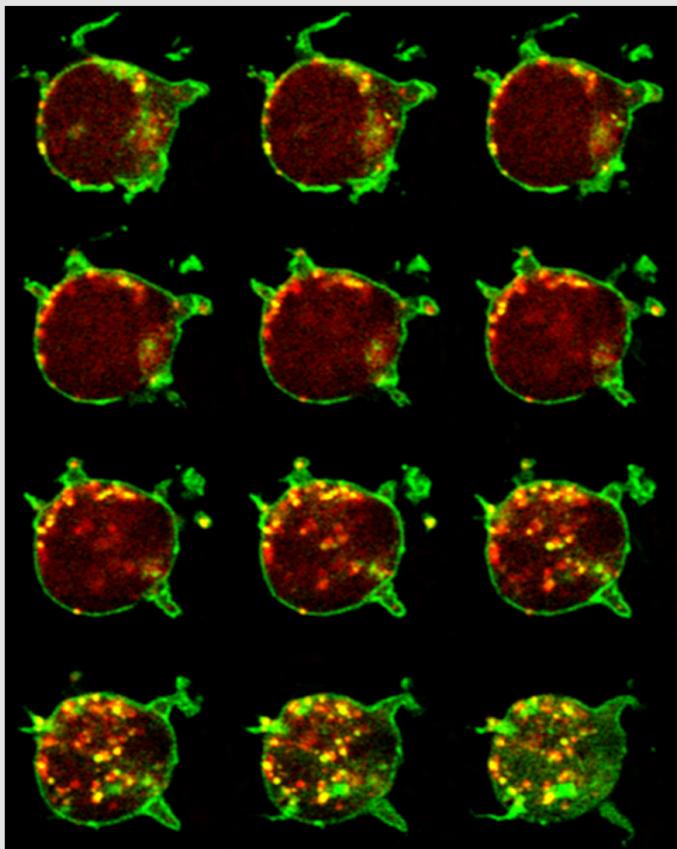


Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular



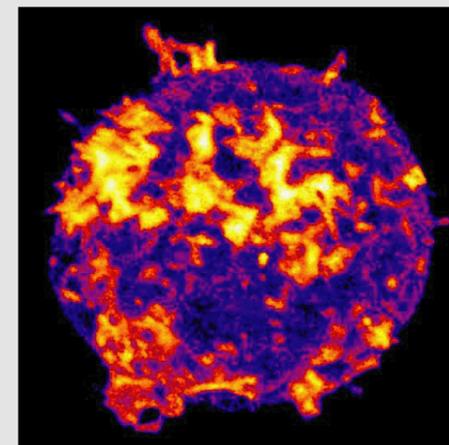
Instituto de Biología y Genética Molecular
Universidad de Valladolid-CSIC



2005

Tesis Doctoral

Regulación de la muerte celular
inducida por activación en linfocitos T.
Papel de la Diacilglicerol Quinasa alfa



Roberto Alonso Gil

2005



Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Tesis Doctoral

**Regulación de la muerte celular
inducida por activación en linfocitos T.
Papel de la Diacilglicerol Quinasa alfa.**

Roberto Alonso Gil

Instituto de Biología y Genética Molecular

Universidad de Valladolid-CSIC



Octubre, 2005

**El trabajo experimental presentado en esta memoria
ha sido realizado en el Instituto de Biología y Genética Molecular
(Universidad de Valladolid-CSIC) y en el Instituto de Investigaciones
Biomédicas “Alberto Sols” (Universidad Autónoma de Madrid-CSIC),
bajo la dirección del Dr. Manuel Izquierdo Pastor.**

Cláusula de Buen Uso:

"Queda absolutamente prohibida la utilización, investigación y desarrollo, de forma directa o indirecta, de cualquiera de las aportaciones científicas propias del autor, que se presentan en esta memoria, por parte de cualquier ejército del mundo o por parte de cualquier grupo armado, para cualquier uso militar y para cualquier otro uso que atente contra los derechos humanos y/o contra el medio ambiente, salvo permiso por escrito de todas las personas del mundo."

Por la Paz: ¡No a la investigación militar!

*A mis padres y a mi hermana,
por estar siempre ahí.*

*A María del Carmen,
Compañera durante estos años,
pero por encima de todo, AMIGA.*

*Sin tí, esta tesis no
hubiese salido adelante,
GRACIAS por TODO.*

Agradecimientos.

Esta es la página de la tesis que más tiempo y “trabajo” me ha llevado, primero por dejarla hasta el último día para que así estuviese todo aquel que de alguna forma me ha ayudado a dar a luz a este “engendro científico”; y segundo porque al ser la parte de las tesis más leídas y comentadas, he intentado hacerlo con esmero y mucho cariño. Vamos por partes que sois much@s y muchas cosas que decir. En primer lugar agradecer al Dr. Manuel Izquierdo, director de esta tesis, por haber acogido en su laboratorio hace ya casi cinco años a un chaval que no sabía mucho de apoptosis y mucho menos de lo que la ciencia significa. Mi más sincero agradecimiento al Dr. Mariano Sánchez Crespo y a la Dra. Carmen Domínguez Lobatón por haberme ofrecido su apoyo personal y profesional durante mi estancia en el Instituto de Biología y Genética Molecular.

A mis padres, mi hermana y a Sergio. Todo empezó hace ya diez años cuando me acompañasteis en mi aventura en el mundo de la Biología. Muchas gracias por todo vuestro apoyo, ayuda, comprensión, cariño y amor. Gracias por ser la mejor familia.

Ahora van unas palabras para la gente con la cual he compartido el laboratorio. En primer lugar, a **MariCarmen**. Necesitaría otra tesis para agradecer todo tu apoyo profesional, pero sobre todo personal. Gracias primero, por ser la mejor compañera de laboratorio (ha sido todo un placer ser tu primer “becario”), gracias otra vez por tener siempre miles de sonrisas y millones de carcajadas en los buenos, y en los malos momentos. *GRACIAS* por ser, además, *AMIGA*, y una amiga de las que se tiene para toda la vida. Y como segundo de abordó, gracias a **Enrique**, contigo hemos compartido los momentos más divertidos y “jachondos” de este laboratorio, ¡¡¡“cuñaaaaaooooo!!! (saludos de Pozi y del eppendorf que siempre andaba por el suelo...). A **Dani**, con el que durante el día lidiamos nuestras primeras batallas en el mundo de *Percoll*, y por las noches lo celebrábamos en compañía de Cano, Jaime y el inseparable Chaoüen. A **Jose** “Pindi”, segundo becario “sufridor” del grupo, mucha suerte en tu nueva etapa. Gracias también a Isabel García, Elena Olea por el apoyo técnico y el tiempo pasado en el laboratorio, y como no, a Eduardo, compañero de citómetro y algo más.

Turno para los agradecimientos más personales a la gente que he conocido durante este tiempo en el IBGM. Primero a mi “otra” **Carmen** (García), gracias por tu apoyo incondicional (profesional, científico y como no, **personal**). Pequeña, pero al mismo tiempo muy grande, y con la que he aprendido muchas cosas de esta vida. Voy a echar de menos nuestras conversaciones sobre tantas cosas. A **Diego y Lola**, por su entusiasmo y alegría a la hora de hacer ciencia. Para ellos y para mis Carmenes, os dejo unas palabras:

“¡¡Qué contagiosos son los apáticos, los indiferentes, que todo lo desprecian, a su lado, qué difícil resulta aferrarse a la experiencia y al entusiasmo!!”

Peter Handke, “Historia do Lapis.

Ahora llega el turno a todos los amiguetes y compis de pasillo y laboratorios. A **Laura (y Nacho)**, gracias por vuestra amistad. No se me olvida que tenemos pendiente unos encierros en Cuellar acompañados de un orujito de naranja... A **Javi**, gran amigo de tantos momentos dentro, y fuera del laboratorio. A las “chicas” del IBGM, **Eduarne, Elena, Cris y Anita**. A Antonio, con el que compartí con salero extremeño, primero laboratorio y después casa. A Pablo, juntos descubrimos las tardes de relax en el Sol después de un día duro de experimentos.

Durante mis estancias cortas y algunas de ellas bien largas en Madrid, hubo mucha gente que me acogió en su casa. A **Patricia Requete, Estela, Pablo e Iñigo** por compartir primero su salón y luego su casa. Pasamos muy buenos momentos de discusiones y risas tontas. A Dela, por dejarme un hueco en su pequeño Palacio de la Puerta del Sol. A **Guanche e Inés**, que vivieron las aventuras finales de esta tesis. Gracias por esas noches tranquilas y a la vez *dobladas* en Santos de la Humosa.

A la *spanish pipol of London*, Xabi, Angélica, Raquel, Nicoloi, Tomas&Olga y Sagra. A toda la gente del laboratorio de Mark Marsh en el LMCB, en especial a Rahel.

Y para el final, MUCHAS GRACIAS a todos los amigos que me han acompañado durante estos años. A Alberto y Yoli, que vivieron mis primeros viajes y momentos en Valladolid. A mis mejores amigos en Valladolid: Javi, Inés, Clari, Juan, Pitu&Davina, Guanche&Inés, Arturo, Dela, Fran&Bea...Gracias por todos los momentos vividos juntos: en casa, en Cantarranas, en Benicassim, de vacaciones, con Chaoüen, en nochevieja, en la fiesta Chill Out, en la Terror Party, en las Moreras, en la parcela, de boda, y como no por todas esas horas en el Viti. Y el último agradecimiento para Robe, Alice y María, que siempre han estado presentes y muchas otras veces, dispersos en el ambiente.

SUMMARY

T cell receptor (TCR) stimulation triggers the generation of several second messengers such as calcium and Diacylglycerol (DAG). DAG may induce Ras activation and subsequent ERK cascade stimulation. Calcium and DAG/Ras pathways control T cell activation, which involves up-regulation of several genes, and activation induced cell death (AICD), which is mediated by up-regulation of pro-apoptotic genes such as Fas Ligand (FasL). Fas ligand mediates both, apoptotic and inflammatory responses in the immune system. FasL function critically depends on the different forms of FasL: soluble Fas Ligand (sFasL) lacking the transmembrane and cytoplasmic domains is a poor mediator of apoptosis, whereas full-length, membrane-associated FasL (mFasL) is pro-apoptotic. It has been shown that mFasL can be released from T lymphocytes via the secretion of mFasL-bearing exosomes. mFasL in exosomes retains its activity in triggering Fas-dependent apoptosis, providing an alternative mechanism of cell death that does not necessarily imply cell-to-cell contact. Diacylglycerol kinase alpha (DGK α), a diacylglycerol (DAG)-consuming enzyme, acts as a negative modulator of the DAG levels generated during T cell activation, and constitutes one of the negative regulators controlling the DAG/Ras pathway which lead to T lymphocyte activation. The evidences showing that DAG/Ras/ERK pathway may act as a divergence point in the signals leading to activation and AICD, prompted us to analyze the role of DGK α on AICD on a T cell line and primary T lymphoblasts. Here we show that overexpression of DGK α decreases FasL-mediated AICD of T lymphocytes, whereas the inhibition of DGK α enhanced AICD. The effect of DGK α on AICD was not due to changes in the transcriptional regulation of FasL gene or changes in the transductional level of FasL protein. Instead, DGK α regulates the release of exosomes bearing FasL. The inhibition of DGK α increases the secretion of lethal exosomes bearing mFas Ligand and subsequent apoptosis. On the contrary, the overactivation of the DGK pathway inhibits exosome secretion and subsequent apoptosis. DGK α was found associated with the trans Golgi Network and late endosomal compartments. Our results show that DGK α effect on apoptosis occurs via the regulation of the release of lethal exosomes by the exocytic pathway, and point out that the spatial orchestration of the different pools of DAG (plasma membrane and Golgi membranes) by DGK is crucial for the control of cell activation, but also for the regulation of the secretion of lethal exosomes, which in turn controls cell death.

Abreviaturas.

7-AAD, 7-Amino-actinomicina D;
Ab, anticuerpo;
mAb, anticuerpo monoclonal;
Act D, actinomicina D;
ADN, ácido desoxirribonucleico;
Ag, antígeno;
ARN, ácido ribonucleico;
ARNm, ARN mensajero.
AICD, *Activation-induced cell death* (muerte celular inducida por activación)
BSA, Albúmina de suero bovino;
Cch, carbamil colina (carbacol);
CD, cluster de diferenciación;
CTL, *cytotoxic T lymphocyte* (linfocito T citotóxico);
Cont, control;
CsA, ciclosporina A;
DAG, diacilglicerol;
DGK α , diacilglicerol quinasa alfa;
DGK $_i$, inhibidor de diacilglicerol quinasa;
DMSO, dimetilsulfoxido;
DOG, 1,2-dioctonoil-*sn*-glicerol;
DTT, ditionitrito;
ERK, *extracellular-signal regulated kinase*;
F(ab), dominio variable de la inmunoglobulina;
Fc, fragmento cristalizante de la inmunoglobulina;
FasL, Fas ligando;
FBS, *fetal bovine serum* (suero fetal bovino);
GFP, *green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente);
h, horas;
HEK, *human embryonic kidney cells*;
HM1R, *Human muscarinic receptor type 1* (receptor muscarínico de tipo 1);
HRP, *horseradish peroxidase* (peroxidasa de rábano);

Ig, inmunoglobulina;
IL, interleuquina;
IP₃, inositol 1,4,5-trifosfato;
JE6.1, Jurkat clon E6.1;
JNK, c-jun N-amino terminal kinasa.
kDa, kiloDalton;
Kd, *kinase dead* (mutante catalíticamente inactivo);
LB, medio de Luria Bertani;
MAPK, proteína kinasa activada por mitógenos;
MEK, MAPK kinasa;
min, minutos;
MMP_i, inhibidor de metaloproteinasas de la matriz extracelular.
MVB, *multivesicular body* (cuerpo multivesicular);
Mw, *molecular weight* (peso molecular);
NF-κB, factor nuclear κB
PA, ácido fosfatídico;
PBS, *Phosphate buffer saline* (tampon fosfato salino);
PHA-m, phitohemaglutinina M;
PKC, protein kinasa C;
PKD, protein kinsasa D;
PI, yoduro de propidio;
PIC, *protease inhibitor cocktail* (cocktail de inhibidores de proteasas).
PLC, fosfolipasa C;
PMA, forbol 12-miristato acetato;
PMSF, fenil metil sulfonil fluoruro;
PIP₂, fostatidil inositol 4,5-bifosfato.
PFA, paraformaldehido;
PS, solución de permeabilización;
PTK, protein tirosina kinasa;
pto, punto experimental;
RasGRP, *Ras guanyl exchange factor*;
SB, *sample buffer* (tampón de carga);
SDS, dodecil sulfato sódico;
SDS-PAGE, Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes;

Stau, estaurosporina

TCR, *T-cell receptor* (receptor de célula T);

TGN, *trans Golgi network*;

TNF, *tumor necrosis factor* (factor de necrosis tumoral);

WB, *Western blotting* (inmunotransferencia);

z-VAD, z-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilketone;

Índice.

1. Antecedentes y objetivos.

1.1 Antecedentes.....	12
1.2 Objetivos.....	13

2. Introducción.

2.1 La muerte celular programada.....	15
2.2 Apoptosis y necrosis.....	15
2.3 Consecuencias inmunológicas de la muerte celular.....	17
2.4 Mecanismos moleculares de la apoptosis.....	18
2.4.1 Las caspasas: componente central del programa apoptótico.....	18
2.4.2 Apoptosis mediada por receptores de muerte.....	19
2.5 Receptores de muerte de la familia TNFR.....	21
2.5.1 Receptores de TNF (TNF-R).....	21
2.5.2 El receptor de Fas y su ligando específico: FasL.....	21
2.5.3 Vía apoptótica mitocondrial o vía “intrínseca” de apoptosis.....	23
2.5.4 Receptores de muerte DR4 y DR5.....	24
2.6 Fas/FasL en el sistema inmune.....	24
2.6.1 Control de la expresión de FasL.....	25
2.6.2 Regulación funcional de la actividad citotóxica de FasL	25
2.6.3 Secreción de mFasL citotóxico en microvesículas.....	26

2.7 Muerte Celular Inducida por Activación (AICD).....	26
2.7.1 Activación y muerte celular durante el desarrollo tímico.....	27
2.7.2 Activación y muerte celular en el sistema inmune periférico.....	28
2.8 El receptor de antígeno de células T (TCR).....	29
2.8.1 Los co-receptores CD4 y CD8 de linfocitos T.....	29
2.8.2 Señalización a través del TCR.....	30
2.8.3 La línea celular JHM1-2.2.....	30
2.8.4 Señalización a través del receptor muscarínico HM1R.....	31
2.8.5 Inducción de la expresión de FasL.....	32
2.9 Diacilglicerol quinasa alfa (DGK α).....	33
2.9.1 Diacliglicerol quinasa alfa y señalización a través del TCR.....	34
2.9.2 Diacliglicerol quinasa alfa y activación del linfocito T.....	34
2.10 Fas/FasL y AICD: Implicaciones patológicas.....	35
2.10.1 Enfermedades autoinmunes y el sistema Fas/FasL.....	36
2.10.2 Mantenimiento del privilegio inmune.....	36
2.10.3 El sistema Fas/FasL y su implicación en cáncer.....	36
2.10.4 Tratamiento de tumores: apoptosis inducida por Fas/FasL.....	37
2.10.5 Fas/FasL y la apoptosis inducida en linfocitos por HIV.....	37
2.11 Conclusión.....	38

3. Materiales y Métodos.

3.1 Anticuerpos utilizados.....	40
3.2 Reactivos.....	41
3.4 Métodos experimentales.....	44

4. Resultados.

4.1 Expresión de los receptores TCR y Fas en células JHM1-2.2.....	61
4.2 Inducción de AICD en la línea celular JHM1-2.2	62
4.3 Implicación del sistema Fas/FasL en la AICD inducida por CCh.....	65
4.4 La inhibición de la DGK α potencia la AICD inducida por FasL.....	66
4.5 Expresión de la construcción GFP-DGK α	68
4.6. Efecto de la expresión de GFP-DGK α sobre la inducción de AICD.....	70
4.7 La DGK α no afecta la regulación transcripcional del gen de FasL.....	71
4.8 La DGK α no afecta los niveles intracelulares de FasL.....	74
4.9 La expresión de formas constitutivamente activas de DGK α no inhiben la AICD inducida por CCh.....	79
4.10 La forma bioactiva, no procesada de FasL (mFasL) no se detectó en membrana plasmática.....	81
4.11 La estimulación del receptor HM1R induce la secreción de microvesículas/exosomas con FasL.....	83
4.12 La inhibición farmacológica de la DGK α aumenta la secreción de exosomas con FasL.....	86

4.13 Ensayo de la citotoxicidad de las microvesículas secretadas.....	88
4.14 La inhibición de la DGK α potenció la citotoxicidad de la fracción de exosomas secretada tras estimulación con CCh.....	92
4.15 La expresión de DGK α disminuye la secreción/liberación de exosomas que contienen FasL.....	95
4.16 Implicación del sistema Fas/FasL en la AICD inducida en cultivos primarios de blastos T humanos.....	96
4.17 La inhibición de la DGK α aumenta la AICD inducida en cultivos primarios de blastos T humanos.....	97
4.18 La inhibición de la DGK α aumenta la secreción de exosomas que contienen mFasL bioactivo en linfoblastos T CD4+.....	99
4.19 Efecto de la estimulación con CCh sobre la formación de endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares (MVBs).....	100
4.20 Estudio de la formación de endosomas tardíos/MVBs.....	102
4.21 El inhibidor de DGKs R59949 induce cambios en la distribución y localización de endosomas tardíos/MVBs.....	104
4.22 Efecto del inhibidor de DGKs R59949 sobre la formación de vesículas desde la parte <i>trans</i> del aparato de Golgi.....	108
4.23 La DGK α se encuentra asociada a estructuras TGN/MVBs.....	115
4.24 La estimulación con CCh induce translocación de la DGK α y de la PKD a la región perinuclear/MVBs.....	117
4.25 El inhibidor R59949 potencia la translocación de la proteína quinasa D (PKD) a la región perinuclear/TGN.....	121

4.26 El inhibidor R59949 potencia la localización de la GFP-DGK α en la región perinuclear/TGN y en estructuras vesiculares/MVBs.....122

4.27 El R59949 potencia la localización de la GFP-DGK α en el interior de cuerpos multivesiculares tras la estimulación con CCh.....126

5. Discusión.

5.1 DGK α , activación celular y muerte celular inducida por activación (AICD) tras estimulación de receptor.....136

5.2 Inducción de apoptosis por mFasL presente en exosomas.....138

5.3 Especificidad de los exosomas que contienen mFasL139

5.4 Papel de los exosomas en el sistema inmune.....140

5.5 Exosomas con FasL y el escape inmune de células tumorales.....141

5.6 DAG, DGK α y la dinámica del tráfico vesicular intracelular.....142

5.7 DAG, DGK α y la proteína quinasa D (PKD) en el TGN.....143

5.8 DGK α y formación de cuerpos multivesiculares (MVBs).....145

6. Conclusiones.....148

7. Bibliografía.....151

1. Antecedentes y objetivos.

“Aquel que pregunta es un tonto por un momento, pero el que no pregunta permanece tonto para siempre.”

