales está estrechamente relacionado con dos aspectos básicos: ubiquitinación y activación sostenida (Longva et al., 2002), ambos aspectos claramente implicados y relacionados en relación a los TCR contactados en el cSMAC. Parece ser que el complejo ESCRT es el encargado de mediar la curvatura de la membrana, la formación de las vesículas internas y por lo tanto la compartimentalización de las proteínas (Fig. D3. Paso 3). Este complejo está estrechamente ligado a la incorporación de las proteínas modificadas por la unión de ubiquitinas. En el caso de la célula T, se ha implicado a TSG101 de manera exclusiva frente a HRS, en la degradación del TCR desde el cSMAC (Vardhana et al., 2010). La diferencia entre ambas unidades es la independencia o dependencia, respectivamente, de la



**Fig. D3 El trogosome tiene como destino los CMV, que actúan como plataforma de compartimentalización**

1. Tras la formación del trogosome, los TCR se localizan en la vesícula, constituyendo dos grupos según su unión a péptido endógeno o antigénico, que podrían también diferir en su nivel de ubiquitinación -poco o mucho, respectivamente. 2. El trogosome temprano interacciona con componentes del sistema endocítico, adquiriendo características de fagosoma/trogosoma temprano, quedando los TCR en la membrana limitante. 3. Se inicia el proceso de compartimentalización de las diferentes proteínas, donde los TCR que presentan altos niveles de modificación, son procesados y englobados en vesículas internas, dispuestas para su consiguiente eliminación. Los TCR que no presentarían las modificaciones requeridas quedarían en la membrana limitante del CMV en formación. El proceso de internalización podría estar mediado específicamente por TSG101, que actuaría sobre la membrana limitante carente de clatrina. 4. El CMV sufre una maduración, lo que permite la translocación a la membrana limitante de los CPH asociados a péptido, que se encuentran formando oligómeros al haber confluido durante formación de la SI. 5. Los CMV pueden desarrollar estructuras tubulares hacia la membrana plasmática, con la formación de vesículas con CPH que se fusionan con la membrana plasmática, o bien fusionar de forma directa la membrana limitante del CMV con la membrana plasmática lo que permite el reciclaje de las proteínas presentes en la membrana limitante (TCR y CPH) y la expulsión de exosomas ricos en TCR y en otras moléculas. En ambos casos los CPH se pueden re-expresar en membrana formando oligómeros dada su configuración previa en la membrana limitante. 6. Tras el proceso de reciclaje, el CMV sigue con su maduración fusionándose con componentes lisosomales y constituyendo un fagolisosoma o compartimento de degradación.

existencia de plataformas de clatrina presentes en la membrana limitante del fagosoma para la vesicularización (Myromslien et al., 2006; Razi and Futter, 2006). La implicación exclusiva de TSG101 (por tanto la independencia de clatrina), cobra gran relevancia si pensamos que dicha proteína actúa sobre una membrana limitante seguramente carente de clatrina, dado que su origen (cSMAC), es una zona totalmente deplecionada en ésta (Fig. D2). Por lo tanto, TSG101 podría actuar sobre la membrana limitante de la vesícula ya madura originada a través de la ruta trogocítica, en el cSMAC, mediando por tanto una de las funciones de este dominio: la internalización de determinadas proteínas para su consecuente degradación y finalización de la señal. La compartimentalización supondría por una parte el aislamiento del señalosoma asociado a los TCR contactados, impidiendo su contacto o relación con nuevas moléculas, y por último, la localización adecuada de estos complejos, dispuestos para ser degradados por los componentes lisosomales (Fig. D3. Paso 3).

El destino de los TCR al compartimento interno de los CMV no debe ser un proceso sencillo, ya que el grupo de TCR englobados en el trogosoma y posteriormente en los CMV no constituyen un grupo homogéneo, sino que seguramente se pueden encontrar diferentes tipos de TCR en cuanto a estado de fosforilación, ubiquitinación y asociación a diferentes tipos de péptidos (Wulfing et al., 2002). Todo esto, en conjunto, determinará diferentes comportamientos y describir diferentes dominios en la membrana limitante, algo característico de los CMV de procesos fagocíticos clásicos (Murk et al., 2003).

En este sentido, en condiciones de trogocitosis mediada por CD28, los receptores contenidos en los trogosomas pueden presentar modificaciones particulares que determinan un destino diferente, como puede ser el reciclaje desde los endosomas tempranos. Una muestra de esta clasificación o determinación de destinos a nivel de los CMV se ha visto en otros tipos celulares donde los receptores de transferrina, los cuales claramente deben ser reciclados, se localizan únicamente en la membrana limitante (Sachse et al., 2002). Por lo tanto, estudios más exhaustivos deben ser realizados para describir la distribución y la dinámica de los receptores englobados en estos orgánulos.

Durante el proceso fagocítico se ha demostrado que el destino y la tasa de degradación asociado a CMV viene estrechamente controlado por el tipo de carga y las GTPasas/efectores asociados. Por lo tanto, las características intrínsecas de cada proceso trogocítico relacionadas con el tipo de ligando, determinará los niveles de señalización y efectores asociados a los MC y con ello (tras la confluencia en el trogosoma) puede quedar determinado el destino del material internalizado en base a todo esto (Erwig et al., 2006; Zhou and Yu, 2008).

La otra función atribuida a la formación del trogosoma y por tanto al cSMAC es la incorporación y reutilización del material internalizado, ajeno, en su origen, a la célula T. Ya ha sido demostrado en muchas ocasiones la función de este material en el nuevo destino, pero no es sabido cómo es reexpresado en la membrana de la célula T (Ahmed et al., 2008). En este trabajo demostramos la implicación de TC21 y RhoG en el proceso trogocítico, cuya in-

hibición tiene como consecuencia, en relación a la incorporación de material de la CPA, una ineficiencia en la presentación a otras células T y por lo tanto una incapacidad para actuar como T-CPA, lo que puede tener consecuencias en la respuesta inmune global (Fig. D4).

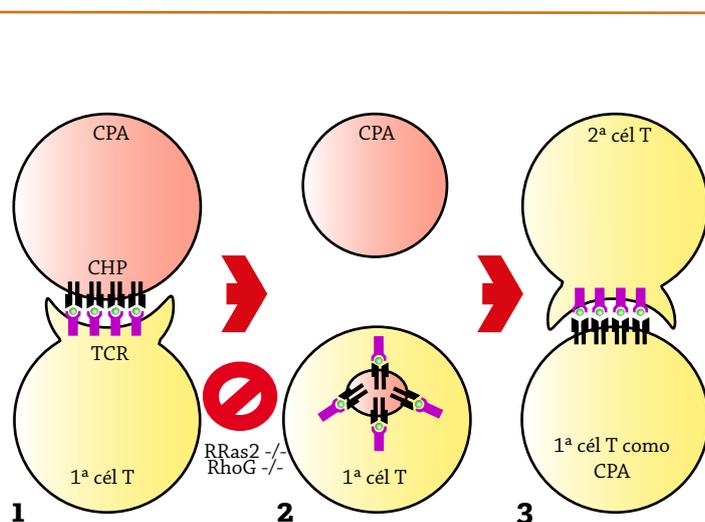
Los CMV son un punto clave en el tráfico de CPH-II en células presentadoras clásicas. Hay que resaltar que el material internalizado por parte de la célula T, donde la interacción y por lo tanto la internalización principal es del CPH, va a parar a este mismo compartimento. Es habitual ver en otro tipo de receptores, cuyo destino también es el de los CMV, a su ligando localizado en las membranas intraluminales, unido aún al receptor (Myromslien et al., 2006), por lo que no es de extrañar que el fragmento de membrana de la CPA esté localizado en dicho compartimento.

Los complejos CPH-II presentan la capacidad y la maquinaria necesaria para la translocación desde las membranas internas a la membrana limitante, lo que les permite, mediante la formación de estructuras tubulares, la expresión en la membrana plasmática. La

existencia de un mecanismo similar que procese los conjugados TCR-CPH presentes en el lumen de los CMV para permitir la reexpresión de los CPH-II con el péptido específico en la membrana, es algo que no podemos demostrar hasta el momento, sin embargo hay dos procesos claros que apoyan esta hipótesis:

Los CPH-II se localizan en la membrana plasmática y son capaces de activar células T, lo que conlleva la correcta orientación del complejo en la membrana y por lo tanto la existencia de algún tipo de control específico para la consecución de tal fenómeno.

Ha sido descrito (Blanchard et al., 2002) la formación y exocitosis de vesículas o exosomas al exterior celular, localizadas en muchos casos en la zona de la SI. Esto está acorde con la relocalización de los CPH-II, a partir de los CMV, en la membrana plasmática. En células presentadoras profesionales, tras la estimulación, la cantidad de exosomas y la expresión en ellos de CPH-II disminuye, ya que se relocalizan mayoritariamente en la membrana plasmática. La existencia de esta regulación en la célula T, como CPA, es algo aún por determinar.



**Fig. D4**

**TC21 y RhoG controlan la internalización del TCR desde la SI y con ello la conversión de la célula T en CPA**

- 1** El TCR interacciona con el complejo péptido-CPH presente en la membrana de la CPA, confluendo los diferentes oligómeros para formar el cSMAC.
- 2** El proceso trogocítico mediado por la internalización del TCR desde el cSMAC permite la internalización de material de la CPA.
- 3** Tras un procesamiento específico, los complejos péptido-CPH formando oligómeros son reexpresados en membrana, permitiendo la activación de otra célula T con la misma especificidad antigénica, presentando una mayor capacidad estimuladora en algunos casos seguramente por la presencia de oligómeros de CPH.

En relación a la formación de exosomas, hay varios trabajos que describen la formación de estas estructuras en las células T estimuladas, pero curiosamente solo ante una estimulación con células presentadoras (donde el proceso trogocítico puede tener lugar), ya que la estimulación farmacológica como PMA no da lugar a la producción de tales vesículas, las cuales contienen mayoritariamente CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$  y TCR $\beta$  entre otros (Blanchard et al., 2002). En nuestro modelo, la expulsión de las bolas de látex recubiertas de membrana equivalen a los posibles exosomas que deben ser generados en condiciones estimuladoras normales, y a este proceso se le ha conocido en algunos casos como egestión (Di et al., 2002).

En relación a la posible reorganización de los complejos CPH-II cargados con péptido a nivel de los CMV, este fenómeno podría actuar favoreciendo la reexpresión de complejos de CPH conformando NC cargados con péptido. Esto puede otorgar a la célula T ventajas como célula presentadora, lo que explicaría los resultados obtenidos que muestran que estas células presentadoras pueden llegar a ser CPA más eficientes que las profesionales.

En relación a esto último, ha sido descrito, aunque bajo mucha controversia, la necesidad de al menos dímeros de CPH para activar eficazmente a la célula T. No obstante, también se ha descrito el fenómeno de inmovilización del par de interacción TCR-CPH. Dicho fenómeno, junto con el cambio conformacional que tiene lugar a niveles de CD3 $\epsilon$ , parece constituir los primeros pasos para la activación de la célula T. El requerimiento para la correcta inmovilización del par proteico parece depender de la afinidad del TCR, requiriendo un dímero (dos

péptidos antigénicos), pseudodímero (péptido endógeno y péptido antigénico) o un monómero, en el caso de TCR de baja, media y alta afinidad respectivamente (Varma, 2008). En base a esto, el primer linfocito T habría realizado el trabajo de concentrar a los CPH cargados con antígeno y de reexpresar en NC en la membrana de la célula T, lo que permitiría la fijación, y por lo tanto la activación, de células T con mayor facilidad y rapidez. La agrupación de péptidos específicos facilita la activación de la célula T al ahorrar a esta última la búsqueda de antígenos específicos, entre un mar de antígenos propios, acelerando, quizás así, la respuesta de nuevas células T respondedoras.

No hay que olvidar el contexto en el que el péptido-CPH sería presentado en la célula T, un contexto diferente al encontrado en condiciones habituales ante la falta, por ejemplo, de determinados correceptores. Este hecho podría ocasionar una diferencia en cuanto a la señalización inducida en la célula T que está siendo estimulada y explicaría el porqué en algunos casos se ha visto la estimulación y diferenciación de determinados tipos celulares ante tales presentadoras, como pueden ser las células de memoria (Umeshappa et al., 2009). No obstante en el proceso de trogocitosis los linfocitos T no solo adquieren y reexpresan CPH, sino que también expresan moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, lo que también puede convertir a las células T en perfectas presentadoras.

Otra cuestión que cabe resolver es la relación de la SI madura con la utilización de péptidos agonistas. En esta situación se le ha atribuido la función clásica degradativa al cS-MAC, y es en estas condiciones donde única-

mente TSG101 es importante (Vardhana et al., 2010). En condiciones opuestas, un agonista débil no origina el cSMAC ni el “punto” limpio de actina clásico de la interfase creada, lo que puede ser un indicativo de que en estas condiciones la trogocitosis tampoco tiene lugar, o por lo menos no al mismo nivel.

En relación a la función de trogocitosis del cSMAC, podemos especular que solo es esencial su ejecución y por ello se desarrolla la plataforma necesaria para tal fin (SI), en condiciones de afinidad propicias, lo que indica la existencia de un estímulo potente. Éste requiere por una parte su encapsulamiento y degradación para finalizar la estimulación y por otra el procesamiento de este elemento estimulador (péptido) para su presentación a otras células. Esto último permite propagar la señal y producir una respuesta inmunitaria adecuada, modificando así el concepto de expansión clonal clásica conocida hasta el momento. Este aspecto bifuncional del cSMAC explicaría los resultados obtenidos, donde la ausencia de TC21 y RhoG causa por un lado una estimulación elevada y por otro lado una ineficiencia por parte de las células T de estimular y propagar la señal como CPA.