Antiguo proverbio chino.

1.1 Antecedentes.

La coordinación entre los procesos de muerte y proliferación celular juega un papel vital en el mantenimiento, homeostasis y el correcto funcionamiento del organismo [Golstein, 1998]. La muerte celular programada o apoptosis es un proceso de gran importancia fisiológica que se produce de forma natural en el desarrollo normal de los organismos pluricelulares, teniendo lugar en toda clase de eucariotas multicelulares: nemátodos, insectos, plantas, y vertebrados [Vaux et al., 1994; Ameisen, 1996], así como en eucariotas unicelulares como el hongo *Dictyostelium discoideum*, el parásito *Trypanosoma brucei* o el ciliado *Tetrahymena thermophila* [Ameisen et al., 2002]. Es un mecanismo muy conservado a lo largo de la escala evolutiva que participa de manera esencial en el desarrollo embrionario y en la homeostasis del organismo durante la vida adulta [Glücksman et al., 1951; Kerr et al., 1972; Jacobson et al., 1997].

La apoptosis juega un papel importante en la correcta función del sistema inmune. Un defecto o una frecuencia demasiado baja en muerte celular tienen lugar en varios tipos de cáncer, como en algunos linfomas, en enfermedades autoinmunes, y en la expansión de infecciones virales. Por el contrario un exceso de muerte celular tiene lugar en diversas inmunodeficiencias, como el SIDA [Thompson et al., 1995; Fadeel et al., 1999].

Durante la homeostasis del sistema inmune se dan muchos ejemplos clásicos de muerte celular programada. Existe un tipo especial de muerte celular que afecta a las células T maduras que han sido previamente activadas, proceso denominado **muerte celular inducida por activación o AICD** (del inglés “Activation-Induced Cell Death”) [Kabelitz et al., 1993; Russel et al., 1995]. El mecanismo que controla este proceso está regulado por el sistema Fas/ligando de Fas [Vignaux et al., 1994; Dhein et al., 1995]. Fas (CD95) es un receptor de superficie que pertenece a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR-1), y que al ser ligado por su ligando fisiológico, FasL, induce muerte celular por apoptosis [Nagata et al., 1995]. Se ha descrito en linfocitos T un mecanismo de inducción de apoptosis mediada por FasL el cual implica la secreción al medio extracelular de pequeñas vesículas, denominadas microvesículas o exosomas, que contienen FasL en su membrana [Martínez-Lorenzo et al., 1999; Monleón et al., 2001].

1.2 OBJETIVOS.

- Estudio de las respuestas celulares reguladas por el diacilglicerol (DAG) que tienen lugar tras la estimulación de receptor en linfocitos T humanos.
- Estudio de la vía de señalización intracelular mediada por diacilglicerol (DAG) durante los procesos de activación celular y muerte celular inducida por activación (AICD) del linfocito T.
- Papel de la diacilglicerol quinasa alfa (DGK α) durante la muerte celular inducida por activación (AICD) mediada por el sistema Fas/FasL en linfocitos T humanos.

2. Introducción.

“Empecemos por el principio: las descripciones de una historia natural y el entusiasmo como perseverancia del sentimiento.”

Ana Vallés, “Eloxio do entusiasmo.”

2.1 La muerte celular programada o apoptosis.

Desde comienzos de la mitad del siglo XX, la acumulación de diversas observaciones experimentales indicaban la función fundamental que la muerte celular tenía en los organismos multicelulares [Glücksman et al., 1951; Lockshin et al., 2001]. El término muerte celular programada fue introducido en 1964, al describirse que la muerte celular durante el desarrollo embrionario no ocurre de una forma accidental, si no que sigue una secuencia de pasos controlados que van a dar lugar a una autodestrucción de la célula de una forma local y temporalmente definida [Lockshin et al., 1964]. Posteriormente, en 1972 se describieron algunas características morfológicas de células que morían en condiciones fisiológicas [Kerr et al., 1972], acuñándose por primera vez el término **apoptosis**, en contraposición al término **necrosis**, proceso de muerte que se observaba fundamentalmente durante manifestaciones patológicas.

Desde el punto de vista del mecanismo, el término **muerte celular programada** responde a estudios que demostraron la existencia de una maquinaria intracelular de muerte, cuyos componentes se expresan en todas las células del organismo [Weil et al., 1996], es decir, existe un “**programa**” que controla el mecanismo de muerte celular, siendo un proceso regulado a nivel genético muy conservado a lo largo de la escala evolutiva. Este fenómeno, que por su definición pudiera introducir una connotación negativa para el organismo es, sin embargo, un proceso esencial. Así, está implicado en multitud de procesos biológicos, como la morfogénesis o sinaptogénesis (especialmente en el desarrollo embrionario), el desarrollo/formación/destrucción de tejidos y estructuras, el control del número de células, la eliminación de células dañadas, anormales o no funcionales, la generación de células diferenciadas, etc...

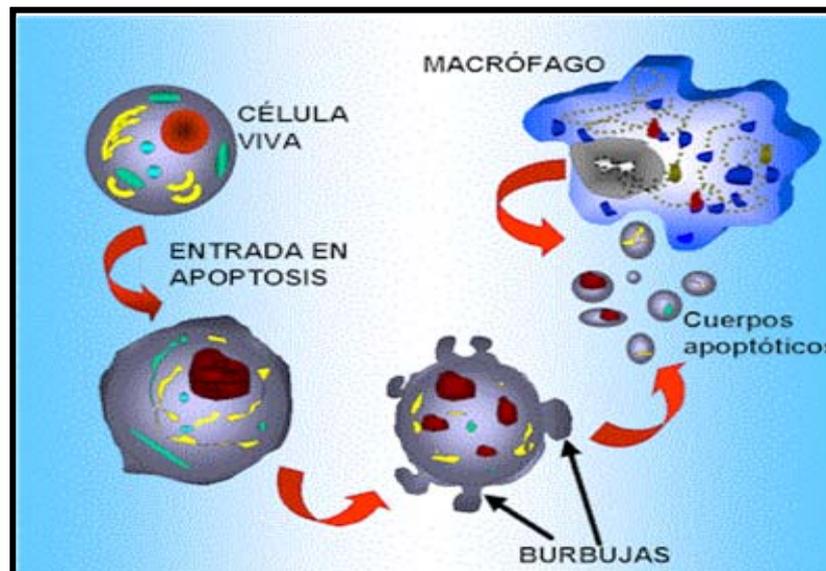
2.2 Apoptosis y necrosis.

Como se ha comentado anteriormente, la muerte celular en animales superiores puede ocurrir principalmente a través de dos procesos o mecanismos diferentes: **necrosis o apoptosis**.

- La **necrosis** es un proceso desordenado de muerte celular, provocado generalmente por un daño físico, químico u osmótico. Durante este proceso el volumen celular aumenta, se pierde la integridad de la membrana plasmática y de las membranas internas, provocando su rotura. Como consecuencia de estas roturas se produce la liberación no controlada al medio extracelular del contenido intracelular, lo que puede llegar a

desencadenar respuestas inflamatorias locales así como daño en las células y tejido adyacentes [Thompson et al., 1995; Leist et al., 2001]. Este tipo de muerte celular suele estar asociada a situaciones patológicas y/o daño celular accidental.

- La **apoptosis**, o **muerte celular programada**, en cambio es un proceso de autodestrucción celular ordenado y controlado. Tiene lugar en varias fases, e implica la activación de un programa de muerte [Kerr et al., 1972]. La célula va reduciendo paulatinamente su volumen y se produce condensación del núcleo. La envoltura nuclear y los nucleolos se rompen, mientras la cromatina se condensa y se rompe en fragmentos regulares. En las fases finales, la membrana plasmática comienza a formar una especie de “burbujas” (en inglés “*blebs*”), que van a dividir la célula en pequeños cuerpos apoptóticos que contienen citosol, la cromatina fragmentada y los diferentes orgánulos celulares.



Durante las fases más tempranas del proceso apoptótico se pierde la asimetría de la membrana plasmática, teniendo lugar la translocación del fosfolípido fostatidilserina, que está situado en la cara interna de la membrana plasmática, hacia la carta exterior de la membrana [Martín et al., 1995]. Esta translocación constituye una de las principales señales de reconocimiento de la célula apoptótica por parte de los macrófagos. Una vez llevado a cabo el programa de muerte, los cuerpos apoptóticos resultantes van a ser fagocitados rápidamente y degradados por parte de macrófagos y/o células vecinas.

En los últimos años diversos estudios han observado que las descripciones morfológicas y bioquímicas que caracterizan diferencialmente los procesos de muerte por apoptosis o por necrosis no son estrictamente válidas a la hora de describir y caracterizar otros tipos de muerte celular. Se han descrito situaciones “intermedias” de muerte celular, que presentan características tanto de apoptosis como de necrosis (procesos denominados apo-necrosis, muerte celular programada “apoptosis-like” o “necrosis-like”), procesos de muerte celular por autofagia, muerte celular por apoptosis independiente de la activación de las caspasas, así como procesos de muerte celular programada no apoptótica o parapoptosis [Sperandio et al., 2000; Leist et al., 2001; Jambrina et al. 2003].

2.3 Consecuencias inmunológicas de la muerte celular.

El hecho de que una célula muera por necrosis o por apoptosis puede tener consecuencias inmunológicas bien distintas. Durante el proceso necrótico la pérdida de la integridad de la membrana plasmática induce la liberación del contenido intracelular al exterior, pudiendo causar un proceso inflamatorio no controlado y activación de una respuesta inmune generalizada [Rathmell et al., 1999]. En el caso de células infectadas por patógenos, este hecho puede facilitar la extensión de la infección a las células vecinas. Por otra parte, se ha descrito que la muerte por necrosis puede afectar de una forma positiva a la iniciación de la respuesta inmune, al favorecerse una reacción inflamatoria local y la maduración de células presentadoras de antígeno [Steinmann et al., 2000; Sauter et al., 2000]

En cambio, durante la muerte celular por apoptosis la célula mantiene la integridad de la membrana plasmática, y no se libera su contenido al medio extracelular. La formación de cuerpos apoptóticos va a permitir su rápida degradación al ser fagocitadas por las células vecinas, limitándose así reacciones locales de inflamación no controladas y un posible daño tisular. Por otra parte, este proceso de fagocitosis de los cuerpos apoptóticos puede ser utilizado por las células dendríticas o macrófagos para presentar antígenos presentes en las células apoptóticas, permitiendo la activación de células T específicas. [Albert et al., 1998; Steinmann et al., 2000].

2.4 Mecanismos moleculares de la apoptosis.

La apoptosis es un programa de muerte celular controlado, el cual requiere la interacción de múltiples factores. Se puede dividir en tres etapas o fases:

- **Fase de iniciación:** en la cual la célula recibe una señal de muerte, que puede venir tanto del exterior como del interior celular, como por ejemplo: la estimulación de receptores de superficie, daño al ADN, tratamiento con fármacos citotóxicos, radiación, pérdida de señales de supervivencia, etc... Estas señales van a provocar una susceptibilidad a la muerte celular por apoptosis.
- **Fase de compromiso:** esta fase comienza con la activación de unas proteasas específicas, las caspasas, de modo que la señal de iniciación del programa apoptótico se va a traducir en un proceso letal para la célula.
- **Fase efectora:** en la cual las caspasas van a llevar a cabo su función, dando lugar a los cambios bioquímicos y morfológicos que caracterizan la etapa final de la apoptosis.

2.4.1 Las caspasas: componente central del programa apoptótico.

Muchos de los mecanismos moleculares que están implicados en la muerte celular por apoptosis se han conservado a lo largo de la escala evolutiva, desde nemátodos hasta mamíferos [Vaux et al., 1994; Hengartner and Horvitz, 1994]. La iniciación del proceso de muerte por parte de señales pro-apoptóticas induce la activación de una cascada de proteasas específicas, que culmina con la proteólisis de diferentes sustratos celulares y el desmantelamiento de la célula de una forma rápida y controlada. El componente central de este sistema proteolítico está formado por una familia de proteasas, las “**caspasas**” [Alnemri et al., 1996], caracterizadas como Cisteín-proteASAS con especificidad de hidrólisis en un residuo de ácido ASPártico.

La mayoría de los estudios experimentales que permitieron el avance en el conocimiento de la maquinaria apoptótica fueron realizados mediante estudios genéticos en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. En este organismo se caracterizaron diversos genes implicados en la inducción de apoptosis observada en 131 de las 1090 células iniciales que posee *C. elegans* [Ellis et al., 1986; Ellis et al., 1991; Xue and Horvitz, 1995]. Se identificaron dos genes: *ced-3* y *ced-4*, implicados en este proceso. La proteína CED-3 fue caracterizada como una cisteín-proteasa, cuya activación mediada por oligomerización con la proteína CED-4 era necesaria

para inducir apoptosis. La primera caspasa caracterizada en vertebrados e implicada en procesos apoptóticos fue la caspasa-1 o ICE (del inglés “*Interleukin-1 β -Converting Enzyme*”), identificándose como la cisteín proteasa homóloga de CED-3 de *C. elegans* [Thornberry et al., 1992; Yuan et al., 1993]. CED-4 se ha descrito como el homólogo del factor activador de proteasas apoptóticas 1 de mamíferos, APAF-1. Se han identificado 14 caspasas en mamíferos [Zhang et al., 2003], presentando rasgos comunes entre ellas, siendo capaces de reconocer diferentes motivos tetrapeptídicos, lo que les confiere cierta especificidad de sustrato.

Las caspasas son sintetizadas como pro-enzimas inactivas, denominadas pro-caspasas, cuyo procesamiento proteolítico y posterior asociación en heterotetrámeros (dos subunidades pequeñas más dos subunidades grandes) da lugar a su activación [Walker et al., 1994; Stennicke et al., 1998]. Las caspasas de tipo proapoptótico se dividen en dos grandes grupos. Las **caspasas iniciadoras**, procaspasas -2, -8, -9 y -10, son activadas por señales de muerte y provocan la activación de las **caspasas ejecutoras o efectoras**: las procaspasas -3, -6 y -7, siendo éstas las encargadas de proteolizar diferentes sustratos celulares así como a otras caspasas, amplificando la señal de muerte y ejecutando el programa apoptótico [revisado en Earnshaw et al., 1999]. Se conocen más de 60 sustratos celulares para las caspasas, entre los que se encuentran proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 [Cheng et al., 1997], proteínas implicadas en la reparación del ADN o en la organización de la cromatina [Kaufmann et al., 1993], proteínas estructurales, así como proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto [Rudel and Bokoch, 1997].

2.4.2 Apoptosis mediada por receptores de muerte.

Los organismos superiores han desarrollado receptores capaces de transmitir señales de muerte al interior celular. Esta vía de señalización o “vía extrínseca de inducción de apoptosis” está mediada por los receptores de muerte (en inglés, “*death receptors*”) que se encuentran en la superficie celular, y que transmiten la señal apoptótica al interior de la célula tras su estimulación con sus ligandos específicos, resultando en el reclutamiento y activación de la procaspasa-8 [Irmiler et al., 1997]. Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor para el **f**actor de **n**ecrosis **t**umoral (TNF-R), e incluye entre otros, el TNFR-1, Fas (CD95/APO-1) y los receptores de TRAIL DR-4 y DR-5 [Ashkenazi et al., 2002]. Estos receptores poseen dominios extracelulares ricos en cisteína, lo que les permite el reconocimiento específico de sus respectivos ligandos, lo cual da lugar a la oligomerización y posterior activación del receptor de muerte [Tanaka et al., 1998; Naismith et al., 1998].

El siguiente paso tras la estimulación del receptor está mediado por el dominio citoplasmático del receptor, el cual contiene una secuencia conservada denominada dominio de muerte (**DD**, del inglés “*death domain*”) [Itoh et al., 1993]. La conexión entre los receptores de muerte y la activación de las caspasas iniciadoras es llevada a cabo por **proteínas adaptadoras**, conexión llevada a cabo mediante asociaciones físicas e interacciones homotípicas entre **dominios de muerte (DD)**, dominios conocidos como **dominios efectores de muerte (DED)** y los **dominios de reclutamiento de caspasas (CARD)** [Thornberry et al., 1998; Hofmann et al., 1997]. Proteínas adaptadoras como FADD/MORT1, TRADD y RIP poseen dominios DD a través de los cuales son reclutadas a los dominios DD de los receptores de muerte activados, formándose de este modo el **complejo de señalización inductor de muerte** o **DISC** (del inglés “*death inducing signalling complex*”). Algunos de estos adaptadores contienen, además, el dominio efector de muerte DED, el cual va a reclutar a las caspasas iniciadoras, resultando en su activación, como es el caso de la caspasa-8 [Boldin et al., 1995; Medema et al., 1997; Kischkel et al., 1995] (figura 1).

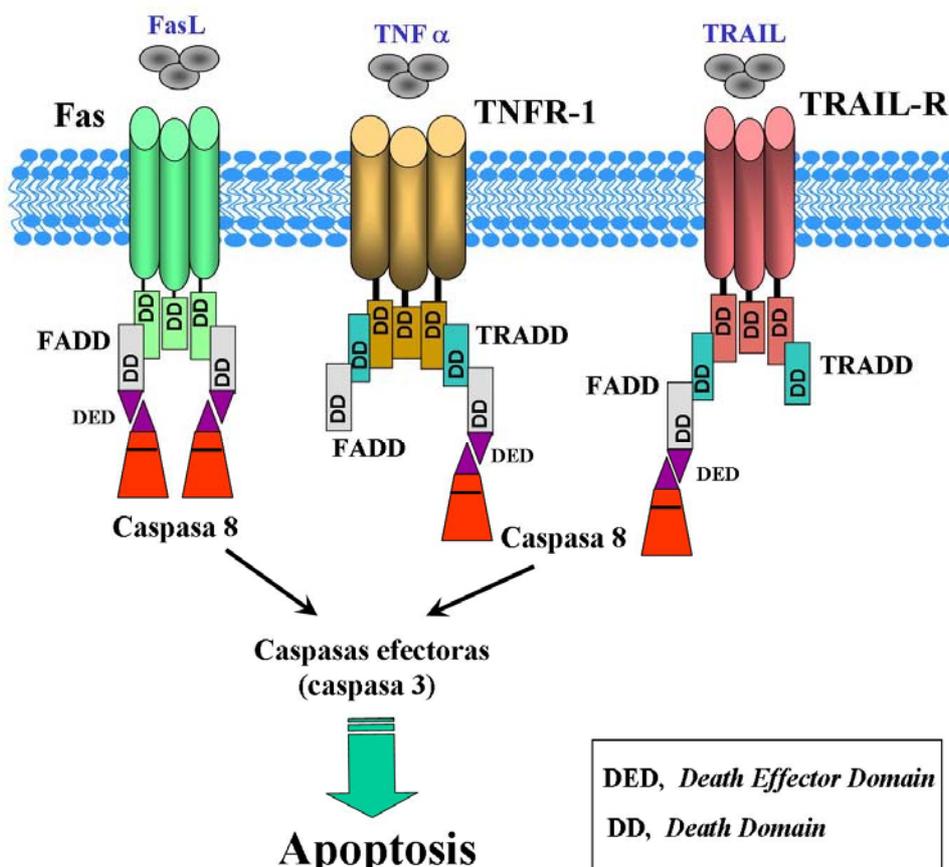


Figura 1. Inducción de apoptosis a través de la familia TNF-R.

2.5 Receptores de muerte de la familia del receptor de TNF.

Los mamíferos han desarrollado una variedad de rutas de señalización que dan lugar al inicio y progreso del programa apoptótico. Entre estas rutas, la apoptosis inducida por receptores de muerte constituye una de las vías mejor estudiadas [revisado en Peter et al., 1999]. Los receptores de muerte mejor caracterizados se engloban dentro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R), siendo los receptores mejor estudiados el TNF-R1, Fas (CD95/APO1), APO2L (TRAIL), DR4 y DR5.

2.5.1 Receptores de TNF (TNF-R).

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una citoquina producida principalmente por macrófagos activados, linfocitos T y otras células en respuesta a estímulos invasores, induciendo una gran variedad de efectos biológicos. El TNF se ha descrito como un mediador implicado en respuestas inflamatorias, posee actividad antiviral y citotóxica, y es capaz de estimular el crecimiento y diferenciación celular [Vassalli et al., 1992]. Su actividad depende de su asociación con el receptor TNFR-1 (p55/CD120a) o con el receptor TNFR-2. La unión de TNF al receptor TNFR-1 activa a los factores de transcripción NF κ B y AP-1, dando lugar a la inducción de genes de carácter proinflamatorio e inmunoregulador. Únicamente el receptor TNFR-1 posee el dominio de muerte DD, siendo su unión con TNF capaz de inducir apoptosis en algunos tipos celulares [Tartaglia et al., 1993].

2.5.2 El receptor Fas (CD95/APO1) y su ligando específico: FasL.

La vía apoptótica iniciada por el receptor **Fas** es una de las mejor caracterizada a nivel genético y bioquímico dentro del sistema inmune [Peter et al., 1998]. Fas es una glicoproteína de membrana de tipo I de ~45 kDa que se encuentra ampliamente expresada en la membrana plasmática de timocitos, células T y B normales y tumorales, células epiteliales, así como en varios tejidos: hígado, corazón, pulmones y ovarios [Watanabe-Fukunawa et al., 1992]. Se ha observado que la transmisión de la señal de muerte puede ser llevada a cabo por entrecruzamiento del receptor con anticuerpos agonistas multivalentes, como el mAb CH-11, o tras su estimulación con su ligando natural, **FasL** [Nagata et al., 1995], siendo este proceso dependiente de la trimerización de Fas presente en la membrana plasmática [Siegel et al., 2000^a].

El ligando fisiológico de Fas, denominado **FasL o CD95L**, es una citokina de ~40 kDa perteneciente a la familia del TNF. Es una proteína de membrana de tipo II que se expresa predominantemente en células T activadas, linfocitos T citotóxicos, neutrófilos y células NK activadas (“*natural killers*”), así como en aquellos tejidos que mantienen un status de “privilegio inmune” (cornea, placenta, testis, cerebro) [Nagata, 1999]. Se ha encontrado un receptor señuelo para FasL, DcR3, el cual no posee el dominio de muerte (DD) y que se encuentra sobre-expresado en tumores de pulmón y colon [Pitti et al., 1998].

Tras la estimulación y multimerización de Fas, un complejo de proteínas se va a asociar con su dominio citoplasmático. La proteína adaptadora FADD o MORT1 (del inglés, *Fas Associated protein with Death Domain*) se une al dominio DD de Fas. El dominio efector de muerte DED de FADD recluta a continuación varias subunidades de procaspasa-8, formándose así el complejo **DISC**. Esta unión induce la activación autoproteolítica de la caspasa-8 y su liberación al citosol [Medema et al., 1997; Martín et al., 1998]. Según la cantidad de caspasa-8 activa y del tipo celular [Scaffidi et al., 1998], se inician vías de señalización intracelular diferentes. En las **células de tipo I**, cantidades grandes de caspasas-8 activa van a activar la cascada de caspasas tras activación directa de la caspasas efectoras caspasa -3 y -7. En cambio, en las **células de tipo II**, pequeñas cantidades de caspasa-8 activa van a inducir la **vía de muerte mitocondrial** (figura 2).

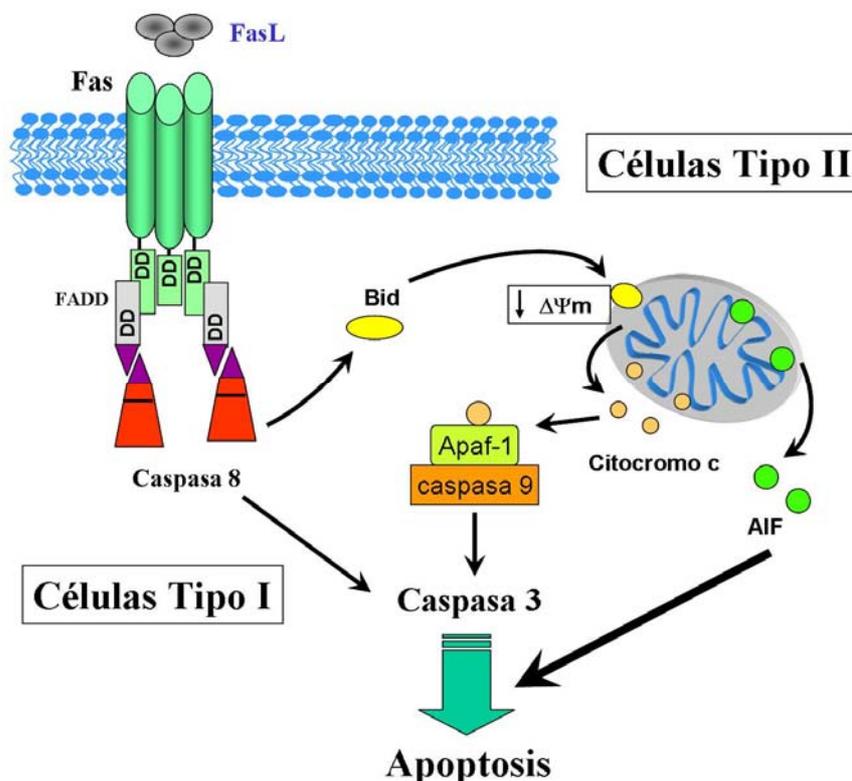


Figura 2. Vías de inducción de apoptosis mediada por Fas en células tipo I y II.

2.5.3 Vía apoptótica mitocondrial o vía “intrínseca” de apoptosis.

La mitocondria está implicada en la amplificación de la vía apoptótica mediada por los receptores de muerte (**vía extrínseca de inducción de apoptosis**), cuando se generan pequeñas cantidades de la caspasa iniciadora caspasa-8 activa, y por tanto no tiene lugar una cascada de activación de caspasas suficientemente fuerte. Esta amplificación tiene lugar a través de la proteína Bid de la familia de Bcl-2, cuyo procesamiento por la caspasa-8, induce la translocación de Bid a la membrana de la mitocondria. En la mitocondria, Bid reacciona con los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 Bax y Bak, induciéndose la liberación al citosol de factores pro-apoptóticos mitocondriales, como el citocromo c, el factor inductor de apoptosis AIF y las procaspasas -2, -3 y -9 [Luo et al., 1998; Gross et al., 1999; Susin et al., 1999]. Esta liberación va a inducir el ensamblaje del **complejo activador de caspasas o apoptosoma** [Li et al., 1997], formado por el citocromo c, APAF-1 y la procaspasa-9 (figura 2) [Zou et al., 1997]. El apoptosoma induce a continuación un eficiente procesamiento y activación de las caspasas -9, -3 y -7, lo que conduce a una rápida amplificación de la cascada de caspasas (con la activación posterior las caspasas -6, -2, -8 y -10).

La mitocondria tiene también un papel central en la integración y la propagación de las señales de muerte que se originan en el interior celular o **vía intrínseca de inducción de apoptosis**. Esta vía de apoptosis se activa por daño en el ADN, ciertas radiaciones, estrés oxidativo, sobrecarga de calcio iónico, deprivación de nutrientes y señales inducidas por diversos fármacos [Kaufmann et al., 2000; Wang, 2001]. La mayoría de estas condiciones dan lugar a una pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP), procesos que están bajo el control de los miembros de la familia Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-X_L, Bid, Bax, Bak y Bim) [Kroemer et al., 1997]. Estos eventos inducen un desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico en la mitocondria, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el desmantelamiento de la membrana externa de la mitocondria, lo que causa la liberación al citosol de citocromo c, procaspasas -2, -3 y -9, así como AIF (factor implicado en la condensación y fragmentación del ADN de manera independiente de caspasas) [Susin et al. 1999].

2.5.4 Receptores de muerte DR4 y DR5.

DR4 y DR5 (del inglés “*death receptor*”) son receptores de muerte cuyo ligando, APO2L/TRAIL (del inglés “*tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*”), miembro también de la familia de TNF, es capaz de inducir apoptosis. [Wiley et al., 1995]. Se han identificado cuatro receptores para APO2L: DR4, DR5, DcR1 y DcR2, de los cuales únicamente DR4 (TRAIL-R1) y DR5 (TRAIL-R2) son capaces de inducir apoptosis, mientras que DcR1 y DcR2 son receptores señuelo. Estos receptores se expresan en bazo, timo, próstata, ovario, intestino delgado, colon y placenta, estando ausentes en el cerebro [Wiley et al., 1995]. Al igual que Fas, la apoptosis inducida a través de DR4 y DR5 es dependiente del reclutamiento de la proteína adaptadora FADD y de la consiguiente activación de la caspasa-8 [Sprick et al., 2000].

2.6 Fas/FasL en el sistema inmune.

Uno de los mecanismos principales que controla la apoptosis en el sistema inmune periférico es el sistema Fas/FasL [Russel et al., 1993; Vignaux et al., 1994; Dhein et al., 1995]. Tanto las células T activadas, los linfocitos T citotóxicos, neutrófilos y células NK activadas, como multitud de tipos celulares de origen no linfoide expresan el receptor Fas en membrana plasmática (comentado en el apartado 2.5.2), y por tanto son sensibles a la inducción de muerte por FasL. Además de esta actividad pro-apoptótica, se ha descrito que el sistema Fas/FasL es capaz de inducir reacciones de carácter pro-inflamatorio mediadas por neutrófilos y macrófagos. [Chen et al., 1998; Holhbaum et al., 2000]. En diversos estudios se ha observado que la inyección intraperitoneal de células que expresan FasL induce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-1 β , MIP-1 α y β (del inglés “*macrophage inflammatory protein*”), quemoquinas, así como la infiltración y activación de neutrófilos en la cavidad peritoneal [Chen et al., 1998; Miwa et al., 1998; Holhbaum et al., 2000]. Además, esta actividad pro-inflamatoria observada se encuentra directamente correlacionada con la capacidad citotóxica de FasL [Holhbaum et al., 2000]. Por tanto, uno de los mecanismos que debe regular la actividad pro-inflamatoria y/o la actividad inductora de apoptosis llevada a cabo por FasL está basado en el control preciso de la expresión de FasL en la superficie celular y su interacción con el receptor Fas.

2.6.1 Control de la expresión de FasL.

Existen tejidos en los que es imprescindible evitar una respuesta inmune y el proceso inflamatorio asociado, lo cual conllevaría un daño y una posible destrucción del tejido. En estos tejidos, denominados “**sitios de privilegio inmune**”, como la cornea, la placenta, los testículos o el cerebro, FasL es expresado constitutivamente en la superficie celular, siendo capaz de inducir la muerte de las células del sistema inmune que pudieran infiltrarse en el tejido, evitándose así un proceso inflamatorio y el daño tisular. [Nagata, 1999].

Durante el desarrollo de la respuesta inmune específica, el reconocimiento del antígeno de la célula diana a eliminar es llevado a cabo por el complejo receptor de antígeno de células T (TCR), el cual induce la expresión de FasL en el linfocito T. En este caso la expresión de FasL debe estar muy controlada de forma que solo se produzca la eliminación de células dianas específicas.

En linfocitos T, una vez FasL es sintetizado, es dirigido y almacenado en lisosomas secretores especializados [Bossi and Griffiths, 1999]. Estas vesículas intracelulares son una combinación especial de lisosomas y gránulos secretores que se observan en diversas células de origen hematopoiético [Stinchcombe and Griffiths, 1999]. Ciertas células T especializadas, como los linfocitos T citotóxicos y células NK, almacenan en su interior diversos componentes citotóxicos, como perforina, granzima A y B e hidrolasas ácidas, siendo utilizados junto con FasL para destruir células diana infectadas o tumorales [Henkart et al., 1984]. Durante la formación de la denominada “**sinapsis inmunológica**”, la estimulación del TCR induce la fusión de estos lisosomas secretores con la membrana plasmática [Bossi and Griffiths, 1999], produciendo la liberación polarizada de su contenido hacia la célula diana. Como consecuencia de este proceso FasL se expresa en la superficie celular, donde podrá interactuar con el receptor Fas presente en la célula diana.

2.6.2 Regulación funcional de la actividad citotóxica de FasL.

Una vez llevada a cabo su función, FasL en la membrana plasmática es rápidamente procesado por metaloproteinasas de la matriz extracelular, proceso que se observa en otros miembros de la familia del TNF, como TNF- α , y el ligando para CD40 (CD40L) [Kayagaki et al., 1995]. La acción de estas metaloproteinasas provoca el corte proteolítico del dominio extracelular de FasL (extremo carboxi-terminal), que es el dominio implicado en la unión al receptor de Fas. Este procesamiento proteolítico da lugar a una fracción soluble de FasL de ~26

kDa (**sFasL**), y una fracción de ~14 kDa, unida a la membrana plasmática. Aunque en un principio se describió que la forma soluble de FasL (sFasL) retenía su potencial citotóxico [Tanaka et al., 1995; Kayagaki et al., 1995], estudios posteriores demostraron su baja toxicidad, siendo la forma de membrana no proteolizada **mFasL de 40 kDa**, la forma funcionalmente activa capaz de inducir apoptosis [Suda et al., 1997; Schneider et al., 1998]. Este procesamiento proteolítico de FasL ha sido propuesto como un mecanismo de regulación negativa o inhibición funcional de la acción a nivel de membrana plasmática de FasL [revisado en Tanaka et al., 1998].

2.6.3 Secreción de mFasL citotóxico en microvesículas.

Además de la expresión de FasL en la superficie celular, se ha descrito en linfocitos T activados otro mecanismo implicado en la inducción de muerte celular a través del sistema Fas/FasL. Este mecanismo está basado en el hecho de que FasL puede ser localizado en la membrana de pequeñas vesículas intracelulares. Estas vesículas se forman por invaginación interna de la membrana hacia el lumen de endosomas de tipo tardío, dando lugar a la formación de **cuerpos multivesiculares (MVB**, del inglés “***M*ulti***v***esicular ***B***odies”) [Denzer et al., 2000; Martínez-Lorenzo et al., 1999; Bossi and Griffiths, 1999; Monleón et al., 2001], donde quedan almacenadas. Tras la estimulación/activación del linfocito T vía TCR, se induce la degranulación de estos MVBs hacia la membrana plasmática, resultando en su fusión con la membrana y la consiguiente liberación al exterior celular de las vesículas contenidas en su interior, denominadas **microvesículas o exosomas**. Estos exosomas expresan en su superficie FasL en su forma de membrana no procesada, **mFasL de 40 kDa**, así como el ligando de los receptores DR4 y DR5 Apo2L. Cuando son enfrentados a células diana, estos exosomas secretados que contienen FasL poseen capacidad inductora de apoptosis mediada por la interacción de FasL con el receptor Fas [Martínez-Lorenzo et al., 1999; Monleón et al., 2001].**

2.7 Muerte Celular Inducida por Activación (AICD).

El inicio de la respuesta inmune está determinado por la capacidad de las células T para reconocer y responder a estímulos antigénicos. Este reconocimiento antigénico es llevado a cabo a través del complejo receptor de antígeno **TCR/CD3** (del inglés “***T*** ***C***ell ***a***ntigen ***R***eceptor”) [Brown et al., 1988]. La estimulación de las células T vía TCR desencadena una

cascada intracelular de procesos bioquímicos que conducen a la activación, proliferación y diferenciación de la célula T, dando lugar a la función efectora del linfocito T. A su vez, la estimulación del TCR en estas células activadas es capaz de desencadenar un proceso apoptótico denominado **muerte celular inducida por activación** o **AICD** (del inglés "Activation Induced Cell Death") [Ashwell et al., 1987; Jones et al., 1990; Russel et al., 1991; Kabelitz et al., 1993].

Ambos procesos inducidos tras la estimulación del TCR, **activación** y **apoptosis**, requieren de la activación de la expresión génica, transcripción y traducción ("**fase de programación**"), seguida de una "**fase efectora**", que conducirá bien a proliferación celular o bien hacia apoptosis. Durante la "fase de programación" tiene lugar la expresión de una gran variedad de proteínas implicadas en la activación del linfocito T, como CD69/AIM (del inglés "Activating inducer molecule"), la interleuquina-2 (IL-2) y su receptor (IL2-R) [Desai et al., 1990, Izquierdo et al., 1996], así como moléculas pro-apoptóticas como el receptor Fas y FasL [Anel et al., 1994; Strasser et al., 1995; Lenardo et al., 1997]. Junto con el sistema $TNF\alpha/TNF\alpha R$, el sistema Fas/FasL ha sido descrito como uno de los mecanismos principales que controla la muerte celular por activación o AICD en el sistema inmune periférico [Vignaux and Golstein, 1994; Dhein et al., 1995].

2.7.1 Activación y muerte celular durante el desarrollo tímico.

La interpretación de la señal iniciada a nivel del TCR, activación o muerte celular, va a depender del estado de maduración/activación de la célula T y/o del contexto celular en el cual se produce el reconocimiento del antígeno. Durante las primeras fases del desarrollo tímico de células T, aquellos linfocitos inmaduros $CD4^-/CD8^-$ (DN, "*double negative*") que no expresan receptores de antígeno TCR funcionales debido a una falta de reordenamientos productivos del receptor, no reciben una señal de supervivencia a través del TCR, y como consecuencia mueren mediante apoptosis (muerte por defecto) [revisado en Haks et al., 1999]. En los siguientes estadios del desarrollo tímico, los timocitos inmaduros van a expresar los co-receptores CD4 y CD8 (células $CD4^+/CD8^+$, DP "*double positive*"). En estas células la estimulación del TCR puede conducir bien a apoptosis, **selección negativa**, o por el contrario a su **selección positiva**, procesos dependientes de la especificidad/avidez del TCR implicado [Finkel et al., 1989]. Ambos procesos requieren el reconocimiento mediado por TCR de péptidos antigénicos asociados con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad

(MHC) expresados en la superficie de células presentadoras de antígeno. Aquellos linfocitos que expresan receptores de antígeno con alta afinidad (timocitos autorreactivos), sufren apoptosis en respuesta a señales de muerte que reciben del microentorno tímico (**selección negativa**) [Nossal et al., 1994]. En cambio, aquellos timocitos doble positivos CD4⁺/CD8⁺ que expresan receptores TCR funcionales son seleccionados positivamente, diferenciándose en células CD4⁺ o células CD8⁺ (fase temprana del estadio maduro, SP “*single positive*”) [revisado en Jameson et al., 1998; Sebzda et al., 1999].

2.7.2 Activación y muerte celular en el sistema inmune periférico.

Una vez la respuesta inmune ha sido llevada a cabo, la mayoría de los linfocitos T activados durante este proceso ya no son necesarios y por tanto han de ser eliminados para así mantener la homeostasis en el sistema inmune. Este proceso de muerte es inducido principalmente por privación de factores de crecimiento y AICD. En el sistema inmune periférico la AICD de los linfocitos T depende de su estado de activación: los linfocitos T recién activados son resistentes a la inducción de apoptosis, resistencia inicial que precede a un estado sensible a la muerte celular [Lenardo et al., 1999; Baumann et al., 2002; Bosque et al., 2005]. Por el contrario, sólo unos pocos linfocitos T periféricos activados sobreviven al proceso de AICD, dando lugar a las células T de memoria [Opfermanm et al., 1999; revisado en Krueger et al., 2003]. Asimismo, la activación inducida por estimulación del TCR en linfocitos T citotóxicos inicia una respuesta bioquímica que conduce a la secreción de citoquinas, diversos mediadores citotóxicos, como el sistema perforina/granzimas, y a la expresión de FasL en la membrana plasmática [Anel et al., 1994] (comentado en el apartado 2.6.1).

Por lo tanto, la **muerte celular inducida por activación** o **AICD** juega un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia inmune periférica y central, así como en la homeostasis del sistema inmune, evitando posibles daños autoinmunes y procesos linfoproliferativos [Nossal et al., 1994; Nagata et al., 1995].

2.8 El receptor de antígeno de células T (TCR).

El receptor de antígeno de células T (TCR) es un complejo transmembrana que se expresa en forma de heterodímeros TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$. El tipo TCR $\alpha\beta$ es el más abundante, mientras que la forma TCR $\gamma\delta$ es expresada principalmente en linfocitos T asociados con tejidos periféricos [Chien et al., 1996]. El TCR está formado por una región extracelular, implicada en el reconocimiento del antígeno, una región transmembrana y un dominio citoplásmico pequeño. El TCR se encuentra asociado al complejo CD3, el cual está formado por la asociación en dímeros de sus diferentes subunidades: γ , δ , ϵ , ζ o η . El dímero TCR $\alpha\beta$ se va a asociar con los dímeros $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ y $\zeta\zeta/\eta\eta/\zeta\eta$, los cuales son esenciales para la correcta función del TCR. Estos dímeros del complejo CD3 son los encargados de la transducción de la señal al interior celular, la cual es mediada por el dominio citoplasmático del complejo CD3 [Clevers et al., 1988; Perez-Aciego et al., 1991; Abraham et al., 1992,] (figura 3).