Por lo tanto, ante un péptido agonista, la célula T desarrolla la SI, cuya función es doble: degradación de la señal y transporte de información en forma de material de la célula presentadora. En ambos casos el proceso cursa con la formación de una vesícula a través de un proceso fagocítico, donde TC21 y RhoG permiten la reorganización del citoesqueleto de actina requerida para su consecución. Este proceso trogocítico rompe con la idea de la internalización individualizada de los TCR aceptada

hasta el momento, e instaura la existencia de un complejo membranoso que contiene grandes cantidades de TCR y material de la CPA que requiere de un procesamiento específico. Además y de forma importante, de acuerdo a nuestros resultados, la trogocitosis conlleva cambios relevantes en la funcionalidad de la célula receptora.

Las conclusiones alcanzadas en esta tesis demuestran la importancia de la trogocitosis como una compleja e ingeniosa forma de transferencia de información entre la CPA y la célula T. Donde la formación del trogosoma, tras una fagocitosis frustrada, su maduración y la formación de lo CMV, permite la finalización de la señal y la reexpresión de moléculas específicas en la membrana de la célula T otorgando a ésta nuevas funciones. La existencia de este proceso trogocítico hace necesaria la reinterpretación del sistema inmune, como un sistema enormemente dinámico, complejo e interconectado, en el que múltiples tipos celulares interactúan constantemente intercambiando información que modela en último término la respuesta inmune. La descripción de nuevos materiales transferidos entre diferentes tipos celulares es una cuestión en auge actualmente (Daubeuf et al., 2010a), donde se ha llegado a describir la transferencia de TCR específicos para determinados patógenos, capaces de convertir a una célula no específica en una eficaz respondedora para una molécula determinada (Alarcon and Martinez-Martin, 2010). La descripción de TC21 y RhoG como las primeras moléculas implicadas en la trogocitosis, las convierte en punto de partida para el estudio del proceso trogocítico en general y la resolución de la SI en particular.



# **Conclusiones**



## Conclusiones

### A) Las células T presentan una capacidad fagocítica remanente, mostrada por la utilización de bolas de látex recubiertas de anticuerpo específico para el TCR.

1. Las células T pueden fagocitar partículas de gran tamaño (1-6  $\mu\text{m}$ ) a través de la estimulación del TCR de manera específica. Esta capacidad muestra la existencia de la maquinaria requerida para un fenómeno fagocítico en la célula T, un fagocito no profesional.
2. Las partículas fagocitadas quedan englobadas intracelularmente en compartimentos multivesiculares, compartimento clásicamente implicado en fagocitosis.
3. La capacidad fagocítica de la célula T está bloqueado en ausencia de TC21 y RhoG o en presencia de formas dominantes negativas de ambas proteínas.

155

### B) TC21 y RhoG controlan la internalización de los TCR contactados desde la SI.

4. La internalización del TCR desde la SI está inhibida en ausencia de TC21 y RhoG.
5. En el proceso global de modulación negativa del TCR (niveles de TCR en membrana), TC21 y RhoG afectan a la internalización de un pequeño porcentaje de TCR, que corresponde a los TCR contactados e internalizados por un mecanismo independiente de clatrina, localizados en el cSMAC de la SI.
6. Los TCR contactados de manera TC21 y RhoG dependiente, siguen una ruta de internalización interaccionando con diferentes componentes del sistema de endocitosis, cuyo destino son los cuerpos multivesiculares.

### C) TC21 y RhoG controlan el proceso trogocítico.

7. La adquisición de fragmentos de membrana y los CPH procedentes de la célula presentadora de antígeno por parte de la célula T (trogocitosis), está inhibido en ausencia de TC21 y RhoG.
8. La internalización de los TCR contactados por un mecanismo independiente de clatrina, pero dependiente de TC21 y RhoG (ruta fagocítica) da lugar al proceso trogocítico.
9. La expresión del material adquirido en la membrana de la célula T está inhibido en ausencia de TC21 y RhoG, y esto se traduce en una incapacidad para convertirse en CPA para otras células T de la misma especificidad antigénica.

### D) Función de la formación de la SI.

10. La SI permite la incorporación de material a través del cSMAC, adquiriendo de esta manera una función degradativa de la señal (para su finalización) y la de reexpresión de la información procedente de la célula presentadora.



# **Bibliografía**

## Bibliografía

158

- Adamczewski, M., Numerof, R.P., Koretzky, G.A., and Kinet, J.P.** (1995). Regulation by CD45 of the tyrosine phosphorylation of high affinity IgE receptor beta- and gamma-chains. *J Immunol* 154, 3047-3055.
- Aderem, A.** (2002). How to Eat Something Bigger than Your Head. *Cell* 110, 5-8.
- Aderem, A., and Underhill, D.M.** (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593-623.
- Admyre, C., Telemo, E., Almqvist, N., Lötvall, J., Lahesmaa, R., Scheynius, A., and Gabrielsson, S.** (2008). Exosomes – nanovesicles with possible roles in allergic inflammation. *Allergy* 63, 404-408.
- Ahmadian, M.R., Stege, P., Scheffzek, K., and Wittinghofer, A.** (1997). Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat Struct Biol* 4, 686-689.
- Ahmed, K.A., Munegowda, M.A., Xie, Y., and Xiang, J.** (2008). Intercellular trogocytosis plays an important role in modulation of immune responses. *Cell Mol Immunol* 5, 261-269.
- Akakura, S., Kar, B., Singh, S., Cho, L., Tibrewal, N., Sanokawa-Akakura, R., Reichman, C., Ravichandran, K.S., and Birge, R.B.** (2005). C-terminal SH3 domain of CrkII regulates the assembly and function of the DOCK180/ELMO Rac-GEF. *J Cell Physiol* 204, 344-351.
- Alarcon, B., and Martinez-Martin, N.** (2010). Cytotoxic T cells. Handing over the baton. *Immunol Cell Biol* 88, 505-506.
- Alcover, A., and Alarcon, B.** (2000). Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit Rev Immunol* 20, 325-346.
- Allen, P.M., and Unanue, E.R.** (1984). Differential requirements for antigen processing by macrophages for lysozyme-specific T cell hybridomas. *J Immunol* 132, 1077-1079.
- Amyere, M., Payrastre, B., Krause, U., Van Der Smissen, P., Veithen, A., and Courtoy, P.J.** (2000). Constitutive macropinocytosis in oncogene-transformed fibroblasts depends on sequential permanent activation of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C. *Mol Biol Cell* 11, 3453-3467.
- An, Y., Shao, Y., Alory, C., Matteson, J., Sakisaka, T., Chen, W., Gibbs, R.A., Wilson, I.A., and Balch, W.E.** (2003). Geranylgeranyl switching regulates GDI-Rab GTPase recycling. *Structure* 11, 347-357.
- Andre, P., Boretto, J., Hueber, A.O., Reginier-Vigouroux, A., Gorvel, J.P., Ferrrier, P., and Chavrier, P.** (1997). A dominant-negative mutant of the Rab5 GTPase enhances T cell signaling by interfering with TCR down-modulation in transgenic mice. *J Immunol* 159, 5253-5263.
- Angkachatchai, V., and Finkel, T.H.** (1999). ADP-ribosylation of rho by C3 ribosyltransferase inhibits IL-2 production and sustained calcium influx in activated T cells. *J Immunol* 163, 3819-3825.
- Araki, N., Johnson, M.T., and Swanson, J.A.** (1996). A role for phosphoinositide

- 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* 135, 1249-1260.
- Arnold, P.Y., and Mannie, M.D.** (1999). Vesicles bearing MHC class II molecules mediate transfer of antigen from antigen-presenting cells to CD4+ T cells. *European Journal of Immunology* 29, 1363-1373.
- Arnold, P.Y., Davidian, D.K., and Mannie, M.D.** (1997). Antigen presentation by T cells: T cell receptor ligation promotes antigen acquisition from professional antigen-presenting cells. *European Journal of Immunology* 27, 3198-3205.
- Arora, S., Matta, A., Shukla, N.K., Deo, S.V., and Ralhan, R.** (2005). Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog* 42, 97-108.
- Arrieumerlou, C., Randriamampita, C., Bismuth, G., and Trautmann, A.** (2000). Rac is involved in early TCR signaling. *J Immunol* 165, 3182-3189.
- Aucher, A., Magdeleine, E., Joly, E., and Hudrisier, D.** (2008). Capture of plasma membrane fragments from target cells by trogocytosis requires signaling in T cells but not in B cells. *Blood* 111, 5621-5628.
- Aucher, A., Puigdomenech, I., Joly, E., Clotet, B., Hudrisier, D., and Blanco, J.** (2010). Could CD4 capture by CD8+ T cells play a role in HIV spreading? *J Biomed Biotechnol* 2010, 907371.
- Azzi, A., Boscoboinik, D., and Hensey, C.** (1992). The protein kinase C family. *Eur J Biochem* 208, 547-557.
- Badou, A., Savignac, M., Moreau, M., Lelclerc, C., Foucras, G., Cassar, G., Paulet, P., Lagrange, D., Druet, P., Guery, J.C., et al.** (2001). Weak TCR stimulation induces a calcium signal that triggers IL-4 synthesis, stronger TCR stimulation induces MAP kinases that control IFN-gamma production. *Eur J Immunol* 31, 2487-2496.
- Balagopalan, L., Barr, V.A., and Samelson, L.E.** (2009). Endocytic events in TCR signaling: focus on adapters in microclusters. *Immunol Rev* 232, 84-98.
- Balamuth, F., Leitenberg, D., Unternaehrer, J., Mellman, I., and Bottomly, K.** (2001). Distinct patterns of membrane microdomain partitioning in Th1 and th2 cells. *Immunity* 15, 729-738.
- Barbacid, M.** (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* 56, 779-827.
- Barda-Saad, M., Braiman, A., Titerence, R., Bunnell, S.C., Barr, V.A., and Samelson, L.E.** (2005). Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nat Immunol* 6, 80-89. Epub 2004 Nov 2021.
- Barker, K.T., and Crompton, M.R.** (1998). Ras-related TC21 is activated by mutation in a breast cancer cell line, but infrequently in breast carcinomas in vivo. *Br J Cancer* 78, 296-300.
- 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.
- Batista, A., Millan, J., Mittelbrunn, M., Sanchez-Madrid, F., and Alonso, M.A.** (2004). Recruitment of transferrin recep-

tor to immunological synapse in response to TCR engagement. *J Immunol* 172, 6709-6714.

**Batista, F.D., Iber, D., and Neuberger, M.S.** (2001). B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* 411, 489-494.

**Becker, J.C., Dummer, R., Hartmann, A.A., Burg, G., and Schmidt, R.E.** (1991). Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 147, 4398-4401.

**Beemiller, P., Hoppe, A.D., and Swanson, J.A.** (2006). A phosphatidylinositol-3-kinase-dependent signal transition regulates ARF1 and ARF6 during Fc-gamma receptor-mediated phagocytosis. *PLoS Biol* 4, e162.

**Bellanger, J.M., Astier, C., Sardet, C., Ohta, Y., Stossel, T.P., and Debant, A.** (2000). The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat Cell Biol* 2, 888-892.

**Bellanger, J.M., Estrach, S., Schmidt, S., Briancon-Marjollet, A., Zugasti, O., Fromont, S., and Debant, A.** (2003). Different regulation of the Trio Dbl-Homology domains by their associated PH domains. *Biol Cell* 95, 625-634.

**Beningo, K.A., and Wang, Y.L.** (2002). Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. *J Cell Sci* 115, 849-856.

**Beum, P.V., Mack, D.A., Pawluczko, A.W., Lindorfer, M.A., and Taylor, R.P.** (2008). Binding of rituximab, trastuzumab, cetuximab, or mAb T101 to cancer cells

promotes trogocytosis mediated by THP-1 cells and monocytes. *J Immunol* 181, 8120-8132.

**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.

**Blanchard, N., Di Bartolo, V., and Hivroz, C.** (2002). In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity* 17, 389-399.

**Blanchard, N., Lankar, D., Faure, F., Regnault, A., Dumont, C., Raposo, G., and Hivroz, C.** (2002). TCR Activation of Human T Cells Induces the Production of Exosomes Bearing the TCR/CD3/{zeta} Complex. *J Immunol* 168, 3235-3241.

**Blangy, A., Vignal, E., Schmidt, S., Debant, A., Gauthier-Rouviere, C., and Fort, P.** (2000b). TrioGEF1 controls Rac- and Cdc42-dependent cell structures through the direct activation of rhoG. *J Cell Sci* 113, 729-739.

**Boguski, M.S., and McCormick, F.** (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366, 643-654.

**Bohdanowicz, M., and Grinstein, S.** (2010). Vesicular traffic: a Rab SANDwich. *Curr Biol* 20, R311-314.

**Bona, C., Robineaux, R., Anteunis, A., Heuclin, C., and Astesano, A.** (1973). Transfer of antigen from macrophages to lymphocytes. II. Immunological significance of the transfer of lipopolysaccharide. *Immunology* 24, 831-840.

**Bonefeld, C.M., Rasmussen, A.B., Lau-**

- ritsen, J.P., von Essen, M., Odum, N., Andersen, P.S., and Geisler, C.** (2003). TCR comodulation of nonengaged TCR takes place by a protein kinase C and CD3 gamma di-leucine-based motif-dependent mechanism. *J Immunol* 171, 3003-3009.
- Bongrand, P., and Golstein, P.** (1983). Reproducible dissociation of cellular aggregates with a wide range of calibrated shear forces: application to cytolytic lymphocyte target cell conjugates. *J Immunol Methods* 58, 209-224.
- Bongrand, P., Pierres, M., and Golstein, P.** (1983). T cell-mediated cytotoxicity: on the strength of effectortarget cell interaction. *European Journal of Immunology* 13, 424-429.
- Bonifacino, J.S., and Weissman, A.M.** (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 19-57.
- Bos, J.L.** (1997). Ras-like GTPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1333, M19-M31.
- Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A.** (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877.
- Botelho, R.J., Teruel, M., Dierckman, R., Anderson, R., Wells, A., York, J.D., Meyer, T., and Grinstein, S.** (2000). Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J Cell Biol* 151, 1353-1368.
- Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Berezovskaya, A., Barber, D.L., and Nadler, L.M.** (1997). Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* 278, 124-128.
- Brezinschek, R.I., Oppenheimer-Marks, N., and Lipsky, P.E.** (1999). Activated T cells acquire endothelial cell surface determinants during transendothelial migration. *J Immunol* 162, 1677-1684.
- Brossard, C., Feuillet, V., Schmitt, A., Randriamampita, C., Romao, M., Raposo, G., and Trautmann, A.** (2005). Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse. *Eur J Immunol* 35, 1741-1753.
- Brunet, N., Morin, A., and Olofsson, B.** (2002). RhoGDI-3 regulates RhoG and targets this protein to the Golgi complex through its unique N-terminal domain. *Traffic* 3, 342-357.
- Buday, L., Egan, S.E., Rodriguez Viciano, P., Cantrell, D.A., and Downward, J.** (1994). A complex of Grb2 adaptor protein, Sos exchange factor, and a 36-kDa membrane-bound tyrosine phosphoprotein is implicated in ras activation in T cells. *J Biol Chem* 269, 9019-9023.
- 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.
- Bustelo, X.R., Sauzeau, V., and Berenjano, I.M.** (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29, 356-370.
- Caloca, M.J., Zugaza, J.L., Matallanas, D., Crespo, P., and Bustelo, X.R.** (2003). Vav mediates Ras stimulation by direct activation of the GDP/GTP exchange factor Ras GRP1. *EMBO J* 22, 3326-3336.

- 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. Epub 2005 Oct 1010.
- Cantrell, D.A.** (2003). GTPases and T cell activation. *Immunological Reviews* 192, 122-130.
- Caplan, S., Zeligler, S., Wang, L., and Baniyash, M.** (1995). Cell-surface-expressed T-cell antigen-receptor zeta chain is associated with the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4768-4772.
- Capo, C., Garrouste, F., Benoliel, A.M., Bongrand, P., Ryter, A., and Bell, G.I.** (1982). Concanavalin-A-mediated thymocyte agglutination: a model for a quantitative study of cell adhesion. *J Cell Sci* 56, 21-48.
- Carboni, J.M., Yan, N., Cox, A.D., Bustelo, X., Graham, S.M., Lynch, M.J., Weinmann, R., Seizinger, B.R., Der, C.J., Barbacid, M., et al.** (1995). Farnesyltransferase inhibitors are inhibitors of Ras but not R-Ras2/TC21, transformation. *Oncogene* 10, 1905-1913.
- Carlin, L.M., Eleme, K., McCann, F.E., and Davis, D.M.** (2001). Intercellular transfer and supramolecular organization of human leukocyte antigen C at inhibitory natural killer cell immune synapses. *J Exp Med* 194, 1507-1517.
- Carlin, L.M., Yanagi, K., Verhoef, A., Hoehn, E.N.M.N.-t., Yates, J., Gardner, L., Lamb, J., Lombardi, G., Dallman, M.J., and Davis, D.M.** (2005). Secretion of IFN- $\gamma$  and not IL-2 by anergic human T cells correlates with assembly of an immature immune synapse. *Blood* 106, 3874-3879.
- Caron, E., and Hall, A.** (1998). Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* 282, 1717-1721.
- Caumartin, J., LeMaoult, J., and Carosella, E.D.** (2006). Intercellular exchanges of membrane patches (trogocytosis) highlight the next level of immune plasticity. *Transplant Immunology* 17, 20-22.
- Cemerski, S., Das, J., Giurisato, E., Markiewicz, M.A., Allen, P.M., Chakraborty, A.K., and Shaw, A.S.** (2008). The balance between T cell receptor signaling and degradation at the center of the immunological synapse is determined by antigen quality. *Immunity* 29, 414-422. Epub 2008 Aug 2028.
- Cemerski, S., Das, J., Locasale, J., Arnold, P., Giurisato, E., Markiewicz, M.A., Fremont, D., Allen, P.M., Chakraborty, A.K., and Shaw, A.S.** (2007). The stimulatory potency of T cell antigens is influenced by the formation of the immunological synapse. *Immunity* 26, 345-355.
- Cenciarelli, C., Hou, D., Hsu, K.C., Rellahan, B.L., Wiest, D.L., Smith, H.T., Fried, V.A., and Weissman, A.M.** (1992). Activation-induced ubiquitination of the T cell antigen receptor. *Science* 257, 795-797.
- Cenciarelli, C., Wilhelm, K.G., Jr., Guo, A., and Weissman, A.M.** (1996). T cell antigen receptor ubiquitination is a consequence of receptor-mediated tyrosine kinase activation. *J Biol Chem* 271, 8709-8713.
- Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Ba-**

- nerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., et al.** (2007). Asymmetric T Lymphocyte Division in the Initiation of Adaptive Immune Responses. *Science* 315, 1687-1691.
- Cheeseman, K.L., Ueyama, T., Michaud, T.M., Kashiwagi, K., Wang, D., Flax, L.A., Shirai, Y., Loegering, D.J., Saito, N., and Lennartz, M.R.** (2006). Targeting of protein kinase C-epsilon during Fc-gamma receptor-dependent phagocytosis requires the epsilonC1B domain and phospholipase C-gamma1. *Mol Biol Cell* 17, 799-813.
- Chen, Y., Yang, B., and Jacobson, K.** (2004). Transient confinement zones: a type of lipid raft? *Lipids* 39, 1115-1119.
- Chhatriwala, M.K., Betts, L., Worthylake, D.K., and Sondak, J.** (2007). The DH and PH domains of Trio coordinately engage Rho GTPases for their efficient activation. *J Mol Biol* 368, 1307-1320.
- Choudhuri, K., and Dustin, M.L.** (2010). Signaling microdomains in T cells. *FEBS Lett.*
- Chow, A.Y., and Mellman, I.** (2005). Old lysosomes, new tricks: MHC II dynamics in DCs. *Trends Immunol* 26, 72-78.
- Clark, G.J., Kinch, M.S., Gilmer, T.M., Burrige, K., and Der, C.J.** (1996). Overexpression of the Ras-related TC21/R-Ras2 protein may contribute to the development of human breast cancers. *Oncogene* 12, 169-176.
- Cooney, D.S., Phee, H., Jacob, A., and Coggeshall, K.M.** (2001). Signal transduction by human-restricted Fc gamma RIIa involves three distinct cytoplasmic kinase families leading to phagocytosis. *J Immunol* 167, 844-854.
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., and Gutkind, J.S.** (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81, 1137-1146.
- Costello, P.S., Gallagher, M., and Cantrell, D.A.** (2002). Sustained and dynamic inositol lipid metabolism inside and outside the immunological synapse. *Nat Immunol* 3, 1082-1089. Epub 2002 Oct 1021.
- Cox, D., and Greenberg, S.** (2001). Phagocytic signaling strategies: Fc(gamma)receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Semin Immunol* 13, 339-345.
- Cox, D., Berg, J.S., Cammer, M., Chingwundoh, J.O., Dale, B.M., Cheney, R.E., and Greenberg, S.** (2002). Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis. *Nat Cell Biol* 4, 469-477.
- Cox, D., Chang, P., Zhang, Q., Reddy, P.G., Bokoch, G.M., and Greenberg, S.** (1997). Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J Exp Med* 186, 1487-1494.
- Cox, D., Lee, D.J., Dale, B.M., Calafat, J., and Greenberg, S.** (2000). A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 680-685.
- Cox, D., Tseng, C.C., Bjekic, G., and Greenberg, S.** (1999). A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J Biol Chem* 274, 1240-1247.
- Cox, J.H., McMichael, A.J., Screaton, G.R., and Xu, X.N.** (2007). CTLs target Th cells that acquire bystander MHC class I-peptide

complex from APCs. *J Immunol* 179, 830-836.

**Croft, M., Duncan, D.D., and Swain, S.L.** (1992). Response of naive antigen-specific CD4+ T cells in vitro: characteristics and antigen-presenting cell requirements. *J Exp Med* 176, 1431-1437.

**Damiani, M.T., Pavarotti, M., Leiva, N., Lindsay, A.J., McCaffrey, M.W., and Colombo, M.I.** (2004). Rab coupling protein associates with phagosomes and regulates recycling from the phagosomal compartment. *Traffic* 5, 785-797.

**D'Angelo, R., Aresta, S., Blangy, A., Del Maestro, L., Louvard, D., and Arpin, M.** (2007). Interaction of ezrin with the novel guanine nucleotide exchange factor PLEKHG6 promotes RhoG-dependent apical cytoskeleton rearrangements in epithelial cells. *Mol Biol Cell* 18, 4780-4793.

**Das, V., Nal, B., Dujeancourt, A., Thouloze, 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.

**Daubeuf, S., Aucher, A., Bordier, C., Sallès, A., Serre, L., Gaibelet, G., Faye, J.C., Favre, G., Joly, E., and Hudrisier, D.** (2010a). Preferential transfer of certain plasma membrane proteins onto T and B cells by trogocytosis. *PLoS One* 5, e8716.

**Daubeuf, S., Bordier, C., Hudrisier, D., and Joly, E.** (2009). Suitability of various membrane lipophilic probes for the detection of trogocytosis by flow cytometry. *Cytometry A* 75, 380-389.

**Daubeuf, S., Lindorfer, M.A., Taylor, R.P., Joly, E., and Hudrisier, D.** (2010b). The direction of plasma membrane exchange between lymphocytes and accessory cells by trogocytosis is influenced by the nature of the accessory cell. *J Immunol* 184, 1897-1908.

**Davis, D.M.** (2007). Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. *Nat Rev Immunol* 7, 238-243. Epub 2007 Feb 2009.

**Davis, D.M., and Dustin, M.L.** (2004). What is the importance of the immunological synapse? *Trends in Immunology* 25, 323-327.

**deBakker, C.D., Haney, L.B., Kinchen, J.M., Grimsley, C., Lu, M., Klingele, D., Hsu, P.K., Chou, B.K., Cheng, L.C., Blangy, A., et al.** (2004). Phagocytosis of apoptotic cells is regulated by a UNC-73/TRIO-MIG-2/RhoG signaling module and armadillo repeats of CED-12/ELMO. *Curr Biol* 14, 2208-2216.

**Debant, A., Serra-Pages, C., Seipel, K., O'Brien, S., Tang, M., Park, S.H., and Streuli, M.** (1996). The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5466-5471.

**Delgado, P., Cubelos, B., Calleja, E., Martinez-Martin, N., Cipres, A., Merida, I., Bellas, C., Bustelo, X.R., and Alarcon, B.** (2009). Essential function for the GTPase TC21 in homeostatic antigen receptor signaling. *Nat Immunol* 10, 880-888. Epub

2009 Jun 2028.

- Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S., and Dennis, J.W.** (2001). Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* 409, 733-739.
- DeMond, A.L., Mossman, K.D., Starr, T., Dustin, M.L., and Groves, J.T.** (2008). T Cell Receptor Microcluster Transport through Molecular Mazes Reveals Mechanism of Translocation. *Biophysical journal* 94, 3286-3292.
- Denzer, K., Kleijmeer, M.J., Heijnen, H.F., Stoorvogel, W., and Geuze, H.J.** (2000). Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci* 113 Pt 19, 3365-3374.
- DerMardirossian, C., and Bokoch, G.M.** (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* 15, 356-363.
- Desjardins, M., and Griffiths, G.** (2003). Phagocytosis: latex leads the way. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 498-503.
- Di, A., Krupa, B., Bindokas, V.P., Chen, Y., Brown, M.E., Palfrey, H.C., Naren, A.P., Kirk, K.L., and Nelson, D.J.** (2002). Quantal release of free radicals during exocytosis of phagosomes. *Nat Cell Biol* 4, 279-285.
- Dietrich, J., Backstrom, T., Lauritsen, J.P., Kastrup, J., Christensen, M.D., von Bulow, F., Palmer, E., and Geisler, C.** (1998). The phosphorylation state of CD3-gamma influences T cell responsiveness and controls T cell receptor cycling. *J Biol Chem* 273, 24232-24238.
- Dietrich, J., Hou, X., Wegener, A.M., and Geisler, C.** (1994). CD3 gamma contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. *Embo J* 13, 2156-2166.
- Dietrich, J., Kastrup, J., Nielsen, B.L., Odum, N., and Geisler, C.** (1997). Regulation and function of the CD3gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J Cell Biol* 138, 271-281.
- Dietrich, J., Menne, C., Lauritsen, J.P., von Essen, M., Rasmussen, A.B., Odum, N., and Geisler, C.** (2002). Ligand-induced TCR down-regulation is not dependent on constitutive TCR cycling. *J Immunol* 168, 5434-5440.
- Dobereiner, H.G., Dubin-Thaler, B.J., Hoffman, J.M., Xenias, H.S., Sims, T.N., Giannone, G., Dustin, M.L., Wiggins, C.H., and Sheetz, M.P.** (2006). Lateral membrane waves constitute a universal dynamic pattern of motile cells. *Phys Rev Lett* 97, 038102.
- Doh, J., and Irvine, D.J.** (2006). Immunological synapse arrays: patterned protein surfaces that modulate immunological synapse structure formation in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5700-5705.
- Domaica, C.I., Fuertes, M.B., Rossi, L.E., Girart, M.V., Avila, D.E., Rabinovich, G.A., and Zwirner, N.W.** (2009). Tumour-experienced T cells promote NK cell activity through trogocytosis of NKG2D and NKp46 ligands. *EMBO Rep* 10, 908-915.
- D'Oro, U., and Ashwell, J.D.** (1999). Cutting Edge: The CD45 Tyrosine Phosphatase Is an Inhibitor of Lck Activity in Thymocytes. *J Immunol* 162, 1879-1883.