2.8.1 Los co-receptores CD4 y CD8 de linfocitos T.

Para la completa estimulación antigénica del TCR son necesarias, además, varias moléculas accesorias, las cuales aumentan la avidéz e interacción por el antígeno presentado en la célula presentadora de antígeno. CD4 y CD8 son dos glicoproteínas que funcionan como co-receptores del complejo TCR/CD3. Durante la fase de timocitos inmaduros, los co-receptores CD4 y CD8 se expresan conjuntamente. Durante el proceso de maduración se selecciona una de estas glicoproteínas, dando lugar a células TCR $^+$ CD4 $^+$ o células TCR $^+$ CD8 $^+$. Las células CD4 $^+$ expresan TCRs específicos para el complejo mayor de histocompatibilidad MHC de clase II y ejercen principalmente funciones cooperadoras. En cambio las células CD8 $^+$ reconocen MHC de clase I y son mayoritariamente linfocitos T citotóxicos [Gay et al., 1987; Norment et al., 1998]. Estas interacciones contribuyen a la formación del complejo trimolecular MHC/TCR/CD4 o MHC/TCR/CD8 [Weiss et al., 1994; Thome et al., 1996;]. La unión de CD4 o CD8 al MHC induce la activación de la quinasa p56^{lck}, quinasa asociada intracelularmente a CD4 o CD8, generándose junto con la activación de proteín tirosin quinasas (PTKs) mediada por el complejo CD3 (quinasas FYN, ZAP70), las cascadas de señalización bioquímicas necesarias para la activación funcional del linfocito T [Weiss et al., 1994] (figura 3).

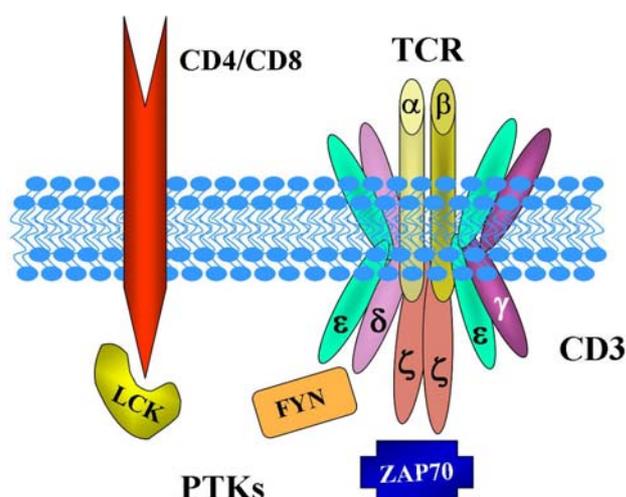


Figura 3. El complejo receptor de antígeno de células T (TCR). Las cadenas α y β del TCR se van a asociar al complejo CD3, el cual transmite la señal de reconocimiento del antígeno al interior celular mediante una cascada de fosforilaciones mediada por proteínas tirosin quinasas (PTKs). A la izquierda del complejo TCR/CD3 se muestra el co-receptor CD4 (o CD8).

2.8.2 Señalización a través del TCR.

La estimulación del TCR durante la formación de la “sinapsis inmunológica” induce la fosforilación y activación de proteínas tirosin quinasas intracelulares (PTKs) como Lck y Fyn, pertenecientes a la familia Src, y proteínas adaptadoras, proceso que está mediado por el complejo CD3 [Letourneur et al., 1992] (figura 3). Estas activaciones van a desencadenar la activación de la fosfolipasa C γ (PLC γ), la cual cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato ($PI_{4,5}P_2$) de la membrana plasmática, produciendo un aumento en los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 induce un flujo de Ca^{2+} intracelular desde el retículo endoplasmático al citosol, activándose la ruta calmodulina/calcineurina y posteriormente el factor de transcripción NF-AT. El aumento de DAG induce activación de la proteína quinasa C θ (PKC) y Ras [Desai et al., 1990; Izquierdo et al., 1992; Ebinu et al., 1998; Villalba et al., 1999], con la consiguiente activación de la ruta Ras/Raf/ERK2 y de la cascada de MAP kinasas (MAPK) [Izquierdo et al., 1993] (figura 4).

2.8.3 La línea celular JHM1-2.2.

El modelo celular utilizado en este estudio consiste en la línea celular JHM1-2.2, la cual ha sido descrita como un excelente modelo para el estudio de las señales intracelulares que median tanto la activación celular [Desai et al., 1990] como AICD [Izquierdo et al., 1996; Abraham and Weiss, 2004]. Esta línea celular fue generada por expresión estable del receptor muscarínico humano de tipo I (HM1R) en la línea celular Jurkat, clon E6.1 (JE6.1) [Desai et al., 1990], la cual deriva de una leucemia linfoblástica aguda de tipo T [Weiss et al., 1984].

2.8.4 Señalización a través del receptor muscarínico HM1R.

El receptor muscarínico de tipo 1 (HM1R) está formado por siete segmentos transmembrana y pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G heterotriméricas. La estimulación del receptor HM1 con su agonista carbacol (CCh), provoca la activación a nivel de membrana plasmática de la fosfolipasa β (PLC β), provocando de manera similar a la estimulación del TCR, un incremento rápido de DAG y de IP₃ a nivel de la membrana plasmática, con la consiguiente activación de la ruta de señalización mediada por las vías calcio/calcineurina, DAG/Ras/Raf/ERK2 y la ruta DAG/PKC/MAP kinasas (MAPK) (figura 4).

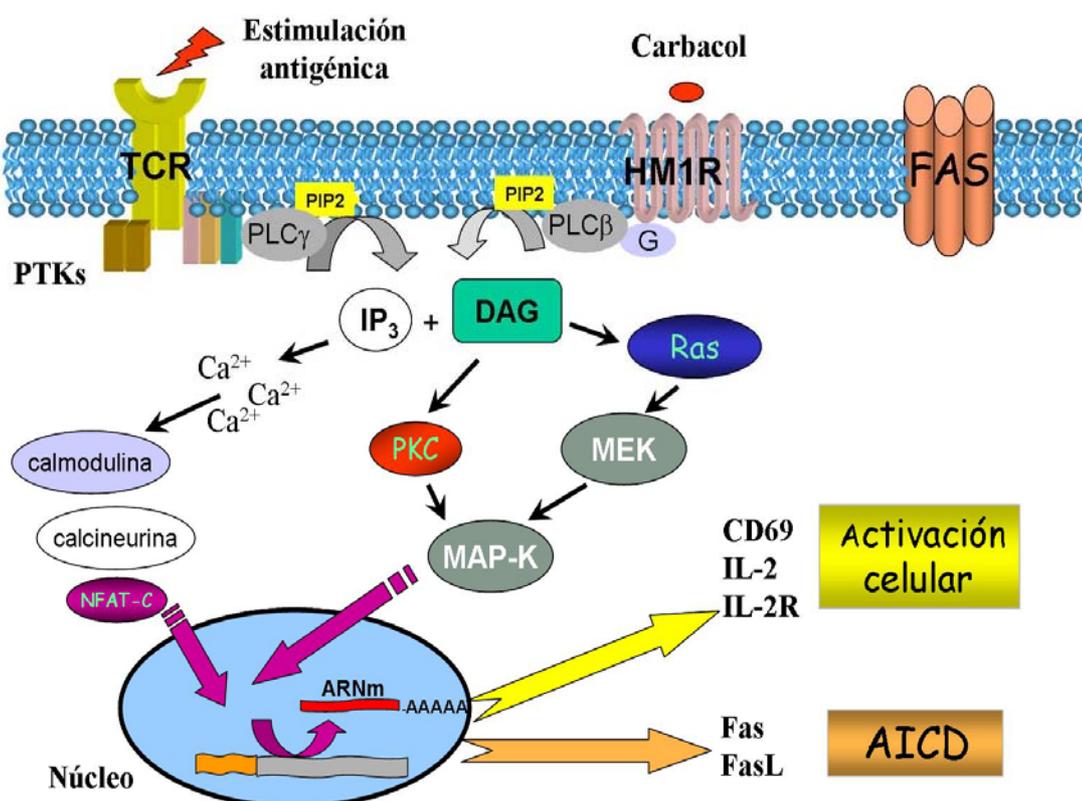


Figura 4. Señalización intracelular mediada por el TCR y el HM1R en células JHM1-2.2.

La estimulación farmacológica combinada de la **vía calcio/calcineurina** mediante el uso de ionóforos de calcio (como la ionomicina), y de la **vía PKC/MAPK** con ésteres de forbol (como el PMA), o bien la estimulación del receptor HM1R, mimetizan gran parte de las respuestas celulares que tienen lugar durante los procesos de activación y apoptosis que tienen lugar tras la estimulación del TCR en células T [Desai et al., 1990; Abraham and Weiss, 2004]. El receptor HM1R constituye una herramienta valiosa en este sentido, ya que permite estudiar las respuestas celulares que tienen lugar tras la estimulación de dos receptores diferentes que comparten parte de la cascada de señalización intracelular: activación de PLC y aumento de **DAG** e **IP₃**, pero no conlleva la activación de **proteín tirosin quinasas (PTKs)** llevada a cabo tras la estimulación del TCR. De este modo es posible analizar la contribución relativa de distintas moléculas y mediadores intracelulares tras la estimulación del receptor (TCR o HM1R) y sus consecuencias sobre los procesos de activación y/o apoptosis del linfocito T.

2.8.5 Inducción de la expresión de FasL.

La activación de estas cascadas de señalización (calcio/calcineurina, DAG/Ras/Raf/ERK2 y la ruta DAG/PKC/MAP kinasas) van a culminar con la activación de diferentes factores de transcripción, entre los que destacan NF-AT [Latinis et al., 1997], NF- κ B [Matsui et al., 1998], Egr [Mittelstadt et al., 1999], c-jun y fos (AP-1) [Faris et al., 1998] y c-myc [Brunner et al., 2000]. La activación de estos factores de transcripción da lugar a la inducción de la expresión de una gran variedad de proteínas, entre las que se encuentran diversas citoquinas y sus receptores específicos que están implicados en la activación del linfocito T, como CD69, IL-2 y su receptor IL2-R [Desai et al., 1990, Izquierdo et al., 1996]; así como inducen la expresión del receptor Fas y FasL [Anel et al., 1994; Strasser et al., 1995; Lenardo et al., 1997] (figura 4).

Se ha descrito que la ruta calcio/calcineurina es necesaria para la inducción del ARNm de FasL [Vignaux et al., 1995]: el tratamiento con ciclosporina A (CsA), un inhibidor específico de la calcineurina, inhibe la inducción de FasL tras estimulación del TCR y del HM1R [Anel et al., 1994; Izquierdo et al., 1996]. Sin embargo esta ruta, si bien es necesaria, no es suficiente para la inducción del ARNm de FasL [Latinis et al., 1996]. A su vez, la estimulación de la ruta PLC/DAG/PKC también es capaz de inducir expresión del ARNm de IL-2 y FasL [Desai et al., 1990; Izquierdo et al., 1996]. A su vez, otros estudios indican que tanto la vía Ras/ERK2 como la vía MAPK contribuyen, junto con la vía del calcio/calcineurina, a la regulación transcripcional del gen de FasL [Izquierdo et al., 1995; Latinis et al., 1997, van den Brink et al., 1999].

En resultados previos se había descrito que la estimulación del receptor HM1R con carbacol en la línea celular JHM1-2.2 es suficiente para inducir varias respuestas celulares implicadas tanto en la activación celular mediada por la expresión de IL-2 y CD69 [Desai et al.1990; Izquierdo et al., 1995; Sanjuán et al., 2001], como en la expresión de FasL durante la muerte celular inducida por activación (AICD) [Izquierdo et al., 1996].

2.9 Diacilglicerol quinasa alfa (DGK α).

El segundo mensajero lipídico DAG está implicado en funciones importantes durante la señalización intracelular: induce activación de PKC, y además es un potente activador del intercambiador de nucleótidos de guanina RasGRP, el cual activa a Ras. Además, el DAG y el ácido fosfatídico (PA, producto de la fosforilación del DAG) ocupan un papel central en la biosíntesis de los lípidos fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y triacilgliceroles, por parte del DAG; y fosfatidilserina y fosfatidilinositol por parte del PA. Una vez llevado a cabo su función, el **DAG** es fosforilado a ácido fosfatídico, reacción catalizada por enzimas de la familia de las **diacilglicerol kinasas (DGKs)**. De este modo se regula de manera negativa la acción de este segundo mensajero lipídico. La actividad enzimática DGK ha sido detectada en multitud de tejidos y tipos celulares [revisado en Sakane and Kanoh, 1997]. En 1959 fue descrita por primera vez en cerebro de rata, siendo la isoforma alfa la primera en ser purificada en 1983 [Kanoh et al., 1983]. La familia de las DGKs está compuesta en mamíferos por 9 miembros o isoformas (α , β , γ , δ , η , ϵ , ι , ζ y θ), clasificadas en 5 grupos atendiendo a sus dominios estructurales [Sakane and Kanoh., 1997].

La enzima diacilglicerol quinasa α (**DGK α**) es una DGK de tipo I, que se encuentra expresada en altos niveles en el citosol de los linfocitos T [Sakane et al., 1991]. Estructuralmente la DGK α se compone de 3 regiones: una pareja de dominios de unión a calcio o motivos EF-hands, situados en la región N-terminal, los cuales poseen un papel regulador negativo sobre la actividad de la enzima; una pareja de dominios ricos en cisteína CRM (zinc-fingers), implicados en la localización de la enzima a la membrana plasmática; y la región Carboxi-terminal donde se encuentra el dominio catalítico de la enzima (figura 6).

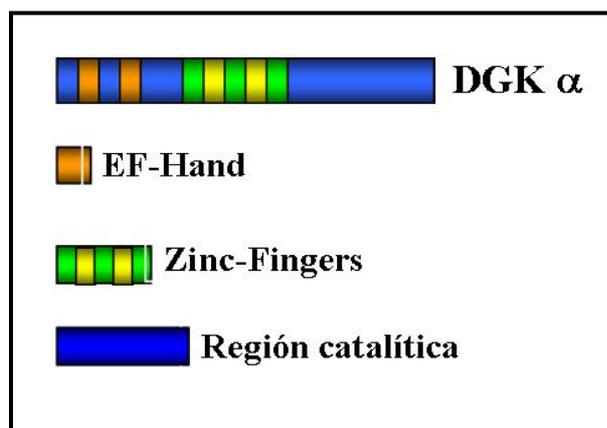


Figura 6. Estructura de la DGK α .

2.9.1 Diacilglicerol quinasa α y señalización a través del TCR.

Como se ha descrito en el apartado 2.8.4, la estimulación del TCR o del HM1R induce un aumento a nivel de membrana plasmática de DAG. Como respuesta a la estimulación de estos receptores se induce la translocación transitoria de la DGK α desde el citosol a la membrana plasmática [Sanjuan et al., 2001]. Una vez en la membrana, la DGK α es la implicada en catalizar la fosforilación de DAG, produciéndose ácido fosfatídico (PA), lo que disminuye los niveles de DAG y evitando de este modo una señalización prolongada a través de este segundo mensajero. La translocación a la membrana plasmática requiere del dominio N-terminal de la DGK α , siendo también responsable de la disociación del enzima de la membrana una vez llevada a cabo su función [Sanjuan et al., 2001]. Se ha descrito que esta translocación a la membrana plasmática y la actividad enzimática del la DGK α está implicada en la atenuación de las señales de activación celular inducidas tras la estimulación del receptor [Sanjuan et al., 2001; Sanjuan et al., 2003].

2.9.2 Diacilglicerol quinasa α y activación celular del linfocito T.

Utilizando este modelo se ha estudiado el papel de la DGK α como modulador de las respuestas de activación celular derivadas de la estimulación de receptor en células T. Durante estas respuestas de activación celular, el aumento en los niveles de DAG está directamente relacionado con la expresión del marcador de activación celular CD69, ya que su expresión es estrictamente dependiente del incremento de DAG en la membrana plasmática [Cebrián et al., 1989]. La activación de la DGK α en respuesta a interleuquina 2 (IL-2), el principal factor de

crecimiento en células T, es necesaria para una transición coordinada de la fase G₁ a la fase S del ciclo celular [Flores et al., 1999]. Además, formas de la DGK α localizadas en la membrana plasmática y que son constitutivamente activas atenúan la expresión en membrana de CD69. A su vez, la inhibición farmacológica de la DGK, así como la expresión de una forma catalíticamente inactiva de la DGK α , inducen señales prolongadas de activación [Sanjuan et al., 2001], las cuales tienen lugar a través de una señalización sostenida a través de RasGRP [Jones et al., 2002]. Por lo tanto, la regulación en los niveles del DAG por parte de la DGK α desempeñan una función importante en la correcta propagación de señales que conllevan a la activación del linfocito T.

Por lo tanto y en resumen de lo descrito en los apartados anteriores, se ha observado que la estimulación del TCR o del HM1R, puede desencadenar dos respuestas celulares bien diferentes en el linfocito T: **activación/proliferación** o **muerte celular por AICD**. Ambos tipos de respuesta presentan efectores, segundos mensajeros y vías de señalización comunes: aumentos del calcio intracelular y del DAG, activación de proteína tirosin quinasa C (PKC), activación de la vía Ras/MAP quinasas (MAPK), etc. En este sentido no está claro si existe una identidad parcial o total entre estas vías de señalización, por lo que el control de la respuesta final, activación o muerte, debe basarse en un balance estricto entre las señales positivas y negativas que controlan cada una de estas vías. Este balance determinaría, en última instancia, tanto la magnitud como la especificidad de la respuesta final que se lleva a cabo. En este sentido se ha estudiado en el presente trabajo la posible implicación de la ruta del DAG/DGK α , la cual está implicada en el control de las respuestas que dan lugar a la activación del linfocito T, en el control de la inducción de la muerte celular inducida por activación (AICD) en el linfocito T.

2.10 Fas/FasL y AICD: Implicaciones patológicas.

Como se ha comentado anteriormente, el sistema Fas/FasL y la AICD desempeñan una importante función como mecanismo de control y regulación de la homeostasis del sistema inmune. A continuación, se resumen las principales implicaciones patológicas derivadas de alteraciones en el sistema Fas/FasL, así como en la muerte celular inducida por activación o AICD en el linfocito T.

2.10.1 Enfermedades autoinmunes y el sistema Fas/FasL.

La función biológica de Fas/FasL ha sido estudiada en ratones con pérdida de función para estas dos proteínas, identificándose varias mutaciones recesivas para Fas: ratones *lpr* (linfoproliferación); y para FasL: ratones *gld* (enfermedad linfoproliferativa generalizada). Estas mutaciones causan desórdenes complejos en el sistema inmune, como linfadenopatías, esplenomegalia, desórdenes de carácter autoinmune e inflamatorio. Se produce una acumulación de linfocitos atípicos, los cuales no expresan los co-receptores CD4 y CD8, y producción de autoanticuerpos, que incluyen anticuerpos anti-ADN y el factor reumatoide [Cohen et al., 1991; Feldmann, 2001; Li-Weber and Krammer, 2003]. En el caso de humanos se ha descrito el síndrome de Canale-Smith y el síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS) tipo Ia, con pérdida de carácter heterocigótico de función de Fas; que en el caso de disfunción de FasL es denominado ALPS de tipo Ib. Los niños con esta disfunción muestran linfadenopatía masiva no maligna, hepatoesplenomegalia, hipergammaglobulinemia, poblaciones aumentadas y alteradas de células T activadas, así como una serie de alteraciones autoinmunes [Fisher et al., 1995]. En el caso de disfunción de Fas, la mutación observada conlleva la delección del dominio de muerte, de modo que las células T no sufren AICD [Rieux-Laucat et al., 1995; Siegel et al., 2000^b].

Fallos en la AICD podrían estar implicados en enfermedades autoinmunes órgano-específicas de tipo crónico, como es el caso de la artritis reumatoide, miocarditis, tiroiditis de Hashimoto, diabetes mellitus dependiente de insulina y en la esclerosis múltiple [De Maria and Testi, 1998]. Un fallo en AICD explicaría la persistencia de las células T activadas infiltradas en el tejido, manteniéndose en el tiempo el proceso inflamatorio [Feldmann, 2001] así como la destrucción de tejido mediada por linfocitos T citotóxicos..

2.10.2 Mantenimiento del privilegio inmune.

Aquellos tejidos donde se ha de evitar un proceso inflamatorio y el daño tisular subsiguiente, como son la cornea, el cerebro, placenta y la testis, expresan constitutivamente FasL. De esta manera se evita la acción de linfocitos infiltrados en el tejido, los cuales van a ser eliminados por apoptosis vía Fas [Griffith et al., 1995; Bonfoco et al., 1998]. En el caso de los ratones *gld* (con disfunción de FasL) el trasplante de cornea es rechazado, frente a la supervivencia del trasplante observado en los ratones salvajes (“*wild type*”) [Stuart et al, 1997]. Estos resultados indicarían que el FasL expresado en la cornea probablemente podría ser el responsable del éxito observado durante los trasplantes de cornea en humanos.

2.10.3 El sistema Fas/FasL y su implicación en cáncer.

Los defectos en la regulación de apoptosis podrían constituir uno de los factores que pueden favorecer la transformación neoplásica [Thompson et al., 1995]. La pérdida de función del receptor Fas se ha observado en diversos linfomas y mielomas [Robertson et al., 1995]. En estos pacientes se observan síntomas autoinmunes con una alta presencia de anticuerpos. El defecto en apoptosis mediada por Fas se puede llegar a considerar como uno de los factores a tener en cuenta durante los primeros pasos de la génesis tumoral, ofreciendo un factor de resistencia y supervivencia a las células tumorales. En este sentido se ha sugerido que Fas pudiera considerarse como un gen supresor de tumores [Peng et al., 1996].