- Douglass, A.D., and Vale, R.D.** (2005). Single-Molecule Microscopy Reveals Plasma Membrane Microdomains Created by Protein-Protein Networks that Exclude or Trap Signaling Molecules in T Cells. *Cell* 121, 937-950.
- Downward, J., Graves, J.D., Warne, P.H., Rayter, S., and Cantrell, D.A.** (1990). Stimulation of p21ras upon T-cell activation. *Nature* 346, 719-723.
- Dransart, E., Morin, A., Cherfils, J., and Olofsson, B.** (2005). Uncoupling of Inhibitory and Shuttling Functions of Rho GDP Dissociation Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 280, 4674-4683.
- Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Hall, A., and Glotzer, M.** (1997). A requirement for Rho and Cdc42 during cytokinesis in *Xenopus* embryos. *Curr Biol* 7, 12-23.
- Duan, L., Reddi, A.L., Ghosh, A., Dimri, M., and Band, H.** (2004). The Cbl family and other ubiquitin ligases: destructive forces in control of antigen receptor signaling. *Immunity* 21, 7-17.
- Dustin, M.** (2002). The immunological synapse. *Arthritis Res* 4, S119 - S125.
- Dustin, M.L.** (2006). Impact of the immunological synapse on T cell signaling. *Results Probl Cell Differ* 43, 175-198.
- Dustin, M.L., and Chan, A.C.** (2000). Signaling takes shape in the immune system. *Cell* 103, 283 - 294.
- Dustin, M.L., Tseng, S.Y., Varma, R., and Campi, G.** (2006). T cell-dendritic cell immunological synapses. *Curr Opin Immunol* 18, 512-516.
- Egen, J.G., and Allison, J.P.** (2002). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* 16, 23-35.
- Ehrhardt, G.R., Leslie, K.B., Lee, F., WIELER, J.S., and Schrader, J.W.** (1999). M-Ras, a widely expressed 29-kD homologue of p21 Ras: expression of a constitutively active mutant results in factor-independent growth of an interleukin-3-dependent cell line. *Blood* 94, 2433-2444.
- Ehrlich, L.I., Ebert, P.J., Krummel, M.F., Weiss, A., and Davis, M.M.** (2002). Dynamics of p56lck translocation to the T cell immunological synapse following agonist and antagonist stimulation. *Immunity* 17, 809-822.
- Elfenbein, A., Rhodes, J.M., Meller, J., Schwartz, M.A., Matsuda, M., and Simons, M.** (2009). Suppression of RhoG activity is mediated by a syndecan 4-synectin-RhoGDI1 complex and is reversed by PKCalpha in a Rac1 activation pathway. *J Cell Biol* 186, 75-83.
- Ellerbroek, S.M., Wennerberg, K., Arthur, W.T., Dunty, J.M., Bowman, D.R., DeMali, K.A., Der, C., and Burridge, K.** (2004). SGEF, a RhoG guanine nucleotide exchange factor that stimulates macropinocytosis. *Mol Biol Cell* 15, 3309-3319.
- Ellis, S., and Mellor, H.** (2000). Regulation of endocytic traffic by Rho family GTPases. *Trends in Cell Biology* 10, 85-88.
- Erdogan, M., Pozzi, A., Bhowmick, N., Moses, H.L., and Zent, R.** (2007). Signaling pathways regulating TC21-induced tumorigenesis. *J Biol Chem* 282, 27713-27720. Epub 22007 Jul 27726.
- Eriksson, M., Leitz, G., Fallman, E., Axner, O., Ryan, J.C., Nakamura, M.C.,**

- and Sentman, C.L.** (1999). Inhibitory receptors alter natural killer cell interactions with target cells yet allow simultaneous killing of susceptible targets. *J Exp Med* 190, 1005-1012.
- Erwig, L.P., McPhillips, K.A., Wynes, M.W., Ivetic, A., Ridley, A.J., and Henson, P.M.** (2006). Differential regulation of phagosome maturation in macrophages and dendritic cells mediated by Rho GTPases and ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12825-12830.
- Espinosa, E., Tabiasco, J., Hudrisier, D., and Fournie, J.J.** (2002). Synaptic transfer by human gamma delta T cells stimulated with soluble or cellular antigens. *J Immunol* 168, 6336-6343.
- Estrach, S., Schmidt, S., Diriong, S., Penna, A., Blangy, A., Fort, P., and Debant, A.** (2002). The Human Rho-GEF trio and its target GTPase RhoG are involved in the NGF pathway, leading to neurite outgrowth. *Curr Biol* 12, 307-312.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A.** (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Fackler, O.T., Alcover, A., and Schwartz, O.** (2007). Modulation of the immunological synapse: a key to HIV-1 pathogenesis? *Nat Rev Immunol* 7, 310-317.
- Faure, S., Salazar-Fontana, L.I., Semichon, M., Tybulewicz, V.L., Bismuth, G., Trautmann, A., Germain, R.N., and Delon, J.** (2004). ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat Immunol* 5, 272-279.
- Ferraro, F., Ma, X.M., Sobota, J.A., Eipper, B.A., and Mains, R.E.** (2007). Kalirin/Trio Rho guanine nucleotide exchange factors regulate a novel step in secretory granule maturation. *Mol Biol Cell* 18, 4813-4825.
- Fields, P.E., Gajewski, T.F., and Fitch, F.W.** (1996). Blocked Ras activation in anergic CD4+ T cells. *Science* 271, 1276-1278.
- Finetti, F., Paccani, S.R., Riparbelli, M.G., Giacomello, E., Perinetti, G., Pazour, G.J., Rosenbaum, J.L., and Baldari, C.T.** (2009). Intraflagellar transport is required for polarized recycling of the TCR/CD3 complex to the immune synapse. *Nat Cell Biol* 11, 1332-1339.
- Fisher, G.W., Conrad, P.A., DeBiasio, R.L., and Taylor, D.L.** (1988). Centripetal transport of cytoplasm, actin, and the cell surface in lamellipodia of fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton* 11, 235-247.
- Fleire, S.J., Goldman, J.P., Carrasco, Y.R., Weber, M., Bray, D., and Batista, F.D.** (2006). B cell ligand discrimination through a spreading and contraction response. *Science* 312, 738-741.
- Fooksman, D.R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D.A., Waite, J., Sacristan, C., Victora, G.D., Zanin-Zhorov, A., and Dustin, M.L.** (2010). Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu* 28, 79-105.
- Fujimoto, S., Negishi, M., and Katoh, H.** (2009). RhoG promotes neural progenitor cell proliferation in mouse cerebral cortex. *Mol Biol Cell* 20, 4941-4950.
- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J., and Desjardins, M.** (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a me-

- chanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119-131.
- Game, D.S., Rogers, N.J., and Lechler, R.I.** (2005). Acquisition of HLA-DR and costimulatory molecules by T cells from allogeneic antigen presenting cells. *Am J Transplant* 5, 1614-1625.
- Gauthier-Rouviere, C., Vignal, E., Meriane, M., Roux, P., Montcourier, P., and Fort, P.** (1998). RhoG GTPase controls a pathway that independently activates Rac1 and Cdc42Hs. *Mol Biol Cell* 9, 1379-1394.
- Geisler, C.** (2004). TCR trafficking in resting and stimulated T cells. *Crit Rev Immunol* 24, 67-86.
- Genot, E., and Cantrell, D.A.** (2000). Ras regulation and function in lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* 12, 289-294.
- Genot, E.M., Arrieumerlou, C., Ku, G., Burgering, B.M., Weiss, A., and Kramer, I.M.** (2000). The T-cell receptor regulates Akt (protein kinase B) via a pathway involving Rac1 and phosphatidylinositide 3-kinase. *Mol Cell Biol* 20, 5469-5478.
- Gerisch, G., Ecke, M., Schroth-Diez, B., Gerwig, S., Engel, U., Maddera, L., and Clarke, M.** (2009). Self-organizing actin waves as planar phagocytic cup structures. *Cell Adh Migr* 3, 373-382. Epub 2009 Oct 2001.
- Geuze, H.J.** (1998). The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol Today* 19, 282-287.
- Gil, D., Schamel, W.W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F., and Alarcon, B.** (2002). Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation. *Cell* 109, 901-912.
- Glaven, J.A., Whitehead, I., Bagrodia, S., Kay, R., and Cerione, R.A.** (1999). The Dbl-related protein, Lfc, localizes to microtubules and mediates the activation of Rac signaling pathways in cells. *J Biol Chem* 274, 2279-2285.
- Glebov, O.O., and Nichols, B.J.** (2004). Lipid raft proteins have a random distribution during localized activation of the T-cell receptor. *Nat Cell Biol* 6, 238-243. Epub 2004 Feb 2008.
- Gomes, E.R., Jani, S., and Gundersen, G.G.** (2005). Nuclear Movement Regulated by Cdc42, MRCK, Myosin, and Actin Flow Establishes MTOC Polarization in Migrating Cells. *Cell* 121, 451-463.
- Gong, Q., Huntsman, C., and Ma, D.** (2008). Clathrin-independent internalization and recycling. *J Cell Mol Med* 12, 126-144.
- Gotoh, T., Niino, Y., Tokuda, M., Hatase, O., Nakamura, S., Matsuda, M., and Hattori, S.** (1997). Activation of R-Ras by Ras-guanine nucleotide-releasing factor. *J Biol Chem* 272, 18602-18607.
- Graham, S.M., Oldham, S.M., Martin, C.B., Drugan, J.K., Zohn, I.E., Campbell, S., and Der, C.J.** (1999). TC21 and Ras share indistinguishable transforming and differentiating activities. *Oncogene* 18, 2107-2116.
- Graham, S.M., Vojtek, A.B., Huff, S.Y., Cox, A.D., Clark, G.J., Cooper, J.A., and Der, C.J.** (1996). TC21 causes transformation by Raf-independent signaling pathways. *Mol Cell Biol* 16, 6132-6140.
- 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 [see comments]. *Science* 285, 221-227.
- Greenberg, S.** (1999). Modular components of phagocytosis. *J Leukoc Biol* 66, 712-717.
- Greenberg, S.** (2001). Diversity in phagocytic signalling. *J Cell Sci* 114, 1039-1040.
- Grimsley, C., and Ravichandran, K.S.** (2003). Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol* 13, 648-656.
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T.** (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734-738.
- Guery, J.C., and Adorini, L.** (1995). Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T cells. *J Immunol* 154, 536-544.
- Gumienny, T.L., Brugnera, E., Tosello-Tramont, A.C., Kinchen, J.M., Haney, L.B., Nishiwaki, K., Walk, S.F., Nemer-gut, M.E., Macara, I.G., Francis, R., et al.** (2001). CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* 107, 27-41.
- Guselnikov, S.V., Bell, A., Najakshin, A.M., Robert, J., and Taranin, A.V.** (2003). Signaling FcRgamma and TCRzeta subunit homologs in the amphibian *Xenopus laevis*. *Dev Comp Immunol* 27, 727-733.
- Hailman, E., Burack, W.R., Shaw, A.S., Dustin, M.L., and Allen, P.M.** (2002). Immature CD4(+)CD8(+) thymocytes form a multifocal immunological synapse with sustained tyrosine phosphorylation. *Immunity* 16, 839-848.
- Hall, A.** (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 249, 635-640.
- Hall, A.** (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 33, 891-895.
- Hall, A., and Lalli, G.** Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a001818.
- Hao, S., Yuan, J., Xu, S., Munegowda, M.A., Deng, Y., Gordon, J., Xing, Z., and Xiang, J.** (2008). Antigen specificity acquisition of adoptive CD4+ regulatory T cells via acquired peptide-MHC class I complexes. *J Immunol* 181, 2428-2437.
- Harriague, J., and Bismuth, G.** (2002). Imaging antigen-induced PI3K activation in T cells. *Nat Immunol* 3, 1090-1096.
- Harrison, R.E., Bucci, C., Vieira, O.V., Schroer, T.A., and Grinstein, S.** (2003). Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Mol Cell Biol* 23, 6494-6506.
- Hartman, N.C., Nye, J.A., and Groves, J.T.** (2009). Cluster size regulates protein sorting in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12729-12734.
- Hashimoto-Tane, A., Yokosuka, T., Ishihara, C., Sakuma, M., Kobayashi, W., and Saito, T.** T-cell receptor microclusters critical for T-cell activation are formed independently of lipid raft clustering. *Mol Cell Biol* 30, 3421-3429.
- Hattori, S., Maekawa, M., and Nakamura, S.** (1992). Identification of neurofibro-

matosis type I gene product as an insoluble GTPase-activating protein toward ras p21. *Oncogene* 7, 481-485.

**Hayashi, K., and Altman, A.** (2006). Filamin A Is Required for T Cell Activation Mediated by Protein Kinase C- $\theta$ . *J Immunol* 177, 1721-1728.

**He, T., Tang, C., Liu, Y., Ye, Z., Wu, X., Wei, Y., Moyana, T., and Xiang, J.** (2007). Bi-directional membrane molecule transfer between dendritic and T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 359, 202-208.

**He, T., Zong, S., Wu, X., Wei, Y., and Xiang, J.** (2007). CD4+ T cell acquisition of the bystander pMHC I colocalizing in the same immunological synapse comprising pMHC II and costimulatory CD40, CD54, CD80, OX40L, and 41BBL. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 362, 822-828.

**Henson, P.M.** (2005). Engulfment: ingestion and migration with Rac, Rho and TRIO. *Curr Biol* 15, R29-30.

**Herrera, O.B., Golshayan, D., Tibbott, R., Salcido Ochoa, F., James, M.J., Marelli-Berg, F.M., and Lechler, R.I.** (2004). A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* 173, 4828-4837.

**Hewang, L., Hui-Fang, L., Robin, A.F., Ammasi, P., and Pedro, A.J.** (2008). Rab4 and Rab11 coordinately regulate the recycling of angiotensin II type I receptor as demonstrated by fluorescence resonance energy transfer microscopy. *Journal of Biomedical Optics* 13, 031206.

**Hinshaw, J.E.** (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol*

16, 483-519.

**Hiramoto, K., Negishi, M., and Katoh, H.** (2006). Dock4 is regulated by RhoG and promotes Rac-dependent cell migration. *Exp Cell Res* 312, 4205-4216.

**Hiramoto-Yamaki, N., Takeuchi, S., Ueda, S., Harada, K., Fujimoto, S., Negishi, M., and Katoh, H.** (2010). Ephexin4 and EphA2 mediate cell migration through a RhoG-dependent mechanism. *J Cell Biol* 190, 461-477.

**Holsinger, L.J., Spencer, D.M., Austin, D.J., Schreiber, S.L., and Crabtree, G.R.** (1995). Signal transduction in T lymphocytes using a conditional allele of Sos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9810-9814.

**HoWangYin, K.Y., Alegre, E., Daouya, M., Favier, B., Carosella, E.D., and LeMaoult, J.** (2010). Different functional outcomes of intercellular membrane transfers to monocytes and T cells. *Cell Mol Life Sci* 67, 1133-1145.

**Huang, F., Goh, L.K., and Sorkin, A.** (2007). EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16904-16909.

**Huang, J.F., Yang, Y., Sepulveda, H., Shi, W., Hwang, I., Peterson, P.A., Jackson, M.R., Sprent, J., and Cai, Z.** (1999a). TCR-mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science* 286, 952 - 954.

**Huang, Y., Saez, R., Chao, L., Santos, E., Aaronson, S.A., and Chan, A.M.** (1995). A novel insertional mutation in the TC21 gene activates its transforming activity in a human leiomyosarcoma cell line. *Oncogene* 11, 1255-1260.

- Huang, Z.Y., Barreda, D.R., Worth, R.G., Indik, Z.K., Kim, M.K., Chien, P., and Schreiber, A.D.** (2006). Differential kinase requirements in human and mouse Fc-gamma receptor phagocytosis and endocytosis. *J Leukoc Biol* 80, 1553-1562.
- Hudrisier, D., and Bongrand, P.** (2002). Intercellular transfer of antigen-presenting cell determinants onto T cells: molecular mechanisms and biological significance. *FASEB J* 16, 477-486.
- Hudrisier, D., Aucher, A., Puaux, A.L., Bordier, C., and Joly, E.** (2007). Capture of target cell membrane components via trogocytosis is triggered by a selected set of surface molecules on T or B cells. *J Immunol* 178, 3637-3647.
- Hudrisier, D., Clemenceau, B., Balor, S., Daubeuf, S., Magdeleine, E., Daeron, M., Bruhns, P., and Vie, H.** (2009). Ligand binding but undetected functional response of FcR after their capture by T cells via trogocytosis. *J Immunol* 183, 6102-6113.
- Hudrisier, D., Riond, J., Mazarguil, H., Gairin, J.E., and Joly, E.** (2001). Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner. *J Immunol* 166, 3645-3649.
- Hudson, L., and Sprent, J.** (1976). Specific adsorption of IgM antibody onto H-2-activated mouse T lymphocytes. *J Exp Med* 143, 444-449.
- Hudson, L., Sprent, J., Miller, J.F., and Playfair, J.H.** (1974). B cell-derived immunoglobulin on activated mouse T lymphocytes. *Nature* 251, 60-62.
- Huff, S.Y., Quilliam, L.A., Cox, A.D., and Der, C.J.** (1997). R-Ras is regulated by activators and effectors distinct from those that control Ras function. *Oncogene* 14, 133-143.
- Hurley, J.H.** (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol* 20, 4-11.
- Huynh, K.K., and Grinstein, S.** (2008). Phagocytosis: dynamin's dual role in phagosome biogenesis. *Curr Biol* 18, R563-565.
- Hwang, I., and Sprent, J.** (2001). Role of the actin cytoskeleton in T cell absorption and internalization of ligands from APC. *J Immunol* 166, 5099-5107.
- Hwang, I., Huang, J.F., Kishimoto, H., Brunmark, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R., Surh, C.D., Cai, Z., and Sprent, J.** (2000). T cells can use either T cell receptor or CD28 receptors to absorb and internalize cell surface molecules derived from antigen-presenting cells. *J Exp Med* 191, 1137-1148.
- 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.
- Izquierdo, M., Downward, J., Graves, J.D., and Cantrell, D.A.** (1992). Role of protein kinase C in T-cell antigen receptor regulation of p21ras: evidence that two p21ras regulatory pathways coexist in T cells. *Mol Cell Biol* 12, 3305-3312.
- Jacinto, E., Werlen, G., and Karin, M.** (1998). Cooperation between Syk and Rac1 leads to synergistic JNK activation in T lymphocytes. *Immunity* 8, 31-41.
- Jaffe, A.B., and Hall, A.** (2005). Rho GTPa-

ses: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.

**Janes, P.W., Ley, S.C., and Magee, A.I.** (1999). Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol* 147, 447-461.

**Jimenez-Baranda, S., Gomez-Mouton, C., Rojas, A., Martinez-Prats, L., Mira, E., Ana Lacalle, R., Valencia, A., Dimitrov, D.S., Viola, A., Delgado, R., et al.** (2007). Filamin-A regulates actin-dependent clustering of HIV receptors. *Nat Cell Biol* 9, 838-846.

**Johnson, K.G., Bromley, S.K., Dustin, M.L., and Thomas, M.L.** (2000). A supra-molecular basis for CD45 regulation during T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10138 - 10143.

**Joly, E., and Hudrisier, D.** (2003). What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat Immunol* 4, 815.

**Kabouridis, P.S., Magee, A.I., and Ley, S.C.** (1997). S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *EMBO J* 16, 4983-4998.

*Kaizuka, Y., Douglass, A.D., Varma, R., Dustin, M.L., and Vale, R.D.* (2007). Mechanisms for segregating T cell receptor and adhesion molecules during immunological synapse formation in Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20296-20301.

**Katoh, H., and Negishi, M.** (2003). RhoG activates Rac1 by direct interaction with the Dock180-binding protein Elmo. *Nature* 424, 461-464.

**Katoh, H., Hiramoto, K., and Negishi, M.** (2006). Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *J Cell Sci* 119, 56-65.

**Katoh, H., Yasui, H., Yamaguchi, Y., Aoki, J., Fujita, H., Mori, K., and Negishi, M.** (2000). Small GTPase RhoG is a key regulator for neurite outgrowth in PC12 cells. *Mol Cell Biol* 20, 7378-7387.

**Katzmann, D.J., Odorizzi, G., and Emr, S.D.** (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 893-905.

**Keely, P.J., Rusyn, E.V., Cox, A.D., and Parise, L.V.** (1999). R-Ras signals through specific integrin alpha cytoplasmic domains to promote migration and invasion of breast epithelial cells. *J Cell Biol* 145, 1077-1088.

**Kelley, G.G., Reks, S.E., and Smrcka, A.V.** (2004). Hormonal regulation of phospholipase Cepsilon through distinct and overlapping pathways involving G12 and Ras family G-proteins. *Biochem J* 378, 129-139.

**Kennedy, R., Undale, A.H., Kieper, W.C., Block, M.S., Pease, L.R., and Celis, E.** (2005). Direct cross-priming by th lymphocytes generates memory cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 174, 3967-3977.

**Khvotchev, M.V., Ren, M., Takamori, S., Jahn, R., and Sudhof, T.C.** (2003). Divergent functions of neuronal Rab11b in Ca<sup>2+</sup>-regulated versus constitutive exocytosis. *J Neurosci* 23, 10531-10539.

**Kinchen, J.M., and Ravichandran, K.S.** (2008). Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 781-795.

**Kinchen, J.M., Doukoumetzidis, K., Almendinger, J., Stergiou, L., Tosello-Tramont, A., Sifri, C.D., Hengartner, M.O., and Ravichandran, K.S.** (2008). A pathway for phagosome maturation during

- engulfment of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* 10, 556-566.
- Kirkham, M., and Parton, R.G.** (2005). Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta* 1746, 349-363.
- Kleijmeer, M., Ramm, G., Schuurhuis, D., Griffith, J., Rescigno, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Rudensky, A.Y., Ossendorp, F., Melief, C.J., Stoorvogel, W., et al.** (2001). Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J Cell Biol* 155, 53-63.
- Kobayashi, T., Beuchat, M.H., Chevallier, J., Makino, A., Mayran, N., Escola, J.M., Lebrand, C., Cosson, P., and Gruenberg, J.** (2002). Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J Biol Chem* 277, 32157-32164.
- Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K.S., de Moerloose, P., Parton, R.G., and Gruenberg, J.** (1998). A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392, 193-197.
- Korade-Mirnic, Z., and Corey, S.J.** (2000). Src kinase-mediated signaling in leukocytes. *J Leukoc Biol* 68, 603-613.
- Kozian, D.H., and Augustin, H.G.** (1997). Transcriptional regulation of the Ras-related protein TC21/R-Ras2 in endothelial cells. *FEBS Lett* 414, 239-242.
- Krangel, M.S.** (1987). Endocytosis and recycling of the T3-T cell receptor complex. The role of T3 phosphorylation. *J Exp Med* 165, 1141-1159.
- Krogsgaard, M., Li, Q.J., Sumen, C., Huppa, J.B., Huse, M., and Davis, M.M.** (2005). Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature* 434, 238-243. Epub 2005 Feb 2020.
- 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.
- Kuster, H., Thompson, H., and Kinet, J.P.** (1990). Characterization and expression of the gene for the human Fc receptor gamma subunit. Definition of a new gene family. *J Biol Chem* 265, 6448-6452.
- Kwong, L., Wozniak, M.A., Collins, A.S., Wilson, S.D., and Keely, P.J.** (2003). R-Ras promotes focal adhesion formation through focal adhesion kinase and p130(Cas) by a novel mechanism that differs from integrins. *Mol Cell Biol* 23, 933-949.
- Lamaze, C., Dujeancourt, A., Baba, T., Lo, C.G., Benmerah, A., and Dautry-Varsat, A.** (2001). Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* 7, 661-671.
- Larsen, E.C., DiGennaro, J.A., Saito, N., Mehta, S., Loegering, D.J., Mazurkiewicz, J.E., and Lennartz, M.R.** (2000). Differential requirement for classic and novel PKC isoforms in respiratory burst and phagocytosis in RAW 264.7 cells. *J Immunol* 165, 2809-2817.
- Lauritsen, J.P., Christensen, M.D., Dietrich, J., Kastrup, J., Odum, N., and Geisler, C.** (1998). Two distinct pathways exist for down-regulation of the TCR. *J Im-*

*munol* 161, 260-267.

- 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.
- Lee, K.H., Dinner, A.R., Tu, C., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T.N., Burack, W.R., Wu, H., Wang, J., et al.** (2003). The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* 302, 1218-1222. Epub 2003 Sep 1225.
- Lee, K.H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Chan, A.C., Allen, P.M., and Shaw, A.S.** (2002). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295, 1539-1542.
- Legendre, V., Guimezanes, A., Buferne, M., Barad, M., Schmitt-Verhulst, A.M., and Boyer, C.** (1999). Antigen-induced TCR-CD3 down-modulation does not require CD3delta or CD3gamma cytoplasmic domains, necessary in response to anti-CD3 antibody. *Int Immunol* 11, 1731-1738.
- Leiva, N., Pavarotti, M., Colombo, M.I., and Damiani, M.T.** (2006). Reconstitution of recycling from the phagosomal compartment in streptolysin O-permeabilized macrophages: role of Rab11. *Exp Cell Res* 312, 1843-1855.
- LeMaoult, J., Caumartin, J., and Carosella, E.D.** (2007a). Exchanges of Membrane Patches (Trogocytosis) Split Theoretical and Actual Functions of Immune Cells. *Human Immunology* 68, 240-243.
- LeMaoult, J., Caumartin, J., Daouya, M., Favier, B., Le Rond, S., Gonzalez, A., and Carosella, E.D.** (2007b). Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. *Blood* 109, 2040-2048.
- Lerm, M., Brodin, V.P., Ruishalme, I., Stendahl, O., and Sarndahl, E.** (2007). Inactivation of Cdc42 Is Necessary for Depolymerization of Phagosomal F-Actin and Subsequent Phagosomal Maturation. *J Immunol* 178, 7357-7365.
- Levchenko, A., Mehta, B.M., Niu, X., Kang, G., Villafania, L., Way, D., Polycarpe, D., Sadelain, M., and Larson, S.M.** (2005). Intercellular transfer of P-glycoprotein mediates acquired multidrug resistance in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1933-1938.
- Li, B., Yu, H., Zheng, W., Voll, R., Na, S., Roberts, A.W., Williams, D.A., Davis, R.J., Ghosh, S., and Flavell, R.A.** (2000). Role of the guanosine triphosphatase Rac2 in T helper 1 cell differentiation. *Science* 288, 2219-2222.
- Lin, J., Hou, K.K., Piwnicka-Worms, H., and Shaw, A.S.** (2009). The polarity protein Par1b/EMK/MARK2 regulates T cell receptor-induced microtubule-organizing center polarization. *J Immunol* 183, 1215-1221.
- Lindmo, K., and Stenmark, H.** (2006). Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci* 119, 605-614.
- Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y.H., Cook, R.F., and Sargiacomo, M.** (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 126, 111-126.