La expresión constitutiva de FasL se ha detectado en diversos tumores, como carcinoma de colon, hepatocarcinomas y melanomas [Hahne et al., 1996; O'Connell et al., 1996; Strand et al., 1996], siendo uno de los mecanismos que se ha propuesto utilizado por la célula tumoral para evadir el ataque del sistema inmune, y que contribuiría al mantenimiento del privilegio inmune del tumor [revisado en O'Connell et al., 2001].

2.10.4 Tratamiento de tumores: apoptosis inducida por Fas/FasL.

El sistema Fas/FasL también está implicado en la apoptosis inducida por el tratamiento de distintas líneas tumorales con drogas utilizadas en la quimioterapia del cáncer. El tratamiento de líneas tumorales leucémicas, hepatocarcinoma, hepatoblastoma, líneas celulares de cáncer gástrico y de carcinoma de colon con drogas antitumorales de muy diverso mecanismo de acción (metrotexato, ciclofosfamida, doxorubicina, etopósido, mitomicina) inducen regulación positiva de los mensajeros de Fas y FasL, y apoptosis mediada por la interacción de ambos [Friesen et al., 1996; Kasibhatla et al., 1998].

2.10.5 Fas/FasL y la apoptosis inducida en linfocitos por el HIV.

La infección con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) está asociada con un progresivo descenso en la población de linfocitos T CD4⁺. Se ha detectado en pacientes infectados con HIV un aumento en la expresión de Fas y mayores niveles de FasL en células T, observándose una mayor susceptibilidad a apoptosis mediada por Fas [Debatin et al., 1994; Baumler et al., 1996 Xu et al., 1997]. Estas observaciones sugieren que la desregulación del sistema Fas/FasL juega un papel importante durante la eliminación de células T inducida por HIV.

2.11 Conclusión.

El sistema Fas/FasL y la muerte celular inducida por activación (AICD) están implicados de una manera importante en la modulación de la función y la homeostasis del sistema inmune, así como en multitud de funciones fisiológicas. La identificación del sistema FasL y de Fas ha facilitado la caracterización de las principales rutas de señalización de apoptosis en linfocitos T. La caracterización de este sistema reveló que la homeostasis del sistema inmune, así como la de otros tejidos está controlada por un factor inductor de muerte, estando algunas patologías causadas por una alteración en este sistema. Esta consideración no excluye que puedan ser identificadas nuevas rutas de inducción de apoptosis que permitan desarrollar nuevos tratamientos terapéuticos más específicos contra las enfermedades y patologías que afectan al sistema inmune.

3. Materiales y métodos.

3.1 Anticuerpos utilizados.

- Anticuerpo monoclonal anti- β -actina, clon AC-15 (Sigma-Aldrich).
- Anticuerpo monoclonal anti-CD3, clon UCHT1 (BD-Pharmingen).
- Anticuerpo monoclonal anti-CD4, clon RPA-T4 marcado con FITC (BD-Pharmingen).
- Anticuerpo monoclonal anti-CD8, clon HIT8a marcado con PE-Cy5 (BD-Pharmingen).
- Anticuerpo monoclonal anti-CD28, cedido por Dr. Moretta (Instituto Gianina Gaslini, Genova, Italia)
- Anticuerpo monoclonal anti-CD45, cedido por Dr. Sanchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid).
- Anticuerpo monoclonal anti-CD63, clon NKI-C-3 (Oncogene).
- Anticuerpo monoclonal anti-CD63, clon H5C6 marcado con R-PE (BD-Pharmingen).
- Anticuerpo monoclonal anti-CD69, clon FN50 marcado con Cy-Chrome (BD-Pharmingen).
- Anticuerpo monoclonal anti-citocromo c, clon 7H8.2C12 (BD-Pharmingen).
- Anticuerpo monoclonal (mAb) citotóxico anti-Fas (CD95), clon CH-11 (MBL).
- Anticuerpo monoclonal anti-Fas (CD95) DX2 (BD-Pharmingen), IgG que reconoce específicamente el receptor Fas humano. No posee actividad citotóxica al no producir entrecruzamiento del receptor Fas. Bloquea la interacción con FasL.
- Anticuerpo monoclonal anti-Fas Ligand (CD95L) NOK-1 (BD-Pharmingen), se une a FasL, bloqueando su interacción con el receptor de Fas.
- Anticuerpo monoclonal anti-Fas Ligand (CD95L) G247-4 (BD-Pharmingen), utilizado en inmunotransferencia (Western-blotting).
- Anticuerpo de ratón MsIgG, utilizado como control inespecífico (Coulter).
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-Fas Ligand (CD95L) Q-20 y péptido bloqueante (Santa Cruz Biotechnology).
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-GFP (Living Colors-Clontech).
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-Giantina, clon PRB-114C (Covance).
- Anticuerpo monoclonal anti-Golgi58K, clon 58k-9 (Sigma).

- Anticuerpo monoclonal anti-DGK α , cedido por Dr. H. Kanoh (Universidad Medica de Sapporo, Japón).
- Anticuerpo monoclonal anti-lamp 1, clone 25 (BD-Pharmingen).
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-PKD, clone D-20 (Santa Cruz Biotechnology).
- Anticuerpo policlonal anti-TGN46 y anticuerpo monoclonal anti-TGN38, cedidos por Dr. G. Banting (Universidad de Bristol, Reino Unido).
- Anticuerpo secundario de cabra dirigido contra IgGs de ratón o conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Dako).
- Anticuerpo secundario de cabra dirigido contra IgGs de ratón o conejo conjugado con FITC o Cy5 (Jackson Immunoresearch Inc.).
- Anticuerpo de rata dirigido contra IgG₁ de ratón conjugado con bolas magnéticas (Miltenyi Biotec).

3.2 Reactivos utilizados.

- Acido clorhídrico (Merck).
- Acido etilendiamino tetraacético, EDTA (Sigma-Aldrich).
- Acido p-coumárico (Merck).
- Acrilamida-Bis 30% (Sigma-Aldrich).
- Actinomicina D (Sigma-Aldrich).
- 7-Amino-Actinomicina D (Sigma-Aldrich).
- Anexina V-PE (Phycoerythrine) (BD-Pharmingen).
- Anexina V binding buffer (BD-Pharmingen).
- Persulfato de amonio, APS (Sigma-Aldrich).
- Azida sódica (Sigma-Aldrich).

- Carbamyl colina (Carbacol) (Sigma-Aldrich).
- Ciclosporina A (Sigma).
- Citrato sodico monohidrato (Merck).

- DGK inhibitor II R59949 (Calbiochem).
- Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich).
- 1,2-dioctonoil-*sn*-glicerol , DOG (Sigma-Aldrich).
- Ditioneitol, DTT (GibCo BRL-Invitrogen).
- Dodecil sulfato sódico, SDS (Fluka Chemie).
- Dual Luciferasa Reporter Assay Kit (Promega).

- Formaldehído (Fluka Chemie).
- Medio para separación de linfocitos Fi

- Glicerol (Fluka Chemie).
- Glicina (Merck).
- GM6001, inhibidor de amplio espectro de metaloproteinasas de la matriz extracelular (Calbiochem).
- Geneticina, G418 (GibCo).

- HEPES (Merck).

- Ionomicina (Ionóforo de calcio) (Sigma-Aldrich).
- Ioduro de propidio (Sigma-Aldrich).
- Interleuquina-2 recombinante humana (Glaxo IMB).

- Leche en polvo desnatada (Nestle).
- Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen).
- Luminol (Sigma-Aldrich).

- Marcadores proteicos de peso molecular (Promega).
- Material diverso de cultivo celular: placas, botellas y tubos (BD-Falcon).
- Medio de cultivo celular RPMI 1640 (GibCo-Invitrogen).
- Medio Eagle modificado por Dulbecco, DMEM (GibCo-Invitrogen).
- Medio de cultivo celular OptiMEM 1, (GibCo-Invitrogen).

- Membranas de nitrocelulosa Hybond (Amersham Biosciences).
- Metanol (Merck).
- 2-β Mercaptoetanol (Merck).
- Mowiol (Sigma-Aldrich).
- Nonidet P40 (Fluka Chemie).

- Papel de filtro Watman (Watman International Ltd.).
- Películas de auto radiografía Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences).
- Penicilina-Estreptomicina (GibCo-Invitrogen).
- Percoll/RediGrad para gradientes de densidad (Amersham Biosciences).
- 1,10-phenantroline (Merck).
- Phitohemaglutinina-M, PHA-M (Sigma-Aldrich).
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-Aldrich).
- PMSF (Sigma-Aldrich).
- Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich).
- Proteína G inmovilizada en agarosa (Sigma-Aldrich).

- Reactivo de Bradford (BioRad).
- RNasa A (Sigma-Aldrich).
- Saponina (Sigma-Aldrich).
- Solución intensificadora de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences).
- Estaurosporina (Sigma-Aldrich).
- Suero fetal bovino, FBS (GibCo-Invitrogen).
- Tampón de Laemmli (Biolabs).
- Tampón Tris (Merck).
- TEMED (Sigma-Aldrich).
- Tween-20 (Sigma-Aldrich).
- Tripsina-EDTA (GibCo).
- Trypan Blue (Sigma-Aldrich).
- Triton X-100 (Merck).

- z-Val-Ala-DL-Asp-fluoremetylketone, z-VAD.fmk (Bachem AG).

3.4 Metodología Experimental.

3.4.1 Cultivo de las líneas celulares Jurkat E6.1 y JHM1- 2.2.

La línea celular Jurkat, clon E6.1 (JE6.1) deriva de una leucemia linfoblástica aguda de tipo T [Weiss et al., 1984], y procede de la American Type Culture Collection (ATCC, USA). Esta línea celular fue cultivada en suspensión en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10% , 1 mM L-glutamina, 10 mM HEPES, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomicina (medio RPMI completo).

La línea celular JHM1-2.2 fue generada por transfección estable del receptor muscarínico tipo I humano (HM1) en la línea celular Jurkat (Desai et al. 1990). Esta línea celular fue cultivada en suspensión en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) 5% , 1 mM L-glutamina, 10 mM HEPES, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (medio DMEM completo). Como medio de selección para mantener la expresión del receptor muscarínico el medio de cultivo fue suplementado con 0,5 µg/ml del antibiótico G418.

Ambas líneas celulares expresan de forma constitutiva CD2, CD3, CD4 [Weiss et al., 1984], el receptor Fas y son sensibles a la muerte celular inducida por activación (AICD) inducida por la estimulación del receptor de células T (TCR) [Dhein et al., 1995].

La viabilidad celular y la expresión de marcadores celulares de membrana plasmática fue controlada periódicamente para evitar la deriva clonal debida al cultivo in vitro. La ausencia de contaminación por micoplasmas en los cultivos celulares, así como en los medios de cultivo utilizados fue analizada periódicamente mediante la técnica de PCR.

3.4.2 Cultivo de la línea celular HEK293T y células Hela.

Las células humanas embrionarias de riñón (HEK) 293T y la línea celular de origen epitelial Hela son células adherentes, y fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) 5% , 1 mM L-glutamina, 10 mM HEPES, penicilina-estreptomicina (100 U/ml and 100 µg/ml).

3.4.3 Obtención y cultivo primario de linfocitos T humanos aislados de sangre periférica: generación de blastos T.

Los linfocitos T humanos fueron obtenidos a partir de sangre venosa periférica de donantes sanos mediante gradiente de densidad. Para ello se recogieron 40 ml de sangre sobre un tubo que contenía 1.25 ml de EDTA 0.2M, pH 7.4 como agente anticoagulante. Una vez obtenida la sangre se diluyó en proporción 1:1 con medio RPMI completo sin suero y la mezcla se añadió cuidadosamente sobre una solución Ficoll-Paque Plus, manteniendo una proporción de sangre-RPMI:Ficoll-Paque de 3:1. A continuación la preparación fue centrifugada a 800 x g durante 30 minutos, a 20°C sin freno. Este procedimiento permite una separación de las células mononucleares en función de su densidad, que forman un “anillo” en la interfase entre el plasma sanguíneo y el Ficoll-Paque, mientras que los eritrocitos y neutrófilos se depositan en el fondo del tubo. Mediante aspiración con pipeta Pasteur de este “anillo”, se recogieron las células mononucleares en un tubo estéril. Para eliminar el Ficoll-Paque contenido en la fracción recogida, las células fueron sometidas a dos lavados con 30 ml de medio RPMI completo sin suero, centrifugando a 700 x g durante 10 minutos. Finalmente se contaron las células mononucleares y se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 cel/ml en medio RPMI completo.

A partir de estas células se generaron blastos T por activación de los linfocitos T con el mitógeno phitohemaglutinina PHA-m a una dosis de 10 µg/ml. Las células fueron mantenidas en cultivo durante 3 días sin proceder al cambio de medio para así favorecer el proceso de activación, proliferación y transformación blástica. A partir del tercer día de activación con PHA-m los blastos T activados fueron diluidos con medio RPMI completo suplementado con interleuquina-2 recombinante humana a una concentración de 20 ng/ml (día 0), para inducir la expansión clonal de los blastos T. La IL-2 es un factor de crecimiento que inicia la progresión del ciclo celular desde la fase G₀ a fase S, al interactuar con el receptor IL-2R. El medio de cultivo fue diluido 1/3 con medio RPMI completo + IL-2 cada dos días y los blastos T fueron cultivados durante un máximo de 10 días.

3.4.4 Mantenimiento de los cultivos celulares.

Las células se cultivaron a 37°C en atmósfera saturada de humedad, con un 5% de CO₂ en un incubador termostatzado. Las manipulaciones de las células y medios de cultivo se llevaron a cabo en campanas de flujo laminar vertical en condiciones estériles.

Excepto cuando se indique de otra forma, los experimentos, se llevaron a cabo en medio completo RPMI o DMEM. Para ello las células fueron centrifugadas a 700 x g durante 5 minutos, el medio de cultivo fue decantado y las células se resuspendieron en medio de cultivo fresco a una concentración de 1×10^6 cel/ml. A los diferentes tiempos experimentales estudiados, las células fueron recogidas y centrifugadas a 700 x g durante 5 minutos para eliminar el medio de cultivo (lavado de las células). A continuación el pellet de células fue resuspendido en PBS-0.1% azida sódica a 4°C. El uso de azida sódica y una temperatura de 4°C durante pasos del desarrollo experimental fue utilizado para evitar modulaciones derivadas del proceso de recogida y posterior tratamiento de las células. A continuación las células fueron centrifugadas de nuevo (lavado) para su posterior tratamiento según el análisis a realizar.

3.4.5 Análisis de muerte celular por apoptosis.

Para el análisis de muerte celular se utilizó como marcador de fases tempranas de apoptosis unión de Anexina V marcada con ficoeritrina (Anexina V-PE). La Anexina V es una proteína que se une de forma específica y con alta afinidad al fosfolípido fosfatidilserina, cuya translocación/exposición de la cara interna hacia la cara externa de la membrana plasmática es uno de los primeros eventos que tienen lugar durante el proceso apoptótico, precediendo a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. Como marcador de fases tardías de apoptosis/necrosis se analizó permeabilidad al soluto de bajo peso molecular 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD). El 7-AAD es un compuesto fluorescente que se une al ADN y que no puede atravesar la membrana plasmática de células viables o células que están en las primeras etapas de apoptosis (donde la integridad de la membrana plasmática se mantiene). Las células fueron tratadas en medio completo DMEM o RPMI (según el tipo celular) con los diferentes estímulos durante el tiempo indicado. Las células se recogieron y se centrifugaron a 700 x g durante 4 minutos. El sobrenadante de cultivo fue aspirado y el pellet de células fue resuspendido en PBS, se centrifugó de nuevo para eliminar restos de rojo fenol del medio de cultivo (lavado de las células). El pellet de células lavado fue incubado durante 10 minutos en oscuridad y a 4°C con una pre-mezcla de Anexina V-PE (2 μ l/pto) y 7-AAD (1 μ g/ml) en tampón de unión para Anexina V ("*Binding Buffer*"). Posteriormente las células fueron analizadas por citometría de flujo en un citómetro Epics XL-MCL Beckman Coulter (láser de excitación de 488 nm y cuatro líneas de detección: FL1 505-545 nm, FL2 555-600 nm, FL3 605-635 nm y FL4 660-700 nm). El marcaje con Anexina V-PE fue analizado por aumento de fluorescencia medida en la línea de detección FL2 y la permeabilidad a 7-AAD por aumento en la fluorescencia medida en la línea de detección FL4.

Para analizar la contribución del sistema Fas-FasL en la muerte celular inducida en cada condición experimental se realizaron experimentos en paralelo en los cuales las células fueron pre-incubadas durante 30 minutos con:

- i) Anticuerpo anti-Fas DX2 (0.5 µg/ml), el cual se une al receptor Fas humano bloqueando su interacción con FasL,
- ii) Anticuerpo anti-Fas Ligand NOK-1 (0.5 µg/ml), que se une a FasL bloqueando su interacción con el receptor de Fas,
- iii) Ciclosporina A (200 ng/ml), inhibidor de la expresión del gen para FasL.

3.4.6 Análisis de degradación de ADN en células JHM1-2.2 por citometría de flujo.

El yoduro de propidio es un compuesto fluorescente que se intercala en la doble cadena de los ácidos nucleicos emitiendo en rojo lejano (600 nm) cuando es excitado a 488 nm. Para el análisis de la degradación de ADN, las células fueron fijadas con etanol, tratadas con RNase A para digerir el ARN de doble cadena y posteriormente teñidas con yoduro de propidio y analizadas por citometría de flujo. Mediante el análisis del contenido en ADN (cuantificado como intensidad de fluorescencia del yoduro de propidio) se pueden distinguir las diferentes cantidades de ADN presentes en la célula según el estado celular en el que ésta se encuentre: fase G₀/G₁, fase de S o fase G₂/M del ciclo celular, o fase de degradación del ADN subG₀/G₁.

1x10⁶ de células JHM1-2.2 por punto experimental fueron recogidas y centrifugadas a 800 x g durante 4 minutos. El sobrenadante fue eliminado y el pellet de células fue lavado con PBS-0.1% azida sódica a 4^oC. Las células fueron fijadas durante 5 minutos a 4^oC añadiendo 900 µl de etanol al 70%. Las células fijadas fueron lavadas dos veces en PBS. Para extraer los fragmentos de ADN que se encuentren en el citosol como consecuencia de su degradación se añadió 1 ml/pto de tampón de extracción de ADN (0.2 M Na₂HPO₄ / 0.1 M ácido cítrico, pH 7.8). Las células fueron incubadas en este tampón durante 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugadas a 800 x g 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado y se resuspendió el pellet en 400 µl de solución de tinción de ADN (PBS-RNasa 100 µg/ml-Ioduro de propidio 20 µg/ml). Las células fueron incubadas durante 30 minutos a 37 ^oC y la fluorescencia del yoduro de propidio fue analizada mediante citometría de flujo en el canal FL3 (605-635 nm).

3.4.7 Vectores de expresión utilizados.

En los experimentos de transfecciones transitorias en célula JHM1-2.2 o en células HEK293T se utilizaron diferentes vectores de expresión basados en el plásmido pEF4/Myc-HisB. Las diferentes proteínas a expresar fueron subclonadas en este vector.

- **pEF4/Myc-His B**, vector vacío, no codifica para ninguna proteína eucariota. Este vector fue utilizado como control de transfección. Este vector de expresión contiene el promotor para el factor humano de elongación 1 alfa (hEF-1 α), que permite la expresión de altos niveles de proteína en un amplio rango de tipos celulares.
- **pEF-GFP**, vector que codifica para la proteína verde fluorescente GFP.
- **pEF-GFP-DGK α** , vector que codifica para la proteína de fusión GFP-Diacilglicerol quinasa α en su forma salvaje (wild type).
- **pEF-GFP-DGK α Kd**, codifica para la proteína de fusión GFP-Diacilglicerol quinasa α en su forma catalíticamente inactiva (“*Kinase Dead*”). Este plásmido fue generado sustituyendo la glicina 432 por alanina.
- **pEF-GFP- Δ (1–192)-DGK α** , codifica para la proteína de fusión GFP-Diacilglicerol quinasa α con una defeción de 192 aminoácidos del dominio N-terminal.
- **pEF-Myr-GFP-DGK α** , codifica para la proteína de fusión GFP-Diacilglicerol quinasa α modificada en el extremo N-terminal de GFP por adición de un lugar de miristoilación. Esta modificación localiza la GFP-DGK α en la membrana plasmática.

Los plásmidos para las construcciones GFP-DGK α fueron amablemente cedidos por la Dra. Isabel Mérida (Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid).