- Liu, H., Rhodes, M., Wiest, D.L., and Vignali, D.A. (2000). On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* 13, 665-675.
- Liu, T., Li, R., Pan, T., Liu, D., Petersen, R.B., Wong, B.-S., Gambetti, P., and Sy, M.S.** (2002). Intercellular Transfer of the Cellular Prion Protein. *Journal of Biological Chemistry* 277, 47671-47678.
- Liu, X., Wang, H., Eberstadt, M., Schnuchel, A., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Schkeryantz, J.M., Janowick, D.A., Harlan, J.E., Harris, E.A., et al.** (1998). NMR structure and mutagenesis of the N-terminal Dbl homology domain of the nucleotide exchange factor Trio. *Cell* 95, 269-277.
- Longva, K.E., Blystad, F.D., Stang, E., Larsen, A.M., Johannessen, L.E., and Madshus, I.H.** (2002). Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J Cell Biol* 156, 843-854.
- Lopez-Barahona, M., Bustelo, X.R., and Barbacid, M.** (1996). The TC21 oncoprotein interacts with the Ral guanosine nucleotide dissociation factor. *Oncogene* 12, 463-470.
- Lorber, M.I., Loken, M.R., Stall, A.M., and Fitch, F.W.** (1982). I-A antigens on cloned alloreactive murine T lymphocytes are acquired passively. *J Immunol* 128, 2798-2803.
- Lowin-Kropf, B., Shapiro, V.S., and Weiss, A.** (1998). Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J Cell Biol* 140, 861-871.
- Luo, L., Jan, L.Y., and Jan, Y.N.** (1997). Rho family GTP-binding proteins in growth cone signalling. *Curr Opin Neurobiol* 7, 81-86.
- Machlenkin, A., Uzana, R., Frankenburg, S., Eisenberg, G., Eisenbach, L., Pitcovski, J., Gorodetsky, R., Nissan, A., Peretz, T., and Lotem, M.** (2008). Capture of tumor cell membranes by trogocytosis facilitates detection and isolation of tumor-specific functional CTLs. *Cancer Res* 68, 2006-2013.
- Mack, M., Kleinschmidt, A., Bruhl, H., Klier, C., Nelson, P.J., Cihak, J., Plachy, J., Stangassinger, M., Erfle, V., and Schlondorff, D.** (2000). Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med* 6, 769-775.
- Majeed, M., Cavegion, E., Lowell, C.A., and Berton, G.** (2001). Role of Src kinases and Syk in Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion. *J Leukoc Biol* 70, 801-811.
- Majeti, R., Bilwes, A.M., Noel, J.P., Hunter, T., and Weiss, A.** (1998). Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. *Science* 279, 88-91.
- Marshall, J.G., Booth, J.W., Stambolic, V., Mak, T., Balla, T., Schreiber, A.D., Meyer, T., and Grinstein, S.** (2001). Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis. *J Cell Biol* 153, 1369-1380.

- Martinez-Martin, N., Risueno, R.M., Morreale, A., Zaldivar, I., Fernandez-Arenas, E., Herranz, F., Ortiz, A.R., and Alarcon, B.** (2009). Cooperativity between T cell receptor complexes revealed by conformational mutants of CD3epsilon. *Sci Signal* 2, ra43.
- May, R.C., and Machesky, L.M.** (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 114, 1061-1077.
- May, V., Schiller, M.R., Eipper, B.A., and Mains, R.E.** (2002). Kalirin Dbl-homology guanine nucleotide exchange factor 1 domain initiates new axon outgrowths via RhoG-mediated mechanisms. *J Neurosci* 22, 6980-6990.
- Mayor, S., and Pagano, R.E.** (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 603-612.
- McCann, F.E., Eissmann, P., Onfelt, B., Leung, R., and Davis, D.M.** (2007). The activating NKG2D ligand MHC class I-related chain A transfers from target cells to NK cells in a manner that allows functional consequences. *J Immunol* 178, 3418-3426.
- McTaggart, S.J.** (2006). Isoprenylated proteins. *Cell Mol Life Sci* 63, 255-267.
- Meller, J., Vidali, L., and Schwartz, M.A.** (2008). Endogenous RhoG is dispensable for integrin-mediated cell spreading but contributes to Rac-independent migration. *J Cell Sci* 121, 1981-1989.
- Mellman, I.** (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 575-625.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and von Andrian, U.H.** (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154-159.
- Menne, C., Moller Sorensen, T., Siersma, V., von Essen, M., Odum, N., and Geisler, C.** (2002). Endo- and exocytic rate constants for spontaneous and protein kinase C-activated T cell receptor cycling. *Eur J Immunol* 32, 616-626.
- Mercanti, V., Charette, S.J., Bennett, N., Ryckewaert, J.-J., Letourneur, F., and Cosson, P.** (2006). Selective membrane exclusion in phagocytic and macropinocytic cups. *J Cell Sci* 119, 4079-4087.
- Minami, Y., Samelson, L.E., and Klausner, R.D.** (1987). Internalization and cycling of the T cell antigen receptor. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 262, 13342-13347.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A., and Karin, M.** (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 81, 1147-1157.
- Monjas, A., Alcover, A., and Alarcon, B.** (2004). Engaged and bystander T cell receptors are down-modulated by different endocytotic pathways. *J Biol Chem* 279, 55376-55384. Epub 2004 Oct 55328.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A.** (1998a). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
- 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.
- Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Ka-**

- sai, R.S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J., and Kusumi, A.** (2006). Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J Cell Biol* 174, 851-862.
- Mossman, K.D., Campi, G., Groves, J.T., and Dustin, M.L.** (2005). Altered TCR signaling from geometrically repatterned immunological synapses. *Science* 310, 1191-1193.
- Mostbock, S., Catalfamo, M., Tagaya, Y., Schlom, J., and Sabzevari, H.** (2007). Acquisition of antigen presentosome (APS), an MHC/costimulatory complex, is a checkpoint of memory T-cell homeostasis. *Blood* 109, 2488-2495.
- Movilla, N., Crespo, P., and Bustelo, X.R.** (1999). Signal transduction elements of TC21, an oncogenic member of the R-Ras subfamily of GTP-binding proteins. *Oncogene* 18, 5860-5869.
- Murga, C., Zohar, M., Teramoto, H., and Gutkind, J.S.** (2002). Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF-kappaB. *Oncogene* 21, 207-216.
- Murk, J.L., Humbel, B.M., Ziese, U., Griffith, J.M., Posthuma, G., Slot, J.W., Koster, A.J., Verkleij, A.J., Geuze, H.J., and Kleijmeer, M.J.** (2003). Endosomal compartmentalization in three dimensions: implications for membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13332-13337.
- Murk, J.L., Stoorvogel, W., Kleijmeer, M.J., and Geuze, H.J.** (2002). The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation. *Semin Cell Dev Biol* 13, 303-311.
- Murphy, G.A., Graham, S.M., Morita, S., Reks, S.E., Rogers-Graham, K., Vojtek, A., Kelley, G.G., and Der, C.J.** (2002). Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase, but not RalGDS, in TC21/R-Ras2-mediated transformation. *J Biol Chem* 277, 9966-9975. Epub 2002 Jan 9911.
- Myromslien, F.y.D., Gr̄vdal, L.M., Raiborg, C., Stenmark, H., Madshus, I.H., and Stang, E.** (2006). Both clathrin-positive and -negative coats are involved in endosomal sorting of the EGF receptor. *Experimental Cell Research* 312, 3036-3048.
- Na, S., Li, B., Grewal, I.S., Enslen, H., Davis, R.J., Hanke, J.H., and Flavell, R.A.** (1999). Expression of activated CDC42 induces T cell apoptosis in thymus and peripheral lymph organs via different pathways. *Oncogene* 18, 7966-7974.
- Nakaya, M., Tanaka, M., Okabe, Y., Hanayama, R., and Nagata, S.** (2006). Opposite effects of rho family GTPases on engulfment of apoptotic cells by macrophages. *J Biol Chem* 281, 8836-8842.
- Nath, D., Williamson, N.J., Jarvis, R., and Murphy, G.** (2001). Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase. *J Cell Sci* 114, 1213-1220.
- Negulescu, P.A., Krasieva, T.B., Khan, A., Kerschbaum, H.H., and Cahalan, M.D.** (1996). Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity* 4, 421-430.
- Nel, A.E.** (2002). T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: Signaling compo-

nents, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109, 758-770.

**Nichols, B.J., and Lippincott-Schwartz, J.** (2001). Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 11, 406-412.

**Niedergang, F., and Chavrier, P.** (2004). Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagosome. *Curr Opin Cell Biol* 16, 422-428.

**Niedergang, F., and Chavrier, P.** (2005). Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Curr Top Microbiol Immunol* 291, 43-60.

**Niedergang, F., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A.** (1997). Peptide antigen or superantigen-induced down-regulation of TCRs involves both stimulated and unstimulated receptors. *J Immunol* 159, 1703-1710.

**Niedergang, F., San Jose, E., Rubin, B., Alarcon, B., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A.** (1997b). Differential cytosolic tail dependence and intracellular fate of T-cell receptors internalized upon activation with superantigen or phorbol ester. *Res Immunol* 148, 231-245.

**Nijhara, R., van Hennik, P.B., Gignac, M.L., Kruhlak, M.J., Hordijk, P.L., Delon, J., and Shaw, S.** (2004). Rac1 mediates collapse of microvilli on chemokine-activated T lymphocytes. *J Immunol* 173, 4985-4993.

**Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V.** (2006). Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity* 24, 19-28.

**Nobes, C., and Marsh, M.** (2000). Dendritic cells: New roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake? *Current Biology* 10, R739-R741.

**Nobes, C.D., and Hall, A.** (1995a). Rho, rac

and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans* 23, 456-459.

**Nobes, C.D., and Hall, A.** (1995b). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.

**Nobes, C.D., and Hall, A.** (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 144, 1235-1244.

**Nolte't Hoen, E.N., Wagenaar-Hilbers, J.P., Peters, P.J., Gadella, B.M., van Eden, W., and Wauben, M.H.** (2004). Uptake of membrane molecules from T cells endows antigen-presenting cells with novel functional properties. *Eur J Immunol* 34, 3115-3125.

**Nolz, J.C., Gomez, T.S., Zhu, P., Li, S., Medeiros, R.B., Shimizu, Y., Burkhardt, J.K., Freedman, B.D., and Billadeau, D.D.** (2006). The WAVE2 Complex Regulates Actin Cytoskeletal Reorganization and CRAC-Mediated Calcium Entry during T Cell Activation. *Current biology : CB* 16, 24-34.

**Ohba, Y., Mochizuki, N., Yamashita, S., Chan, A.M., Schrader, J.W., Hattori, S., Nagashima, K., and Matsuda, M.** (2000). Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem* 275, 20020-20026.

**Olson, M.F., Ashworth, A., and Hall, A.** (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 269, 1270-1272.

**Onfelt, B., Nedvetzki, S., Benninger, R.K.,**

- Purbhoo, M.A., Sowinski, S., Hume, A.N., Seabra, M.C., Neil, M.A., French, P.M., and Davis, D.M.** (2006). Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol* 177, 8476-8483.
- Onfelt, B., Nedvetzki, S., Yanagi, K., and Davis, D.M.** (2004). Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol* 173, 1511-1513.
- Parri, M., and Chiarugi, P.** (2010). Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Communication and Signaling* 8, 23.
- Patel, D.M., and Mannie, M.D.** (2001). Intercellular exchange of class II major histocompatibility complex/peptide complexes is a conserved process that requires activation of T cells but is constitutive in other types of antigen presenting cell. *Cell Immunol* 214, 165-172.
- Pelkmans, L., and Helenius, A.** (2002). Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3, 311-320.
- Pernis, A.B.** (2009). Rho GTPase-mediated pathways in mature CD4+ T cells. *Autoimmunity Reviews* 8, 199-203.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Perez, I., Bravo, R., and Lacal, J.C.** (1997). Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* 11, 463-475.
- Peter, M.E., Wileman, T., and Terhorst, C.** (1993). Covalent binding of guanine nucleotides to the CD3-gamma chain of the T cell receptor/CD3 complex. *Eur J Immunol* 23, 461-466.
- Peters, C., Baars, T.L., Buhler, S., and Mayer, A.** (2004). Mutual control of membrane fission and fusion proteins. *Cell* 119, 667-678.
- Piper, R.C., and Luzio, J.P.** (2001). Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic* 2, 612-621.
- Pozzi, A., Coffa, S., Bulus, N., Zhu, W., Chen, D., Chen, X., Mernaugh, G., Su, Y., Cai, S., Singh, A., et al.** (2006). H-Ras, R-Ras, and TC21 differentially regulate ureteric bud cell branching morphogenesis. *Mol Biol Cell* 17, 2046-2056.
- Praefcke, G.J., and McMahon, H.T.** (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 133-147.
- Prieto-Sanchez, R.M., and Bustelo, X.R.** (2003). Structural basis for the signaling specificity of RhoG and Rac1 GTPases. *J Biol Chem* 278, 37916-37925.
- Prieto-Sanchez, R.M., Berenjano, I.M., and Bustelo, X.R.** (2006). Involvement of the Rho/Rac family member RhoG in caveolar endocytosis. *Oncogene* 25, 2961-2973.
- Pulecio, J., Petrovic, J., Prete, F., Chiaruttini, G., Lennon-Dumenil, A.M., Desdouets, C., Gasman, S., Burrone, O.R., and Benvenuti, F.** Cdc42-mediated MTOC polarization in dendritic cells controls targeted delivery of cytokines at the immune synapse. *J Exp Med* 207, 2719-2732.
- Purbhoo, M.A., Irvine, D.J., Huppa, J.B., and Davis, M.M.** (2004). T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat Immunol* 5, 524-530. Epub 2004 Mar 2028.
- Purtic, B., Pitcher, L.A., van Oers, N.S., and Wulfig, C.** (2005). T cell receptor (TCR) clustering in the immunological sy-

napse integrates TCR and costimulatory signaling in selected T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2904-2909.

**Quah, B.J., Barlow, V.P., McPhun, V., Matthaei, K.I., Hulett, M.D., and Parish, C.R.** (2008). Bystander B cells rapidly acquire antigen receptors from activated B cells by membrane transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4259-4264.

**Quilliam, L.A., Castro, A.F., Rogers-Graham, K.S., Martin, C.B., Der, C.J., and Bi, C.** (1999). M-Ras/R-Ras3, a transforming ras protein regulated by Sos1, GRF1, and p120 Ras GTPase-activating protein, interacts with the putative Ras effector AF6. *J Biol Chem* 274, 23850-23857.

**Quilliam, L.A., Rebhun, J.F., and Castro, A.F.** (2002). A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 71, 391-444.

**Rabinovitch, M.** (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* 5, 85-87.

**Raiborg, C., and Stenmark, H.** (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458, 445-452.

**Ramaswamy, M., Dumont, C., Cruz, A.C., Muppidi, J.R., Gomez, T.S., Billadeau, D.D., Tybulewicz, V.L., and Siegel, R.M.** (2007). Cutting edge: Rac GTPases sensitize activated T cells to die via Fas. *J Immunol* 179, 6384-6388.

**Rameh, L.E., Arvidsson, A., Carraway, K.L., 3rd, Couvillon, A.D., Rathbun, G., Crompton, A., VanRenterghem, B., Czech, M.P., Ravichandran, K.S., Bu-**

**rakoff, S.J., et al.** (1997). A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* 272, 22059-22066.

**Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J.** (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183, 1161-1172.