- **pEF-p35**, codifica para la proteína viral anti-apoptótica inhibidora de caspasas p35.
- **pBXhFasL**, vector que contiene el ADNc para la proteína humana FasL (CD95L), cedido por el Dr. Nagata (Osaka Bioscience Institute, Japón).

- **pEF4hFasL**, vector de expresión para la proteína humana FasL, generado a partir de la digestión con Xba I del plásmido pBXhFasL y posterior subclonación del ADNc para hFasL en el vector de expresión pEF4/Myc-His B.
- **pEF-GFP-PKD**, vector de expresión para la proteína de fusión GFP-Proteín quinasa D, cedido por la Dra. Doreen Cantrell (University of Dundee, Reino Unido)

3.4.8 Transfecciones celulares por electroporación.

13×10^6 de células JHM1-2.2 en crecimiento exponencial (a una concentración de 450.000 cel/ml) fueron transfectadas de forma transitoria utilizando la técnica de electroporación (Gene Pulser II, Bio-Rad). La electroporación se llevo a cabo en cubetas de electroporación de 0.4 cm en un volumen de 600 μ l, 20 μ g de ADN, voltaje de 230 V y capacitancia de 975 μ F. Una vez electroporadas las células fueron diluidas en 10 ml de medio DMEM completo. Previamente a la realización de los experimentos las células transfectadas fueron sometidas a un gradiente de densidad en Ficoll-Paque Plus para eliminar las células muertas y restos celulares presentes en el medio de cultivo como consecuencia de la electroporación. Para ello las células fueron añadidas cuidadosamente sobre una solución Ficoll-Paque Plus, manteniendo una proporción de células:Ficoll-Paque de 3:1. A continuación la preparación fue centrifugada a 800 x g durante 30 minutos, a 20⁰C sin freno. Este procedimiento permite una separación de las células en función de su densidad. Las células muertas y restos celulares se depositan en el fondo del tubo, mientras que las células viables permanecen en un “anillo” en la interfase entre el medio de cultivo y el Ficoll-Paque. Mediante aspiración con pipeta Pasteur del “anillo” de células, se recogieron las células viables en un tubo estéril. Para eliminar el Ficoll-Paque contenido en la fracción recogida las células fueron sometidas a dos lavados con 30 ml de medio DMEM sin suero, centrifugando a 700 x g durante 5 minutos. Finalmente se contaron las células y se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 cel/ml en medio DMEM completo, dejándose en estas condiciones al menos 2 horas antes de la realización del experimento.

3.4.9 Transfección de células HEK293T.

Las transfecciones de células HEK293T fueron llevadas a cabo utilizando el método de transfección con Lipofectamine 2000 según las instrucciones dadas por el fabricante.

3.4.10 Análisis de expresión de las diferentes construcciones utilizadas en las transfecciones transitorias.

Se realizó un análisis de los niveles de expresión de las diferentes construcciones con GFP a las 24, 48 y 72 horas post-transfección. Para ello las células transfectadas fueron recogidas, centrifugadas durante 5 minutos a 700 x g y lavadas una vez con PBS. El pellet de células fue resuspendido en tampón PBS-Ioduro de propidio (PI, 200 ng/ml). La permeabilidad a ioduro de propidio (PI) fue utilizada como marcador de células no viables. El análisis es llevado a cabo por citometría de flujo (Coulter Epics XL-MCL), analizando la emisión de fluorescencia verde (505-545 nm, FL1) en aquellas células que excluyen PI (605-635 nm, FL3). El nivel máximo de expresión de GFP fue observado a las 48h post-transfección, utilizándose este tiempo para los experimentos a realizar. La expresión de las construcciones GFP-DGK α fue también analizada mediante *Western Blotting* y microscopía de fluorescencia.

3.4.11 Medida de la concentración de proteína.

La proteína total de los extractos celulares a analizar mediante *Western Blotting* se cuantificó según el método de Bradford, basado en un desplazamiento del máximo de absorción (de 465 a 595 nm) del colorante azul de Coomasie G en presencia de proteína.

3.4.12 Análisis de proteínas mediante inmunodetección (*Western Blotting*).

Las células (2×10^6 por punto experimental) se recogieron y se lavaron dos veces con PBS a 4°C y fueron lisadas a 4°C durante 10 min en tampón de lisis RIPA suplementado con 0.1 mM de PMSF y PIC. El lisado celular fue centrifugado a 15.500 x g durante 5 min. El sobrenadante fue recogido y se midió la cantidad de proteína contenida en el sobrenadante mediante el método de Bradford. Las muestras (25 μ g proteína/pto en el caso de lisados celulares totales) se mezclaron con tampón de Laemmli (60 mM Tris, 10% glicerol 2% SDS, 0.002% azul de bromofenol, pH 6.8) con DTT (20 mM) y fueron calentadas 5 minutos a 100°C. Para la detección de CD63, las muestras se mezclaron con tampón de Laemmli sin DTT (condiciones no reductoras). La separación de las proteínas en función de su peso molecular se realizó por electroforesis en geles de 10% poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de las diferentes muestras. La electroforesis fue llevada a cabo en tampón de electroforesis (25

mM Tris, 0.2 M glicina, 0.1% SDS) durante 2 horas a 75 V. Posteriormente las proteínas separadas fueron transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se llevo en condiciones húmedas durante 1.5 horas a 350 mA en tampón de transferencia. Una vez acabada la transferencia las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con una solución de PBS al 5% (p/v) de leche desnatada en polvo, 0.2 % Tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente o a 4⁰C toda la noche. Se realizaron 4 lavados de las membranas (10 minutos cada uno) y posteriormente fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con los diferentes anticuerpos primarios en tampón PBS al 0,5 % (p/v) de leche desnatada, 0,2 % Tween-20. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal de conejo anti-FasL Q-20, anticuerpo policlonal de conejo anti-GFP, anticuerpo monoclonal anti- β -actina, anticuerpo monoclonal anti-CD63, anticuerpo monoclonal anti-CD28, anticuerpo monoclonal anti-CD45, anticuerpo monoclonal anti-lamp1, anticuerpo monoclonal anti-Golgi58k, anticuerpo monoclonal anti-DGK α , y anticuerpo policlonal de conejo anti-PKD . Seguidamente las membranas fueron lavadas 3 veces y a continuación se procedió a su incubación 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-Ig de conejo o anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa de rabano (HRP). Las membranas se lavaron 5 veces y posteriormente se procedió a la detección de los inmunocomplejos a traves una reacción de quimioluminiscencia utilizando reactivos ECL (Amersham-Pharmacia) y revelado en películas autorradiográficas. El posterior análisis de las diferentes membranas reveladas se realizo por densitometría utilizando para ello el software Quantity One de Bio-Rad.

3.4.13 Análisis por citometría de flujo de antígenos expresados en la membrana plasmática.

La técnica de citometría de flujo y la existencia de anticuerpos monoclonales hacen posible la identificación de determinadas moléculas/proteínas en la superficie de las células, debido a la capacidad que tienen los anticuerpos de unirse covalentemente a determinados fluorocromos, ya sea de forma directa o indirecta.

1×10^6 de células por punto experimental fueron recogidas, centrifugadas a 700 x g durante 3 minutos y lavadas con PBS-0.5% BSA-0.1% azida sódica. A continuación, las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos a estudio: anticuerpo monoclonal anti-human CD3, anticuerpo monoclonal anti-human CD69-R-PE, anticuerpo monoclonal anti-human CD63-PE, anticuerpo monoclonal anti-human Fas (DX2), anticuerpo monoclonal anti-human FasL (NOK1), anticuerpo monoclonal anti-human CD4-

FITC y anticuerpo monoclonal anti-human CD8-PE-Cy5 diluidos en PBS- 0,5 %BSA -0,1% azida sódica. Como control isotípico de especificidad de los anticuerpos se utilizó anticuerpo Ms IgG. Las células fueron lavadas 3 veces con el mismo tampón, y en el caso de anticuerpos conjugados con fluorocromo (CD4-FITC, CD8-PE-Cy5, CD63-PE y CD69-Cy-Chrome) las muestras fueron lavadas dos veces con PBS, resuspendidas en PBS y analizadas directamente en el citómetro de flujo. En los puntos marcados con anticuerpos no conjugados con fluorocromo (CD3, DX2 y FasL) las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo de cabra F(ab)₂ anti-ratón marcado con FITC diluido en PBS-5% BSA-0.1% azida. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS- 0,5 %BSA -0,1% azida sódica, una vez con PBS, fueron resuspendidas en PBS y analizadas por citometría de flujo.

3.4.14 Análisis de la morfología celular por microscopía de transmisión.

1×10^6 células JHM1-2.2 fueron añadidas directamente sobre placas de cultivo de 35 mm con fondo de cristal en medio DMEM completo, se dejaron en el incubador durante 1 hora y fueron estimuladas con los diferentes estímulos. A los diferentes tiempos de inducción se tomaron fotografías de transmisión utilizando la técnica de Nomarski en un microscopio Nikon ECLIPSE TE 2000U usando un objetivo Plan Apo NA 1.4 60x.

3.4.15 Análisis por microscopía confocal de fluorescencia.

Las células fueron recogidas a los diferentes tiempos indicados, se centrifugaron 5 minutos a 700 x g, el sobrenadante fue eliminado y el pellet de células fue incubado con solución de fijación (PBS-PFA 4%-10 mM HEPES pH 7.3) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células fijadas fueron lavadas dos veces con PBS-10 mM HEPES para retirar el PFA. A continuación las células fueron sometidos a una incubación de 5 minutos con PBS-NH₄Cl 50 mM para eliminar la autofluorescencia de las células y posteriormente se lavaron con PBS-10 mM HEPES. Para visualizar los núcleos las células fueron incubadas durante 20 minutos con 7-AAD (4 µg/ml) en PBS-0.1% TritonX-100, lavadas con PBS-10 mM HEPES, se resuspendieron en Mowiol y fueron montadas sobre cristales de fluorescencia. Se analizó la fluorescencia verde (GFP) utilizando excitación con un láser Argón (488 nm) y la fluorescencia roja (7-AAD) excitando la muestra con láser HeNe (543 nm).

En los marcajes intracelulares por inmunofluorescencia las células en el paso de incubación con PBS-NH₄Cl 50 mM fueron lavadas con PBS-10 mM HEPES y bloqueadas durante una hora con PBS-5% BSA-0.1 % saponina a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas tres veces en solución de permeabilización (PS) PBS-0.5%BSA-0.1% saponina-15 mM glicina-10 mM HEPES, y a continuación fueron incubadas con los diferentes anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente: anticuerpo monoclonal anti-CD63 (NKI-C-3), anticuerpo policlonal anti-FasL (Q-20), anticuerpo monoclonal anti-Giantina, anticuerpo monoclonal TGN38, anticuerpo policlonal anti-TGN46 y anticuerpo monoclonal anti-LBPA. Las células fueron lavadas cinco veces con solución PS y posteriormente fueron incubadas 1 hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario diluido en solución PS (anticuerpo de cabra F(ab)₂ anti-ratón o anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con FITC, o conjugado con Cy5 en el caso del marcaje por inmunofluorescencia en células transfectadas con GFP). Las células fueron lavadas cinco veces con solución PS y dos veces con PBS-10 mM HEPES. Se realizó un último lavado con H₂O₂ milliQ y las células fueron montadas en Mowiol sobre cristales para su posterior análisis en el microscopio. Las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal Bio-Rad 2100 Nikon ECLIPSE TE 2000U usando un objetivo Plan Apo NA 1.4 60x. La fluorescencia verde (GFP o FITC) fue analizada utilizando excitación con láser Argón (488nm) y la fluorescencia roja (Cy5) excitando la muestra con láser Diodo Rojo (635 nm). Para reducir un posible solapamiento en la emisión de fluorescencia la señal verde y roja fueron adquiridas en modo secuencial. Las células fueron observadas en 15 planos focales sucesivos e imágenes de secciones ópticas de 0.4 μm fueron adquiridas con un diámetro de iris de 1.6 mm. No se observó marcaje inespecífico cuando las células fueron incubadas únicamente con los anticuerpos secundarios. Las imágenes digitales adquiridas y el análisis de colocalización fue llevado a cabo utilizando el software LaserSharp2000 (BioRad).

3.4.16 Ensayo dual de actividad de gen reportero de luciferasa.

Para los ensayos de análisis de inducción de los diferentes genes a estudio se utilizó la técnica de ensayo dual de actividad de gen reportero de luciferasa. Esta técnica esta basada en la emisión de luminiscencia como consecuencia de la actividad enzimática de la luciferasa de *Renilla reniformis* y de la luciferasa de *Photinius pyrali*, luciferasas codificadas por dos vectores de expresión diferentes.

Para ello las células JHM1-2.2 fueron co-transfectadas por electroporación con los siguientes vectores de expresión:

- Un vector para la luciferasa de *Renilla* pRL-TK, que se encuentra bajo un promotor constitutivamente activo (promotor para la timidin kinasa del virus herpes simplex). Este vector es usado como “reportero” control.
- un vector inducible que contiene el gen reportero para la luciferasa de *Photinus pyralis* bajo el promotor del gen a estudio, en este caso:
 - i) pLuc-486FasL, vector de expresión bajo el control de los primeros 486 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio del gen humano para FasL [Latinis et al., 1997].
 - ii) pAIM1.4-Luc, vector de expresión bajo el control del promotor del gen humano para CD69 [Lopez-Cabrera et al., 1995].
- y uno de los siguientes plásmidos:
 - i) vector “vacío” pEF4B como control de transfección,
 - ii) vector pEF-GFP-DGK α ,
 - iii) pEF-GFP-DGK α Kd,
 - iv) pEF-GFP- Δ (1–192)–DGK α ,
 - v) pEF-Myr-GFP-DGK α .

Se utilizó la siguiente relación molar entre los diferentes plásmidos a co-transfectar:

- pEF-GFP-DGK α : pLuc-486FasL o pAIM1.4-Luc relación 1:3.
- pLuc-486FasL o pAIM1.4-Luc : pRL-TK relación 7:1.

La co-transfección con el vector para la luciferasa de *Renilla* (pRL-TK) fue utilizado como control interno para normalizar la eficiencia de transfección (normalización de la cantidad de plásmido por célula así como de las posibles diferencias por condición experimental). A las 48 horas post-transfección, las células co-transfectadas fueron tratadas como se describe y el ensayo de actividad de luciferasa fue llevado a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Promega). Los datos de actividad de luciferasa medidos como emisión de luminiscencia fueron normalizados con el “reporter” control (emisión de luminiscencia de la luciferasa de *Renilla*) y comparados con el control sin estimular, para así obtener el número de veces de inducción del gen reportero a estudio.

3.4.17 Análisis por citometría de flujo de FasL intracelular.

1×10^6 de células por punto experimental fueron recogidas, centrifugadas tres minutos a 700 x g y lavadas con PBS. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente, se bloquearon durante 15 minutos en PBS-5% BSA-0,1% Triton-X100 y posteriormente se incubaron durante 1 hora con anticuerpo de ratón anti-human FasL (NOK-1) en PBS- 0,5 %BSA -0,1% Triton-X100. Las células fueron lavadas 3 veces con el mismo tampón e incubadas durante 1 hora con anticuerpo de cabra F(ab)₂ anti-ratón marcado con Cy5. Se realizaron tres lavados con PBS- 0,5 %BSA -0,1% Triton-X100 y un último lavado con PBS antes de ser analizadas por citometría de flujo (FL4, 660-700nm).

3.4.18 Obtención mediante ultracentrifugación de microvesículas/exosomas de los sobrenadantes de cultivo.

La obtención y purificación de la fracción de los sobrenadantes de cultivo que contiene microvesículas/exosomas ha sido descrita previamente [Blanchard et al., 2002; Martinez-Lorenzo et al., 1999]. Utilizando los protocolos descritos en estos estudios, 20×10^6 de células JHM1-2.2 o blastos T fueron tratadas como se indica en 1 ml de medio completo. Previamente a la realización de los experimentos, el suero (FBS) utilizado en el medio de cultivo fue primero filtrado utilizando filtros de 0.22 μm y posteriormente ultracentrifugado durante 16h a 100.000 x g con el fin de eliminar posibles restos de exosomas presentes en el suero de cultivo. A los diferentes tiempos de inducción utilizados las células fueron recogidas y tras una centrifugación a 700 x g durante 5 minutos, los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos. Para eliminar posibles células así como restos celulares estos sobrenadantes fueron clarificados por varias centrifugaciones seriadas. Para ello fueron primero sometidos a tres centrifugaciones a 5000 x g durante 5 minutos, y dos centrifugaciones a 10.000 x g durante 2 minutos, recogiendo el sobrenadante en cada paso. Los sobrenadantes de cultivo clarificados de esta forma se sometieron a ultracentrifugación a una velocidad de 100.000 x g durante 18 horas, con el fin de pelletear la fracción de microvesículas/exosomas. El sobrenadante de esta ultracentrifugación fue recogido y guardado a 4⁰C hasta su utilización. La fracción particulada contenida en el pellet ultracentrifugado fue resuspendida y lisada durante 10 minutos a 4⁰C en 100 μl de tampón de lisis RIPA suplementado con 0,1 mM PMSF y PIC. Estos lisados fueron sometidos a electroforesis en geles de 10% poliacrilamida-SDS en condiciones desnaturizantes. Las proteínas separadas fueron transferidas posteriormente a una membrana

de nitrocelulosa (HybondTM ECLTM) y la presencia de CD63, FasL y DGK α fue analizada por *Western Blotting* utilizando los correspondientes anticuerpos primarios y secundarios. CD63 es una glicoproteína de 53 kDa con alto grado de glicosilación [Wang et al., 2001], detectándose en *WB* bajo condiciones no reductoras como una banda comprendida entre 60-30 kDa. Para la detección de CD63 por *WB* las muestras lisadas se mezclaron con tampón de Laemmli (60mM Tris, 10% glicerol 2% SDS, 0.002% azul de bromofenol, pH 6.8) en condiciones no reductoras (sin DTT) y fueron sometidas a electroforesis.

3.4.19 Ensayos de citotoxicidad sobre células diana JE6.1 de la fracción de exosomas de los sobrenadantes de cultivo de células efectoras.

Con el fin de analizar la capacidad citotóxica inductora de apoptosis de la fracción de microvesículas/exosomas se realizó un ensayo funcional sobre células diana. Para ello se recogieron y clarificaron los sobrenadantes de cultivo de células JHM1-2.2 o blastos T (células efectoras) control o estimuladas con las diferentes condiciones experimentales y se procedió a su ultracentrifugación. El sobrenadante ultracentrifugado fue recogido y el pellet conteniendo las microvesículas/exosomas fue resuspendido en 1 ml de medio RPMI completo. A continuación el sobrenadante y el pellet resuspendido fueron añadidos sobre 1×10^6 de células Jurkat E6.1 (células diana). Se utilizaron las células Jurkat E6.1 como células diana para evitar el efecto del carbacol presente en el medio de cultivo de las células efectoras JHM1-2.2 inducidas con este estímulo. Las células Jurkat E6.1 no expresan el receptor muscarínico (HM1R) y por lo tanto el carbacol no es capaz de inducir apoptosis sobre estas células. Una vez enfrentado el sobrenadante y el pellet procedentes de la ultracentrifugación sobre las células JE6.1 se analizó la muerte celular (apoptosis) inducida analizando marcaje con Anexina V-PE y permeabilidad a 7-AAD (descrito en apartado 3.4.5) a las 15 y 24 horas de incubación.

Para analizar la contribución del sistema Fas/FasL en la muerte celular inducida en cada condición experimental se realizaron los siguientes experimentos en paralelo sobre las células efectoras JHM1-2.2 y blastos T, sobre el sobrenadante y pellet ultracentrifugados y sobre las células diana JE6.1:

- A) Las células efectoras JHM1-2.2 o blastos T fueron pre-incubadas durante 30 minutos con Ciclosporina A (CsA, 200 ng/ml) antes de la inducción con los diferentes estímulos. La ciclosporina A es un potente inhibidor de la calcineurina, bloqueándose la activación

el factor de transcripción NF-ATc y la posterior expresión del gen para FasL [Izquierdo et al., 1996].

B) El sobrenadante procedente de la ultracentrifugación, así como el pellet resuspendido en medio completo fueron incubados durante 30 minutos a 37⁰C con el anticuerpo anti-Fas Ligand NOK-1 (0.5 µg/ml) antes de su incubación con las células JE6.1 diana. NOK-1 se une a FasL bloqueando su interacción con el receptor de Fas.

C) Las células diana JE6.1 fueron pre-incubadas durante 30 minutos a 37⁰C con el anticuerpo anti-Fas DX2 (0.5 µg/ml) antes de añadir el sobrenadante y el pellet ultracentrifugados. El anticuerpo DX2 se une al receptor Fas humano bloqueando su interacción con FasL.