**Razi, M., and Futter, C.E.** (2006). Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation. *Mol Biol Cell* 17, 3469-3483.

**Rechavi, O., Goldstein, I., Vernitsky, H., Rotblat, B., and Kloog, Y.** (2007). Inter-cellular transfer of oncogenic H-Ras at the immunological synapse. *PLoS One* 2, e1204.

**Reggiori, F., and Pelham, H.R.** (2001). Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO J* 20, 5176-5186.

**Reuther, G.W., and Der, C.J.** (2000). The Ras branch of small Gtpases: Ras family members don't fall far from the tree. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 157-165.

**Rey, I., Taylor-Harris, P., van Erp, H., and Hall, A.** (1994). R-ras interacts with ras-GAP, neurofibromin and c-raf but does not regulate cell growth or differentiation. *Oncogene* 9, 685-692.

**Ridley, A.J., and Hall, A.** (1992a). Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 57, 661-671.

**Ridley, A.J., and Hall, A.** (1992b). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress

fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.

**Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A.** (1992).

The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.

**Rodal, S.K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B., and Sandvig, K.** (1999).

Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10, 961-974.

**Roda-Navarro, P., and Reyburn, H.T.** (2007).

Intercellular protein transfer at the NK cell immune synapse: mechanisms and physiological significance. *Faseb J* 21, 1636-1646. Epub 2007 Feb 1621.

**Rodionov, D.G., and Bakke, O.** (1998).

Medium chains of adaptor complexes AP-1 and AP-2 recognize leucine-based sorting signals from the invariant chain. *J Biol Chem* 273, 6005-6008.

**Rodriguez-Viciana, P., Sabatier, C., and McCormick, F.** (2004).

Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol Cell Biol* 24, 4943-4954.

**Rosario, M., Paterson, H.F., and Marshall, C.J.** (1999).

Activation of the Raf/MAP kinase cascade by the Ras-related protein TC21 is required for the TC21-mediated transformation of NIH 3T3 cells. *Embo J* 18, 1270-1279.

**Rosario, M., Paterson, H.F., and Marshall, C.J.** (2001).

Activation of the Ral and phosphatidylinositol 3' kinase signaling pathways by the ras-related protein TC21. *Mol*

*Cell Biol* 21, 3750-3762.

**Rossmann, K.L., Der, C.J., and Sondek, J.** (2005).

GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 167-180.

**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.

**Rueda, D., Gaide, O., Ho, L., Lewkowicz, E., Niedergang, F., Hailfinger, S., Rebeaud, F., Guzzardi, M., Conne, B., Thelen, M., et al.** (2007).

Bcl10 controls TCR- and Fc-gammaR-induced actin polymerization. *J Immunol* 178, 4373-4384.

**Russo, V., Zhou, D., Sartirana, C., Rovere, P., Villa, A., Rossini, S., Traversari, C., and Bordignon, C.** (2000).

Acquisition of intact allogeneic human leukocyte antigen molecules by human dendritic cells. *Blood* 95, 3473-3477.

**Sachse, M., Urbe, S., Oorschot, V., Strous, G.J., and Klumperman, J.** (2002).

Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol Biol Cell* 13, 1313-1328.

**Sadra, A., Cinek, T., and Imboden, J.B.** (2004).

Translocation of CD28 to lipid rafts and costimulation of IL-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 11422-11427.

**Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A.** (1995).

Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182,

389-400.

- Samson, T., Welch, C., Monaghan-Benson, E., Hahn, K.M., and Burridge, K.** (2010). Endogenous RhoG is rapidly activated after epidermal growth factor stimulation through multiple guanine-nucleotide exchange factors. *Mol Biol Cell* 21, 1629-1642.
- San Jose, E., Borroto, A., Niedergang, F., Alcover, A., and Alarcon, B.** (2000). Triggering the TCR complex causes the down-regulation of nonengaged receptors by a signal transduction-dependent mechanism. *Immunity* 12, 161-170.
- Sandvig, K., Torgersen, M.L., Raa, H.A., and van Deurs, B.** (2008). Clathrin-independent endocytosis: from nonexisting to an extreme degree of complexity. *Histochem Cell Biol* 129, 267-276.
- Sasahara, Y., Rachid, R., Byrne, M.J., de la Fuente, M.A., Abraham, R.T., Ramesh, N., and Geha, R.S.** (2002). Mechanism of Recruitment of WASP to the Immunological Synapse and of Its Activation Following TCR Ligation. *Molecular Cell* 10, 1269-1281.
- Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T., and Colombo, M.I.** (2005). Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* 6, 131-143.
- Savina, A., Vidal, M., and Colombo, M.I.** (2002). The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci* 115, 2505-2515.
- Schamel, W.W., Arechaga, I., Risueno, R.M., van Santen, H.M., Cabezas, P., Risco, C., Valpuesta, J.M., and Alarcon, B.** (2005). Coexistence of multivalent and monovalent TCRs explains high sensitivity

and wide range of response. *J Exp Med* 202, 493-503. Epub 2005 Aug 2008.

- Scheele, J.S., Marks, R.E., and Boss, G.R.** (2007). Signaling by small GTPases in the immune system. *Immunological Reviews* 218, 92-101.
- Seminario, M.C., and Bunnell, S.C.** (2008). Signal initiation in T-cell receptor microclusters. *Immunological Reviews* 221, 90-106.
- Settleman, J.** (2001). Rac 'n Rho: The Music that Shapes a Developing Embryo. *Developmental Cell* 1, 321-331.
- Sharma, R., Sud, N., Chattopadhyay, T.K., and Ralhan, R.** (2005). TC21/R-Ras2 up-regulation in esophageal tumorigenesis: potential diagnostic implications. *Oncology* 69, 10-18. Epub 2005 Jul 2008.
- Sharrow, S.O., Mathieson, B.J., and Singer, A.** (1981). Cell surface appearance of unexpected host MHC determinants on thymocytes from radiation bone marrow chimeras. *J Immunol* 126, 1327-1335.
- Sharrow, S.O., Ozato, K., and Sachs, D.H.** (1980). Phenotypic expression of I-A and I-E/C subregion determinants on murine thymocytes. *J Immunol* 125, 2263-2268.
- Shaw, A.S.** (2006). Lipid rafts: now you see them, now you don't. *Nat Immunol* 7, 1139-1142.
- Shi, M., Dennis, K., Peschon, J.J., Chandrasekaran, R., and Mikecz, K.** (2001). Antibody-induced shedding of CD44 from adherent cells is linked to the assembly of the cytoskeleton. *J Immunol* 167, 123-131.
- Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspéro, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P.P., and Polo, S.** (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated

- cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2760-2765.
- Singleton, K., Parvaze, N., Dama, K.R., Chen, K.S., Jennings, P., Purtic, B., Sjaastad, M.D., Gilpin, C., Davis, M.M., and Wulfing, C.** (2006). A large T cell invagination with CD2 enrichment resets receptor engagement in the immunological synapse. *J Immunol* 177, 4402-4413.
- Sjostrom, A., Eriksson, M., Cerboni, C., Johansson, M.H., Sentman, C.L., Karre, K., and Hoglund, P.** (2001). Acquisition of external major histocompatibility complex class I molecules by natural killer cells expressing inhibitory Ly49 receptors. *J Exp Med* 194, 1519-1530.
- Skowronek, K.R., Guo, F., Zheng, Y., and Nassar, N.** (2004). The C-terminal basic tail of RhoG assists the guanine nucleotide exchange factor trio in binding to phospholipids. *J Biol Chem* 279, 37895-37907.
- Spees, J.L., Olson, S.D., Whitney, M.J., and Prockop, D.J.** (2006). Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1283-1288.
- Sprent, J.** (2005). Swapping molecules during cell-cell interactions. *Sci STKE* 2005, pe8.
- 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.
- 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.
- Stoorvogel, W., Kleijmeer, M.J., Geuze, H.J., and Raposo, G.** (2002). The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* 3, 321-330.
- Stowers, L., Yelon, D., Berg, L.J., and Chant, J.** (1995). Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5027-5031.
- Strzelecka, A., Kwiatkowska, K., and Sobota, A.** (1997). Tyrosine phosphorylation and Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis. *FEBS Lett* 400, 11-14.
- Sun, Z., Arendt, C.W., Ellmeier, W., Schaefer, E.M., Sunshine, M.J., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P.L., et al.** (2000). PKC- $\theta$  is required for TCR-induced NK-kap $\alpha$  activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404, 402 - 407.
- Suzuki, J., Kaziro, Y., and Koide, H.** (1997). An activated mutant of R-Ras inhibits cell death caused by cytokine deprivation in BaF3 cells in the presence of IGF-I. *Oncogene* 15, 1689-1697.
- Swan, K.A., Alberola-Ila, J., Gross, J.A., Appleby, M.W., Forbush, K.A., Thomas, J.F., and Perlmutter, R.M.** (1995). Involvement of p21ras distinguishes positive and negative selection in thymocytes. *EMBO J* 14, 276-285.
- Swanson, J.A.** (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 639-649. Epub 2008 Jul 2009.
- Szczur, K., Xu, H., Atkinson, S., Zheng, Y., and Filippi, M.-D.** (2006). Rho GTPase CDC42 regulates directionality and random movement via distinct MAPK pathways in

neutrophils. *Blood* 108, 4205-4213.

**Tabiasco, J., Vercellone, A., Meggetto, F., Hudrisier, D., Brousset, P., and Fournie, J.J.** (2003). Acquisition of viral receptor by NK cells through immunological synapse. *J Immunol* 170, 5993-5998.

**Takai, Y., Sasaki, T., and Matozaki, T.** (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81, 153-208.

**Tanaka, M., Gupta, R., and Mayer, B.J.** (1995). Differential inhibition of signaling pathways by dominant-negative SH2/SH3 adapter proteins. *Mol Cell Biol* 15, 6829-6837.

**Tanaka, S., Morishita, T., Hashimoto, Y., Hattori, S., Nakamura, S., Shibuya, M., Matuoka, K., Takenawa, T., Kurata, T., Nagashima, K., et al.** (1994). C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3443-3447.

**Tatari-Calderone, Z., Semnani, R.T., Nutman, T.B., Schlom, J., and Sabzevari, H.** (2002). Acquisition of CD80 by human T cells at early stages of activation: functional involvement of CD80 acquisition in T cell to T cell interaction. *J Immunol* 169, 6162-6169.

**Tavano, R., Contento, R.L., Baranda, S.J., Soligo, M., Tuosto, L., Manes, S., and Viola, A.** (2006). CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nat Cell Biol* 8, 1270-1276.

**Tavano, R., Gri, G., Molon, B., Marinari, B., Rudd, C.E., Tuosto, L., and Viola, A.** (2004). CD28 and Lipid Rafts Coordinate

Recruitment of Lck to the Immunological Synapse of Human T Lymphocytes. *J Immunol* 173, 5392-5397.

**Tcherkezian, J., and Lamarche-Vane, N.** (2007). Current knowledge of the large Rho-GAP family of proteins. *Biol Cell* 99, 67-86.

**Tenklooster, J.P., and Hordijk, P.L.** (2007). Targeting and localized signalling by small GTPases. *Biology of the Cell* 99, 1-12.

**Tosello-Tramont, A.C., Kinchen, J.M., Brugnera, E., Haney, L.B., Hengartner, M.O., and Ravichandran, K.S.** (2007). Identification of two signaling submodules within the CrkII/ELMO/Dock180 pathway regulating engulfment of apoptotic cells. *Cell Death Differ* 14, 963-972.

**Trautmann, A., and Valitutti, S.** (2003). The diversity of immunological synapses. *Current Opinion in Immunology* 15, 249-254.

**Tsang, J.Y., Chai, J.G., and Lechler, R.** (2003). Antigen presentation by mouse CD4+ T cells involving acquired MHC class II:peptide complexes: another mechanism to limit clonal expansion? *Blood* 101, 2704-2710. Epub 2002 Nov 2714.

**Tse, D.B., Al-Haideri, M., Pernis, B., Cantor, C.R., and Wang, C.Y.** (1986). Intracellular accumulation of T-cell receptor complex molecules in a human T-cell line. *Science* 234, 748-751.

**Tskvitaria-Fuller, I., Rozelle, A.L., Yin, H.L., and Wulfing, C.** (2003). Regulation of Sustained Actin Dynamics by the TCR and Costimulation as a Mechanism of Receptor Localization. *J Immunol* 171, 2287-2295.

**Tskvitaria-Fuller, I., Seth, A., Mistry, N., Gu, H., Rosen, M.K., and Wulfing, C.**

- (2006). Specific patterns of Cdc42 activity are related to distinct elements of T cell polarization. *J Immunol* 177, 1708-1720.
- Turner, M., Schweighoffer, E., Colucci, F., Di Santo, J.P., and Tybulewicz, V.L.** (2000). Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling. *Immunol Today* 21, 148-154.
- Tybulewicz, V.L.J., and Henderson, R.B.** (2009). Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 9, 630-644.
- Umeshappa, C.S., Huang, H., Xie, Y., Wei, Y., Mulligan, S.J., Deng, Y., and Xiang, J.** (2009). CD4<sup>+</sup> Th-APC with acquired peptide/MHC class I and II complexes stimulate type 1 helper CD4<sup>+</sup> and central memory CD8<sup>+</sup> T cell responses. *J Immunol* 182, 193-206.
- Urbe, S., Huber, L.A., Zerial, M., Tooze, S.A., and Parton, R.G.** (1993). Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells. *FEBS Lett* 334, 175-182.
- Utzny, C., Coombs, D., Muller, S., and Valitutti, S.** (2006). Analysis of peptide/MHC-induced TCR downregulation: deciphering the triggering kinetics. *Cell Biochem Biophys* 46, 101-111.
- Valitutti, S., Muller, S., Dessing, M., and Lanzavecchia, A.** (1996). Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J Exp Med* 183, 1917-1921.
- Valitutti, S., Muller, S., Salio, M., and Lanzavecchia, A.** (1997). Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med* 185, 1859-1864.
- Van Aelst, L., and Symons, M.** (2002). Role of Rho family GTPases in epithelial morphogenesis. *Genes Dev* 16, 1032-1054.
- van Buul, J.D., Allingham, M.J., Samson, T., Meller, J., Boulter, E., Garcia-Mata, R., and Burridge, K.** (2007). RhoG regulates endothelial apical cup assembly downstream from ICAM1 engagement and is involved in leukocyte trans-endothelial migration. *J Cell Biol* 178, 1279-1293.
- van der Merwe, P.A., Dunne, P.D., Klenerman, D., and Davis, S.J.** (2010). Taking T cells beyond the diffraction limit. *Nat Immunol* 11, 51-52.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., and Bilanges, B.** The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 329-341.
- Vanherberghen, B., Andersson, K., Carlén, L.M., Nolte-'t Hoen, E.N., Williams, G.S., Hoglund, P., and Davis, D.M.** (2004). Human and murine inhibitory natural killer cell receptors transfer from natural killer cells to target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16873-16878.
- Vardhana, S., Choudhuri, K., Varma, R., and Dustin, M.L.** (2010). Essential role of ubiquitin and TSG101 protein in formation and function of the central supramolecular activation cluster. *Immunity* 32, 531-540.
- Varma, R.** (2008). TCR Triggering by the pMHC Complex: Valency, Affinity, and Dynamics. *Sci Signal* 1, pe21-.
- Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T., and Dustin, M.L.** (2006). T cell receptor-proximal signals are sustained in peri-

pheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* 25, 117-127.