3.4.20 Separación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ mediante MACS.

Las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ presentes en los cultivos de blastos T fueron separadas mediante MACS (“*Magnetic Automatic Cell Sorting*”, Miltenyi Biotec). Esta técnica permite el aislamiento de subpoblaciones celulares a partir de mezclas complejas en función de sus marcadores de superficie, de modo que las células que se van a separar se identifican con anticuerpos conjugados a ultramicroesferas magnetizables. Se realizó una separación positiva para los linfocitos T CD4⁺ utilizando un sistema de bolas paramagnéticas (MACS Microbeads) asociadas a columnas magnéticas. Para ello 100x10⁶ de linfoblastos T obtenidos de sangre periférica cultivados durante 6 días con rIL-2 se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos, se resuspendieron en 100 µl de medio RPMI completo sin FBS, se añadieron 80 µl de anticuerpo monoclonal anti-CD4 y se incubaron durante 15 minutos a 4⁰C. Se añadió 1 ml de RPMI y se centrifugó a 400 x g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 80 µl de PBS-Heparina con 20 µl de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a ultramicroesferas magnetizables por cada 10x10⁶ de células. Se incubaron durante 12 minutos a 4⁰C, se añadió 1 ml de PBS-Heparina y se centrifugó 8 minutos a 400 x g. Se resuspendió el pellet celular en 500 µl de PBS y se procedió a la separación positiva de los linfoblastos CD4⁺ y separación por selección negativa de la subpoblación CD8⁺ mediante autoMACS. Las subpoblaciones recogidas se lavaron con medio RPMI completo con FBS centrifugando a 400 x g durante 8 minutos. Se resuspendió el pellet de células en RPMI completo con FBS con IL-2 (20 ng/ml) y se cultivaron durante 24 horas antes de la realización del experimento correspondiente.

3.4.21 Fraccionamiento subcelular.

La técnica de fraccionamiento subcelular y análisis por gradiente de densidad en Percoll ha sido utilizada previamente para aislar lisosomas secretores que contienen FasL en linfocitos T citotóxicos [Bossi and Griffiths, 1999]. Para ello, 20×10^6 células JHM1-2.2 fueron recogidas y centrifugadas a $700 \times g$ durante 5 minutos a 4°C . A partir de este punto se mantuvieron unas condiciones de 4°C durante todo el proceso. Se realizó un primer lavado de las células con PBS y un segundo lavado con una solución 50 mM HEPES/90 mM KCl (solución de lisis). El pellet de células fue resuspendido en 2 ml de solución de lisis con PMSF (0.1 mM) y PIC para evitar la acción de las proteasas intracelulares durante el proceso de lisis. A continuación las células fueron sometidas durante 12 minutos a 4°C a una lisis suave utilizando un homogeneizador de vidrio montado sobre un brazo automático. Para comprobar el grado de lisis-rotura celular se añadió 5 μl del colorante Trypan Blue sobre 10 μl de lisado celular, colorante utilizado como marcador de viabilidad celular. Una vez finalizada la homogenización el lisado celular fue centrifugado a $700 \times g$ durante 5 minutos para así pelletear el material nuclear. El sobrenadante fue recogido y sometido a un gradiente de densidad en Percoll. Primeramente se preparó un gradiente discontinuo de densidad en un tubo polyalomero (específico para el rotor y centrífuga utilizados) añadiendo 4 ml de una solución 90% de percoll/50 mM HEPES/90 mM KCl. Sobre estos 4 ml se añadieron con suavidad 5.3 ml de una solución 39% de percoll/50 mM HEPES/90 mM KCl. El lisado celular (2 ml) fue añadido con cuidado por la pared del tubo, sobre el gradiente de Percoll preparado. El tubo de centrífuga fue enrasado con solución de lisis y centrifugado a $40.000 \times g / 4^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos (ultracentrífuga CENTRIKON T-2070, rotor TST 41.14, mode NORMAL, sin freno). La fracción soluble (parte superior del gradiente) fue aspirada y se fueron recogiendo fracciones de 330 μl desde la parte superior del gradiente (26 fracciones por gradiente). Para diluir la cantidad de Percoll presente en las fracciones se añadieron 100 μl de solución de lisis con PMSF. Se tomaron 150 μl de cada fracción y se añadió 75 μl de tampón de Laemmli (60mM Tris, 10% glicerol 2% SDS, 0.002% azul de bromofenol, pH 6.8) con DTT (20mM) y fueron calentadas 5 minutos a 100°C . La detección de CD63 se realizó en condiciones no reductoras, añadiendo a las fracciones tampón de Laemmli sin DTT. A continuación las fracciones fueron centrifugadas a $13.000 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente para pelletear parte del percoll presente en las muestras. Las diferentes muestras fueron sometidas a electroforesis en geles grandes de 10% poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). La electroforesis fue llevada a cabo a 4°C en tampón de electroforesis (25 mM Tris, 0.2 M glicina, 0.1% SDS) durante 4 horas a 160 V. Las proteínas separadas fueron transferidas posteriormente del gel a una membrana de

nitrocelulosa. La transferencia se llevo a cabo en condiciones húmedas durante 4 horas a 1.2 A en tampón de transferencia. Una vez acabada la transferencia las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con una solución de PBS al 5% (p/v) de leche desnatada en polvo, 0.2 % Tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente o a 4⁰C toda la noche. Se realizaron 4 lavados de las membranas (10 minutos cada uno) y posteriormente fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con los diferentes anticuerpos primarios en tampón PBS al 0,5 % (p/v) de leche desnatada y 0,2 % Tween-20. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal de conejo anti-FasL Q-20, anticuerpo monoclonal anti-CD63, anticuerpo monoclonal anti-lamp1, anticuerpo monoclonal anti-Golgi58k, anticuerpo monoclonal anti-DGK α , y anticuerpo policlonal de conejo anti-PKD . Seguidamente las membranas fueron lavadas 3 veces y a continuación se procedió a su incubación 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-Ig de conejo o anti-Ig de ratón conjugado con peroxidasa de rábano. Las membranas se lavaron 5 veces y posteriormente se procedió a la detección de los inmunocomplejos a través una reacción de quimioluminiscencia utilizando reactivos ECL (Amersham-Pharmacia) y revelado en películas autorradiográficas.

A continuación las diferentes muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de 10% oliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y reductoras. La electroforesis fue llevada a cabo en tampón de electroforesis (25mM Tris, 0.2 M glicina, 0.1% SDS) durante 2 horas a 75 V. Las proteínas separadas fueron transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo en condiciones húmedas durante 1.5 horas a 350 mA en tampón de transferencia. Una vez acabada la transferencia las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con una solución de PBS al 5% (p/v) de leche desnatada en polvo, 0.2 % Tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente o a 4⁰C toda la noche. Se realizaron 4 lavados de las membranas (10 minutos cada uno) y posteriormente fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con los diferentes anticuerpos primarios en tampón PBS al 0,5 % (p/v) de leche desnatada, 0,2 % Tween-20. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal de conejo anti-FasL Q-20, anticuerpo policlonal de conejo anti-GFP, anticuerpo monoclonal anti- β -actina, anticuerpo monoclonal anti-CD63, anticuerpo monoclonal anti-lamp1, anticuerpo monoclonal anti-Golgi58k, anticuerpo monoclonal anti-DGK α , y anticuerpo policlonal de conejo anti-PKD . Seguidamente las membranas fueron lavadas 3 veces y a continuación se procedió a su incubación 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-Ig de conejo o anti-Ig de ratón conjugado con fosfatasa alcalina. Las membranas se lavaron 5 veces y posteriormente se procedió a la detección de los inmunocomplejos a través una reacción de quimioluminiscencia utilizando reactivos ECL y revelado en películas autorradiográficas.

4. Resultados.

4.1 Expresión del receptor de antígeno de células T y del receptor Fas en la línea celular JHM1-2.2.

La línea celular Jurkat deriva de una leucemia linfoblástica aguda de tipo T [Weiss et al., 1984] y fue utilizada para generar la línea celular JHM1-2.2, mediante transfección estable del receptor muscarínico humano de tipo I (HM1R) [Desai et al. 1990]. Ambas líneas celulares expresan de forma constitutiva CD2, CD3, CD4 [Weiss et al., 1984], el receptor Fas (CD95) y son sensibles a la muerte celular inducida por activación (AICD) tras la estimulación del receptor de antígeno de células T (TCR) [Dhein et al., 1995; Izquierdo et al., 1996].

En los primeros experimentos se analizó la expresión en membrana plasmática del complejo TCR/CD3 y del receptor de Fas por citometría de flujo en la línea celular JHM1-2.2 y en blastos T humanos obtenidos de sangre periférica, utilizando para ello el anticuerpo monoclonal anti-CD3, clon UCHT1 (Figura 1A), y el anticuerpo monoclonal anti-Fas, clon DX2 (Figura 1B). Ambos tipos celulares expresan en la membrana plasmática el complejo TCR/CD3, así como altos niveles del receptor Fas.

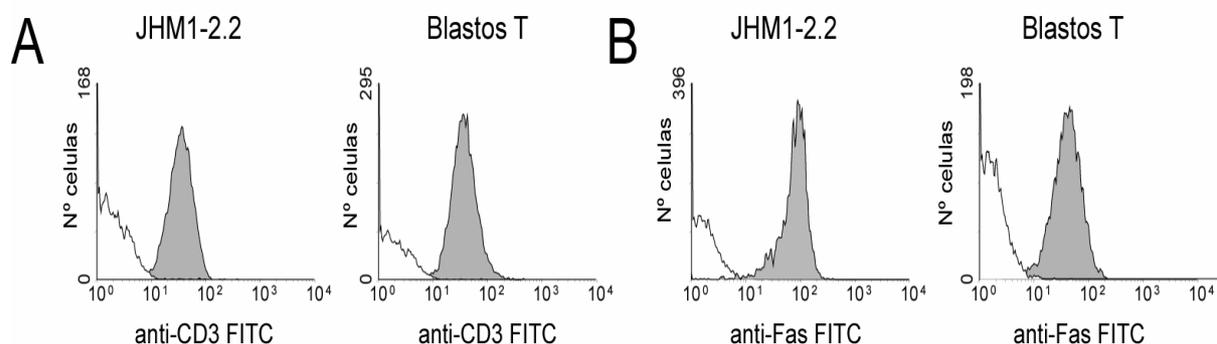


Figura 1. Análisis por citometría de flujo de la expresión en superficie de CD3 y del receptor Fas en células JHM1-2.2 y blastos T humanos. Los perfiles grises representan la expresión de CD3 (A) o del receptor Fas (B). Los perfiles blancos corresponden a los controles negativos (control isotópico de células marcadas con anticuerpo Ms IgG). Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con FITC. El eje de abscisas (eje X) indica la intensidad de fluorescencia y el eje de ordenadas (eje Y) indica el número de células.

4.2 Inducción de muerte celular inducida por activación (AICD) en la línea celular JHM1-2.2

La línea celular JHM1-2.2 ha sido utilizada para estudiar las señales que dan lugar a la activación del linfocito T [Abraham et al., 2004], así como a la muerte celular inducida por activación (AICD) [Izquierdo et al., 1996]. En estas células, la estimulación del receptor muscarínico (HM1R) con su agonista carbacol (CCh) mimetiza en parte las respuestas celulares que tienen lugar durante la activación y muerte celular inducida por la estimulación del TCR.

Durante el proceso de apoptosis, uno de los primeros cambios morfológicos que tienen lugar es la translocación/exposición del fosfolípido fosfatidilserina de la cara interna hacia la cara externa de la membrana plasmática. La Anexina V es una proteína que se une de forma específica y con alta afinidad a este fosfolípido. La exposición de fosfatidilserina precede a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, evento que tiene lugar en las etapas tardías de la muerte celular por apoptosis. Se analizó la sensibilidad de las células JHM1-2.2 a la apoptosis inducida por carbacol (CCh) mediante marcaje con Anexina V-PE como marcador de fases tempranas de apoptosis (15 h), y medida de la permeabilidad a 7-AAD como marcador de las fases tardías de apoptosis (24 h), mediante citometría de flujo (Figura 2). El tratamiento con CCh durante 15 horas indujo una muerte celular de un $40 \pm 5\%$ (células positivas para AnexinaV-PE, figura 2A), siendo la apoptosis inducida dosis dependiente. A su vez, la estimulación del TCR con anti-CD3 o con fitohemaglutinina M (PHAm) durante 15 horas indujo muerte celular.

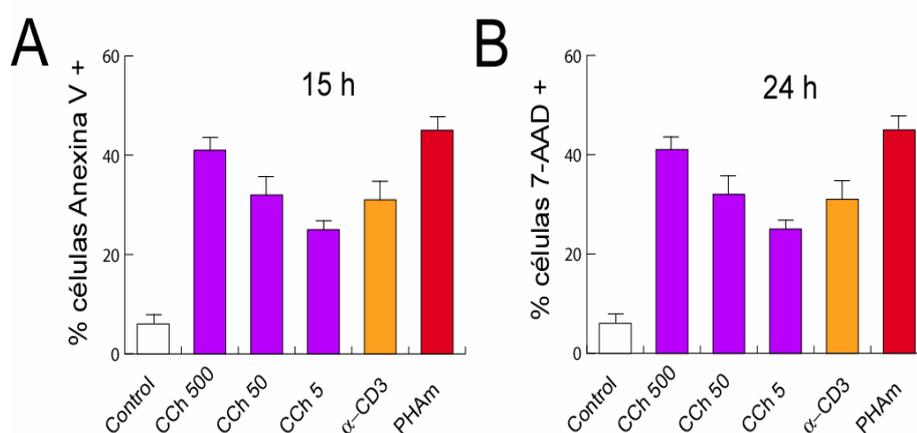


Figura 2. Efecto de CCh en la viabilidad de las células JHM1-2.2. Las células JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh (500, 50 y 5 µM), PHAm (0.5 µg/ml) o anti-CD3 pegado a plástico (5 µg/ml) y la muerte celular inducida (15 y 24 h) fue analizada por marcaje con AnexinaV-PE (A) y permeabilidad a 7-AAD (B), y posterior análisis mediante citometría de flujo.

Uno de los cambios morfológicos más llamativos que tienen lugar durante el proceso de apoptosis es la condensación del citoplasma celular, la reducción del volumen celular y las alteraciones de la membrana plasmática, la cual empieza a formar unas “burbujas” (en inglés “*blebs*”). La Figura 3 muestra como el tratamiento de las células JHM1-2.2 con CCh indujo condensación celular y el burbujeo típico de la muerte celular por apoptosis.

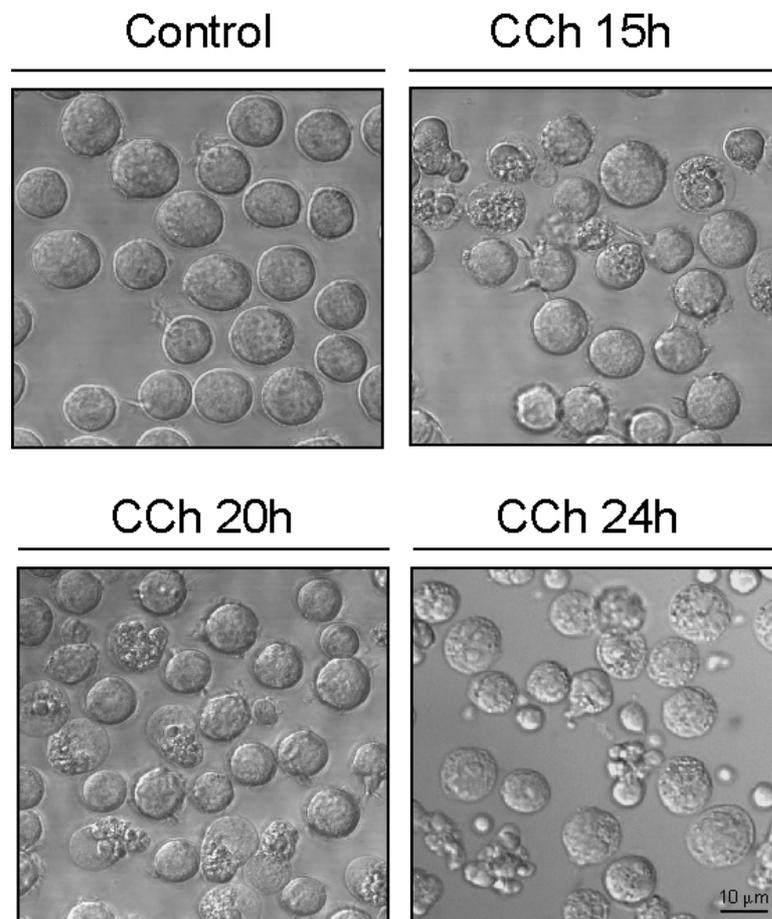


Figura 3. Cambios morfológicos inducidos por estimulación de CCh en células JHM1-2.2. Las células JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh 500 μM y se tomaron fotografías por microscopía de transmisión a 15, 20 y 24 horas de estimulación.

Durante las últimas fases de apoptosis tienen lugar la fragmentación del ADN, proceso que es llevado a cabo por la activación de endonucleasas específicas durante el programa apoptótico. Estas endonucleasas degradan la estructura de la cromatina en fragmentos de aproximadamente 300 kilobases y posteriormente en pequeños fragmentos de 180 pares de bases que salen fuera de la célula. Mediante citometría de flujo y la tinción del ADN con el fluorocromo ioduro de propidio (PI) se puede analizar el contenido de ADN de la célula analizada. La Figura 4A muestra como el tratamiento con CCh en células JHM1-2.2 durante 24 h indujo degradación de ADN, medida por la aparición de células sub-diploides.

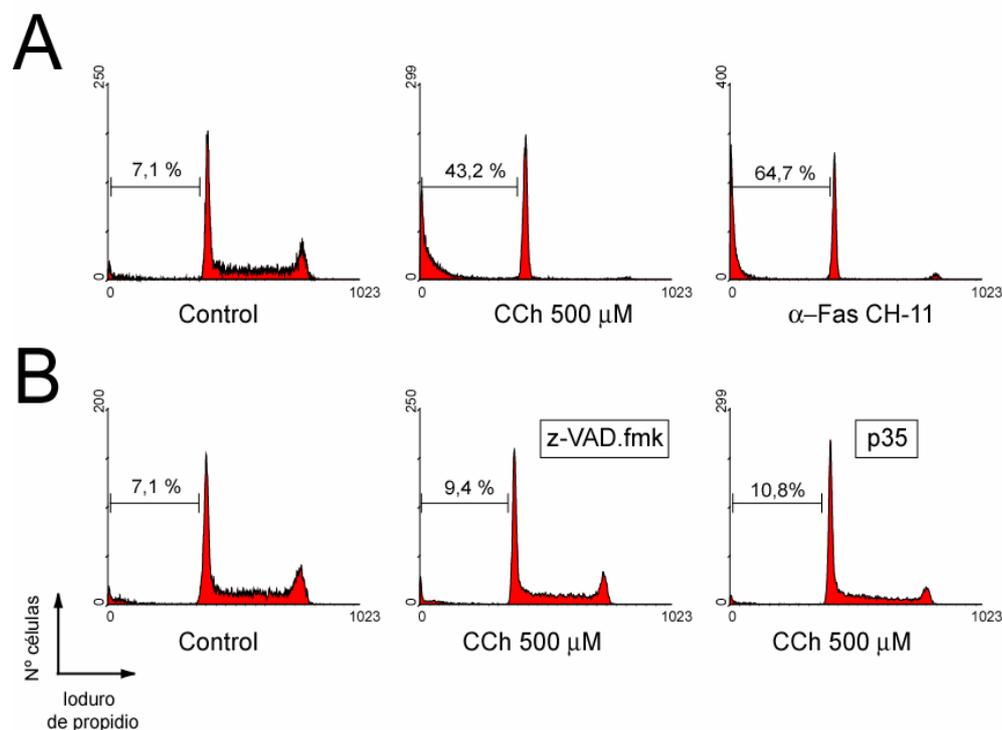


Figura 4. Análisis por citometría de flujo de la degradación de ADN en células JHM1-2.2. (A) Células JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh (500 μM) o mAb anti-Fas CH-11 (50 ng/ml) durante 24 h. El contenido en ADN cuantificado como intensidad de fluorescencia de ioduro de propidio fue analizado por citometría de flujo. La degradación del ADN fue determinada como el porcentaje de células con ADN situado en la posición subG₀/G₁ del ciclo celular. (B) Las células JHM1-2.2 fueron tratadas como se indica en (A) en presencia de z-VAD.fmk (100 μM) (panel central). Células JHM1-2.2 fueron transfectadas de forma estable con el vector de expresión pEF-p35 (panel derecho) y fueron tratadas y analizadas como se indica en (A).

Las caspasas son los miembros ejecutores de la maquinaria que lleva a cabo el programa de apoptosis. Está descrito que el tratamiento con inhibidores de caspasas inhibe la apoptosis inducida por varios estímulos [Elkert et al., 1999]. Además la activación de las endonucleasas implicadas en la ruptura del ADN también está mediada por las caspasas [Samejima and Earnshaw, 1998]. Se analizó el efecto de la inhibición de las caspasas en la degradación del ADN inducida por CCh. El tratamiento de las células JHM1-2.2 con el inhibidor de caspasas de amplio espectro z-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilketone (z-VAD.fmk) (Figura 4B), así como la expresión de la proteína viral inhibidora de caspasas p35 [Bump et al., 1995] (Figura 4B derecha) inhibieron la degradación del ADN tras la estimulación con CCh.