**Vicente-Manzanares, M., and Sanchez-Madrid, F.** (2004). Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* 4, 110-122.

**Vieira, O.V., Botelho, R.J., Rameh, L., Braichmann, S.M., Matsuo, T., Davidson, H.W., Schreiber, A., Backer, J.M., Cantley, L.C., and Grinstein, S.** (2001). Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J Cell Biol* 155, 19-25.

**Vigorito, E.** (2003). RhoG regulates gene expression and the actin cytoskeleton in lymphocytes. *Oncogene* 22, 330-342.

**Vigorito, E., Bell, S., Hebeis, B.J., Reynolds, H., McAdam, S., Emson, P.C., McKenzie, A., and Turner, M.** (2004). Immunological function in mice lacking the Rac-related GTPase RhoG. *Mol Cell Biol* 24, 719-729.

**Villalba, M., Bi, K., Rodriguez, F., Tanaka, Y., Schoenberger, S., and Altman, A.** (2001). Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells. *J Cell Biol* 155, 331-338.

**Villalba, M., Coudronniere, N., Deckert, M., Teixeira, E., Mas, P., and Altman, A.** (2000a). A novel functional interaction between Vav and PKCtheta is required for TCR-induced T cell activation. *Immunity* 12, 151-160.

**Villalonga, P., and Ridley, A.J.** (2006). Rho GTPases and cell cycle control. *Growth Fac-*

*tors* 24, 159-164.

**Viola, A., and Lanzavecchia, A.** (1996). T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds [see comments]. *Science* 273, 104-106.

**Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., and Lanzavecchia, A.** (1999). T Lymphocyte Costimulation Mediated by Reorganization of Membrane Microdomains. *Science* 283, 680-682.

**von Essen, M., Bonefeld, C.M., Siersma, V., Rasmussen, A.B., Lauritsen, J.P., Nielsen, B.L., and Geisler, C.** (2004). Constitutive and ligand-induced TCR degradation. *J Immunol* 173, 384-393.

**von Essen, M., Nielsen, M.W., Bonefeld, C.M., Boding, L., Larsen, J.M., Leitges, M., Baier, G., Odum, N., and Geisler, C.** (2006). Protein kinase C (PKC) alpha and PKC theta are the major PKC isotypes involved in TCR down-regulation. *J Immunol* 176, 7502-7510.

**Wang, H.Y., Altman, Y., Fang, D., Elly, C., Dai, Y., Shao, Y., and Liu, Y.C.** (2001). Cbl promotes ubiquitination of the T cell receptor zeta through an adaptor function of Zap-70. *J Biol Chem* 276, 26004 - 26011.

**Watkins, S.C., and Salter, R.D.** (2005). Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubes. *Immunity* 23, 309-318.

**Weissman, A.M.** (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 169-178.

**Wennerberg, K., and Der, C.J.** (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 117, 1301-1312.

**Wennerberg, K., Ellerbroek, S.M., Liu,**

- R.Y., Karnoub, A.E., Burridge, K., and Der, C.J.** (2002). RhoG signals in parallel with Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem* 277, 47810-47817.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J.** (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118, 843-846.
- Wetzel, S.A., and Parker, D.C.** (2006). MHC transfer from APC to T cells following antigen recognition. *Crit Rev Immunol* 26, 1-21.
- Wiedemann, A., Muller, S., Favier, B., Penna, D., Guiraud, M., Delmas, C., Champagne, E., and Valitutti, S.** (2005). T-cell activation is accompanied by an ubiquitination process occurring at the immunological synapse. *Immunol Lett* 98, 57-61.
- Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B., and Salamero, J.** (2000). Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J Cell Biol* 151, 1207-1220.
- Williams, G.S., Collinson, L.M., Brzostek, J., Eissmann, P., Almeida, C.R., McCann, F.E., Burshtyn, D., and Davis, D.M.** (2007). Membranous structures transfer cell surface proteins across NK cell immune synapses. *Traffic* 8, 1190-1204.
- Williams, R.L., and Urbe, S.** (2007). The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 355-368.
- Wittinghofer, F.** (1998). Ras signalling. Caught in the act of the switch-on. *Nature* 394, 317, 319-320.
- Wojciak-Stothard, B., Williams, L., and Ridley, A.J.** (1999). Monocyte adhesion and spreading on human endothelial cells is dependent on Rho-regulated receptor clustering. *J Cell Biol* 145, 1293-1307.
- Wollert, T., and Hurley, J.H.** (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* 464, 864-869.
- Wright, S.D., and Silverstein, S.C.** (1984). Phagocytosing macrophages exclude proteins from the zones of contact with opsonized targets. *Nature* 309, 359-361.
- Wu, C., Orozco, C., Boyer, J., Leglise, M., Goodale, J., Batalov, S., Hodge, C., Haase, J., Janes, J., Huss, J., et al.** (2009). BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biology* 10, R130.
- Wu, Y.C., Tsai, M.C., Cheng, L.C., Chou, C.J., and Weng, N.Y.** (2001). C. elegans CED-12 acts in the conserved CrkII/Dock180/Rac pathway to control cell migration and cell corpse engulfment. *Dev Cell* 1, 491-502.
- Wülfing, C., and Davis, M.M.** (1998). A Receptor/Cytoskeletal Movement Triggered by Costimulation During T Cell Activation. *Science* 282, 2266-2269.
- Wulfing, C., Sjaastad, M.D., and Davis, M.M.** (1998). Visualizing the dynamics of T cell activation: intracellular adhesion molecule 1 migrates rapidly to the T cell/B cell interface and acts to sustain calcium levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6302-6307.
- Wulfing, C., Sumen, C., Sjaastad, M.D., Wu, L.C., Dustin, M.L., and Davis, M.M.** (2002). Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nat Immunol* 3, 42-47.

- Wulfing, C., Tskvitaria-Fuller, I., Burroughs, N., Sjaastad, M.D., Klem, J., and Schatzle, J.D.** (2002). Interface accumulation of receptor/ligand couples in lymphocyte activation: methods, mechanisms, and significance. *Immunol Rev* 189, 64-83.
- Xia, D., Hao, S., and Xiang, J.** (2006). CD8+ cytotoxic T-APC stimulate central memory CD8+ T cell responses via acquired peptide-MHC class I complexes and CD80 costimulation, and IL-2 secretion. *J Immunol* 177, 2976-2984.
- Xiang, J., Huang, H., and Liu, Y.** (2005). A New Dynamic Model of CD8+ T Effector Cell Responses via CD4+ T Helper-Antigen-Presenting Cells. *J Immunol* 174, 7497-7505.
- Yamamoto, T., Matsui, T., Nakafuku, M., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K.** (1995). A novel GTPase-activating protein for R-Ras. *J Biol Chem* 270, 30557-30561.
- Yamanashi, Y., and Baltimore, D.** (1997). Identification of the Abl- and rasGAP-associated 62 kDa protein as a docking protein, Dok. *Cell* 88, 205-211.
- Yang, J., Huck, S.P., McHugh, R.S., Hermans, I.F., and Ronchese, F.** (2006). Perforin-dependent elimination of dendritic cells regulates the expansion of antigen-specific CD8+ T cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 147-152.
- Yeung, T., and Grinstein, S.** (2007). Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis. *Immunol Rev* 219, 17-36.
- Yokosuka, T., and Saito, T.** (2009). Dynamic regulation of T-cell costimulation through TCR-CD28 microclusters. *Immunological Reviews* 229, 27-40.
- Yokosuka, T., and Saito, T.** (2010). The immunological synapse, TCR microclusters, and T cell activation. *Curr Top Microbiol Immunol* 340, 81-107.
- Yokosuka, T., Kobayashi, W., Sakata-Sogawa, K., Takamatsu, M., Hashimoto-Tane, A., Dustin, M.L., Tokunaga, M., and Saito, T.** (2008). Spatiotemporal Regulation of T Cell Costimulation by TCR-CD28 Microclusters and Protein Kinase C  $\beta$  Translocation. *Immunity* 29, 589-601.
- 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. Epub 2005 Nov 1256.
- Yu, D.T., McCune, J.M., Fu, S.M., Winchester, R.J., and Kunkel, H.G.** (1980). Two types of Ia-positive T cells. Synthesis and exchange of Ia antigens. *J Exp Med* 152, 89s-98s.
- Yu, H., Leitenberg, D., Li, B., and Flavell, R.A.** (2001). Deficiency of small GTPase Rac2 affects T cell activation. *J Exp Med* 194, 915-926.
- Yu, X., Lu, N., and Zhou, Z.** (2008). Phagocytic receptor CED-1 initiates a signaling pathway for degrading engulfed apoptotic cells. *PLoS Biol* 6, e61.
- Yu, X., Odera, S., Chuang, C.H., Lu, N., and Zhou, Z.** (2006). C. elegans Dynamin mediates the signaling of phagocytic receptor CED-1 for the engulfment and degradation of apoptotic cells. *Dev Cell* 10, 743-757.
- Zalcman, G., Closson, V., Camonis, J., Hon-**

- ore, N., Rousseau-Merck, M.F., Tavitian, A., and Olofsson, B.** (1996). RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG. *J Biol Chem* 271, 30366-30374.
- Zhang, Q.J., Li, X.L., Wang, D., Huang, X.C., Mathis, J.M., Duan, W.M., Knight, D., Shi, R., Glass, J., Zhang, D.Q., et al.** (2008). Trogocytosis of MHC-I/peptide complexes derived from tumors and infected cells enhances dendritic cell cross-priming and promotes adaptive T cell responses. *PLoS One* 3, e3097.
- Zhang, Z., Vuori, K., Wang, H., Reed, J.C., and Ruoslahti, E.** (1996). Integrin activation by R-ras. *Cell* 85, 61-69.
- Zhou, J., Tagaya, Y., Tolouei-Semnani, R., Schlom, J., and Sabzevari, H.** (2005). Physiological relevance of antigen presentosome (APS), an acquired MHC/costimulatory complex, in the sustained activation of CD4+ T cells in the absence of APCs. *Blood* 105, 3238-3246.
- Zhou, Z., and Yu, X.** (2008). Phagosome maturation during the removal of apoptotic cells: receptors lead the way. *Trends Cell Biol* 18, 474-485.
- Zhou, Z., Caron, E., Hartwieg, E., Hall, A., and Horvitz, R.** (2001). The C. elegans PH domain protein CED-12 regulates cytoskeletal reorganization via a Rho/Rac GTPase signaling pathway. *Dev Cell* 1, 477-489.
- Zugaza, J.L., Caloca, M.J., and Bustelo, X.R.** (2004). Inverted signaling hierarchy between RAS and RAC in T-lymphocytes. *Oncogene* 23, 5823-5833.



# **Anexos**



## Anexo 1. Videomicroscopía

	PROTEÍNAS DE FUSIÓN Y SONDA						COLOR ASIGNADO VÍDEO		NOTAS
	GFP	DSRED	CFP	YFP	CHERRY	SONDA	ROJO	VERDE	
1			TC21 WT	CD3 WT			TC21	CD3	
2			TC21 DN	CD3 WT			TC21	CD3	
3	CD3 WT	TC21 ONCO					TC21	CD3	
4	RHOG WT				CD3 WT		CD3	RHOG	
5	RHOG WT	TC21 WT					TC21	RHOG	
6	RHOG N17				CD3 WT		CD3	RHOG	
7	RHOG N17	TC21 WT					TC21	RHOG	
8	RHOG Q61L				CD3 WT		CD3	RHOG	
9	RHOG Q61L	TC21 WT					TC21	RHOG	
10	PHR ζCD3							ζCD3	+/+ AND
11	PHR ζCD3							ζCD3	RRas-/- AND
12	PHR ζCD3							ζCD3	RhoG-/- AND
13	TC21 WT	PH-Akt					PH-Akt	TC21	
14	pHR-CD3ζGFP					PKH26	PKH26	ζCD3	+/+ AND
15	pHR-CD3ζGFP					PKH26	PKH26	ζCD3	RRas-/- AND
16	pHR-CD3ζGFP					PKH26	PKH26	ζCD3	RhoG-/- AND
17	pHR-CD3ζGFP							ζCD3	+/+ OT1
18	pHR-CD3ζGFP							ζCD3	RRas-/- OT1
19	pHR-CD3ζGFP							ζCD3	RhoG-/- OT1
20	pHR-CD3ζGFP					PKH26	PKH26	ζCD3	+/+ OT1
21	pHR-CD3ζGFP					PKH26	PKH26	ζCD3	RRas-/- OT1
22	pHR-CD3ζGFP					PKH26	PKH26	ζCD3	RhoG-/- OT1