Por lo tanto la estimulación del receptor HM1R con su agonista CCh en las células JHM1-2.2, tuvo como efecto la muerte celular con las características morfológicas y bioquímicas clásicas de la muerte por apoptosis: condensación celular y burbujeo, exposición de fosfatidilserina al exterior celular y la degradación del ADN de manera dependiente de las caspasas.

4.3 Implicación del sistema Fas/FasL en la AICD inducida por CCh

Para determinar la implicación del sistema Fas/FasL en la AICD inducida por CCh en células JHM1-2.2, se utilizaron anticuerpos bloqueantes dirigidos contra Fas o FasL. Como se observa en la figura 5, la inhibición de la interacción Fas/FasL con el anticuerpo bloqueante anti-Fas DX2, o con el anticuerpo bloqueante anti-FasL NOK-1, inhibió la apoptosis inducida por CCh, anti-CD3 y PHAm. En el caso de la apoptosis inducida con mAb citotóxico anti-Fas CH-11, sólo el bloqueo del receptor Fas con DX2 inhibió la muerte celular. En cambio la inducción de apoptosis con actinomicina D (inhibidor de la síntesis de ácidos nucleicos) o estaurosporina (inhibidor de amplio espectro de proteínas quinasas) [Bertrand et al., 1994], estímulos que inducen muerte celular por un mecanismo independiente del sistema Fas/FasL, no se vio afectada por estos anticuerpos bloqueantes. Por lo tanto la unión de FasL a su receptor Fas es necesaria para la inducción de apoptosis por CCh en células JHM1-2.2.

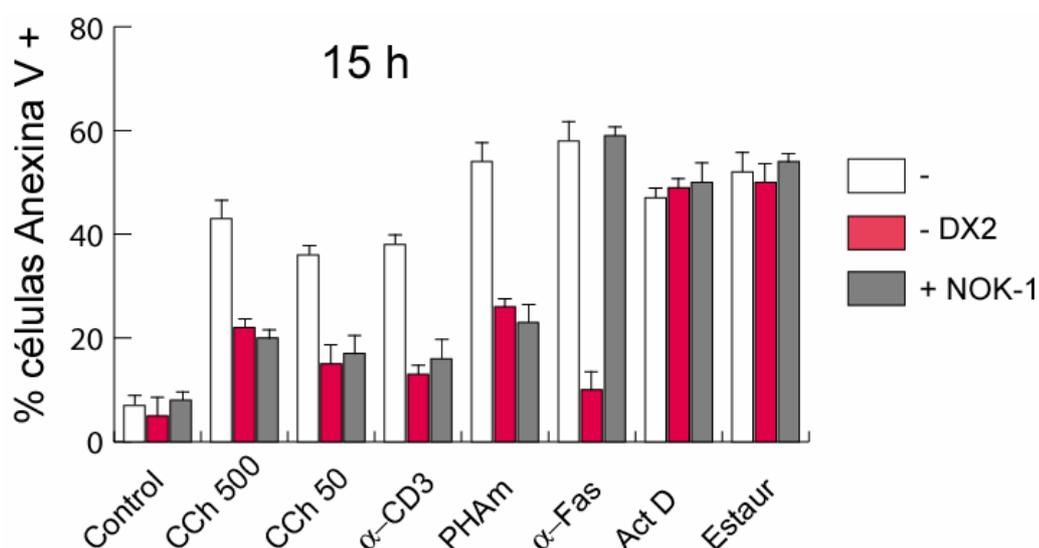


Figura 5 Implicación del sistema Fas/FasL en la AICD inducida por CCh en células JHM1-2.2. Células JHM1-2.2 fueron estimuladas durante 15 h con CCh (500 y 50 μ M), anti-CD3 pegado a plástico (5 μ g/ml), PHAm (0.5 μ g/ml), mAb anti-Fas CH-11 (40 ng/ml), actinomicina D (0.1 μ g/ml) y estaurosporina (1 μ M) en presencia o ausencia de 0.5 μ g/ml de los anticuerpos bloqueantes anti-Fas DX2 o anti-FasL NOK-1. El análisis de muerte celular fue llevado a cabo mediante marcaje con Anexina V-PE y análisis por citometría de flujo.

4.4 La inhibición de la DGK α potencia la AICD inducida por el sistema Fas/FasL.

La estimulación del receptor de célula T (TCR) en los linfocitos T induce la activación de la fosfolipasa C γ_1 (PLC γ_1), y un rápido aumento de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃) a nivel de la membrana plasmática [Desai et al. 1990; Weiss and Littman, 1994]. La estimulación del receptor muscarínico en células JHM1-2.2 induce la activación de la fosfolipasa C β (PLC β), y posterior aumento de DAG e IP₃ [Desai et al. 1990]. Una vez llevada a cabo su función, el DAG es fosforilado a ácido fosfatídico (PA) [Sanjuan et al., 2001; Abraham et al., 2004], reacción que está catalizada por los miembros de la familia de diacilglicerol quinazas (DGKs). Esta fosforilación regula negativamente la acción de este segundo mensajero y evita una señalización prolongada a través de DAG [Sanjuan et al., 2001].

La DGK α es una enzima de 80 kDa que se expresa en altos niveles en los linfocitos T, siendo una enzima mayoritariamente citosólica [Sakane et al., 1997]. Se analizó la expresión de esta enzima por WB (Figura 6). Los niveles endógenos de DGK α no se vieron afectados por la estimulación con CCh (4, 6 y 8 horas) en la línea celular JHM1-2.2. A su vez, el cultivo de blastos T humanos en presencia de IL-2 durante varios días tampoco afectó los niveles intracelulares de la DGK α . Estos resultados descartaron posibles modulaciones sobre la expresión de la DGK α debidas a las condiciones experimentales utilizadas.

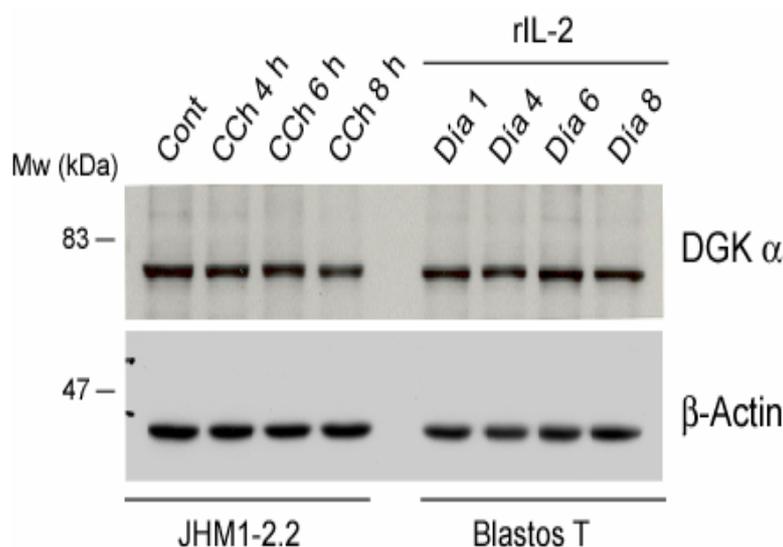


Figura 6. Expresión de DGK α en células JHM1-2.2 y blastos T humanos. La expresión de DGK α se detectó por Western Blotting utilizando el anticuerpo mAb anti-DGK α en células JHM1-2.2 estimuladas con CCh (500 μ M, 4,6 y 8 horas) y en blastos T humanos activados varios días con IL-2 (20 ng/ml). El tamaño y posición de los marcadores de peso molecular se muestran en la parte izquierda.

Se ha descrito que el pre-tratamiento con el inhibidor específico de DGKs de tipo I R59949 [Jiang et al., 2000], inhibe la producción de PA tras la estimulación con CCh en células JHM1-2.2 [Sanjuan et al., 2001]. Además, se ha demostrado la función que los niveles de DAG y la actividad de la DGK α ejercen en la correcta propagación de las señales derivadas del DAG que conllevan a la activación del linfocito T [Sanjuan et al., 2001; Jones et al., 2002; Zhong et al., 2003]. Dado que tras la estimulación de los receptores TCR o HM1R, la vía de señalización mediada por el segundo mensajero DAG ha sido implicada tanto en la activación del linfocito T [Feske et al., 2001, Sanjuan et al., 2001] como en la AICD [Strasser et al., 1995, Izquierdo et al., 1996] nos indujo a estudiar la implicación de la DGK α en la AICD en linfocitos T.

Dentro de las DGKs de tipo I inhibidas por el R59949 (isoformas α , β y γ), la DGK α es la única presente en linfocitos T [Topham et al., 1999], con lo que se utilizó este inhibidor como una primera aproximación al estudio de la función de DGK α en AICD. Células JHM1-2.2 fueron pre-incubadas con R59949 durante 20 minutos y posteriormente estimuladas con CCh, PHAm y anti-CD3. La inhibición de la DGK α aumentó la muerte celular inducida por todos estos estímulos, siendo el incremento dependiente de la dosis de R59949 utilizada (Figura 7A). La apoptosis inducida por el anticuerpo citotóxico anti-Fas CH-11, actinomicina D o estaurosporina no se vió afectada por la inhibición de la DGK α (Figura 7B). Estos estímulos inducen muerte celular utilizando vías independientes del metabolismo de DAG [Nagata et al., 1997], confirmando la especificidad del efecto de la inhibición de la DGK α en la muerte inducida por la estimulación de receptores que inducen elevación de DAG.

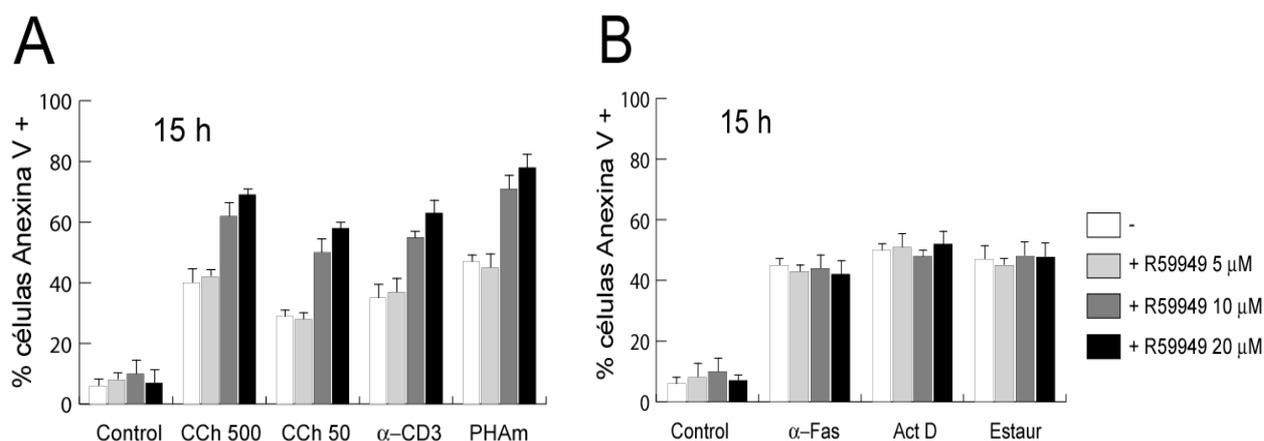


Figura 7. Efecto de la inhibición farmacológica de la DGK α en AICD. Células JHM1-2.2 fueron estimuladas durante 15 horas con CCh (500 y 50 μ M), anti-CD3 pegado a plástico (5 μ g/ml) y PHAm (0.5 μ g/ml) (A), o con el anticuerpo monoclonal anti-Fas CH-11 (40 ng/ml), actinomicina D (0.1 μ g/ml) o estaurosporina (1 μ M) (B), en presencia o ausencia de R59949 (5, 10 y 20 μ M).

El bloqueo de la interacción entre Fas y FasL utilizando los anticuerpos bloqueantes anti-Fas DX2 y anti-FasL NOK-1 revertió el efecto potenciador en muerte del inhibidor de la DGK α (Figura 8) tras la estimulación con CCh o PHAm, confirmando que la inhibición farmacológica de la actividad de la DGK α aumentó la AICD mediada por el sistema Fas/FasL.

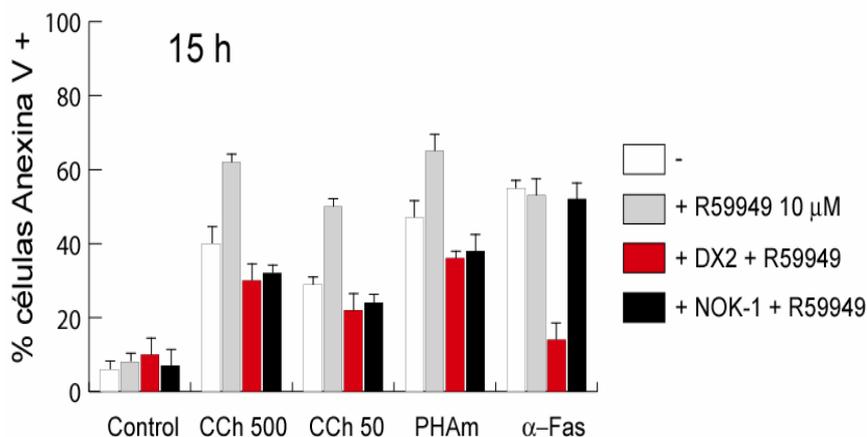
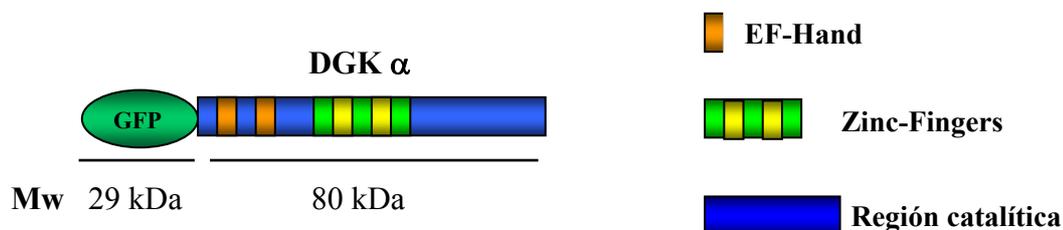


Figura 8. Células JHM1-2.2 fueron tratadas como se indica en (A) y (B) en presencia o ausencia de 0.5 μ g/ml de los anticuerpos bloqueantes anti-Fas DX2 o anti-FasL NOK-1. El análisis de muerte celular fue llevado a cabo mediante marcaje con Anexina V-PE y análisis por citometría de flujo.

4.5 Expresión de la construcción GFP-DGK α en células JHM1-2.2.

La estimulación del receptor HM1R o del TCR en las células JHM1-2.2 induce translocación transitoria de la DGK α desde el citosol a la membrana plasmática [Sanjuan et al., 2001]. Si el efecto potenciador de AICD que lleva a cabo el inhibidor R59949 es ejercido vía inhibición de la DGK α , la sobre-expresión de la DGK α debería inhibir la AICD inducida con CCh. Para estudiar la posible implicación de la DGK α en AICD se realizaron experimentos utilizando transfecciones transitorias con una construcción de la DGK α , que permite la expresión de una proteína quimérica de fusión con la proteína fluorescente GFP (GFP-DGK α).



- Esquema de la proteína de fusión GFP-DGK α .

Se procedió a la transfección transitoria de células JHM1-2.2 con un vector de expresión para la proteína GFP y con la construcción para la proteína GFP-DGK α . A las 48 horas post-transfección, las proteínas expresadas fueron analizadas mediante *Western blotting* (WB), utilizando para su detección un anticuerpo anti-GFP (figura 9A). En el carril de la izquierda, se detectó una banda de un tamaño aproximado de 107 kDa correspondiente a la proteína de fusión GFP-DGK α . La presencia y localización subcelular de la construcción GFP-DGK α fue también analizada utilizando microscopía confocal (figura 9B) y citometría de flujo (figura 9C). La figura 9C muestra los perfiles de expresión de las células transfectadas con un vector vacío (pEF4B) y células transfectadas con el vector para la construcción GFP-DGK α . A las 48 horas post-transfección, se obtuvieron los niveles máximos de expresión de la construcción GFP-DGK α , siendo positivas aproximadamente el 50-60 % de las células vivas.

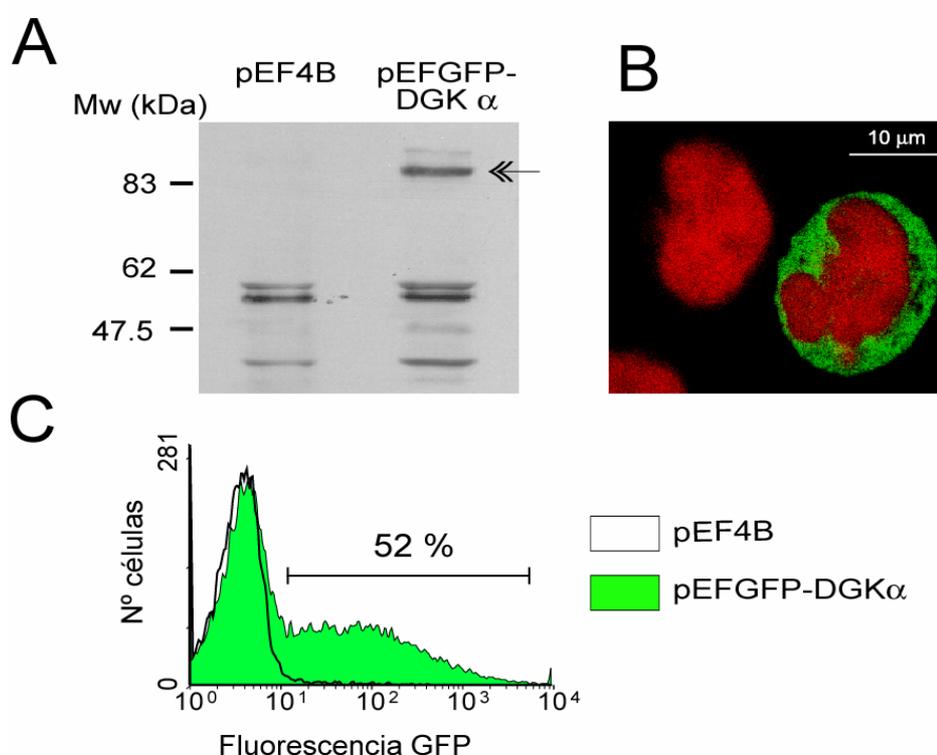


Figura 9. Expresión de la proteína de fusión GFP-DGK α . Células JHM1-2.2 fueron transfectadas por electroporación con un vector vacío (pEF4B) o con el vector de expresión pEF-GFP-DGK α . (A) Análisis por Western Blotting de la expresión de GFP-DGK α utilizando un anticuerpo específico anti-GFP. (B) Análisis por microscopía confocal de la expresión de la construcción GFP-DGK α . Los núcleos fueron visualizados utilizando marcaje con 7-AAD. (C) Perfil de expresión de la construcción GFP-DGK α analizado por citometría de flujo (emisión de fluorescencia verde, 505-545 nm) comparados con el perfil de expresión del vector vacío pEF4B. El marcador indica el porcentaje de células GFP positivas.

4.6 Efecto de la expresión de la GFP-DGK α sobre la inducción de AICD.

Para estudiar el efecto de la expresión de la GFP-DGK α en AICD, 48 horas post-transfección se analizó la apoptosis inducida por CCh en la población que expresa GFP-DGK α y en la población que no expresa la construcción GFP-DGK α (Figura 10). La expresión de la construcción GFP-DGK α en células JHM1-2.2 redujo la muerte celular en etapas tempranas (de $46 \pm 4\%$ a $27 \pm 2\%$ de células Anexina V + tras 15 h de inducción, figura 10A). Cuando se analizó la muerte celular a las 20 horas de inducción (% de células permeables a 7-AAD, figura 10B) la inhibición en AICD observada fue mayor. Como se muestra en la Figura 10C, el grado de inhibición de la apoptosis observado fue dependiente de los niveles de expresión de la construcción GFP-DGK α : en aquellas células que expresan altos niveles de la construcción GFP-DGK α (células con mayor intensidad de fluorescencia verde) la inhibición fue aproximadamente de un 90 %. Como se puede observar, el efecto inhibitor de muerte en la población que expresa la construcción GFP-DGK α fue específico de la AICD inducida a través del HM1R, mientras que la apoptosis inducida con actinomicina D no se vió afectada. A su vez, la expresión de GFP-DGK α no inhibió eventos corriente abajo del receptor Fas, ya que la apoptosis inducida por estimulación del receptor Fas con el anticuerpo citotóxico anti-Fas CH-11 no se vió afectada (figura 10A y 10B).

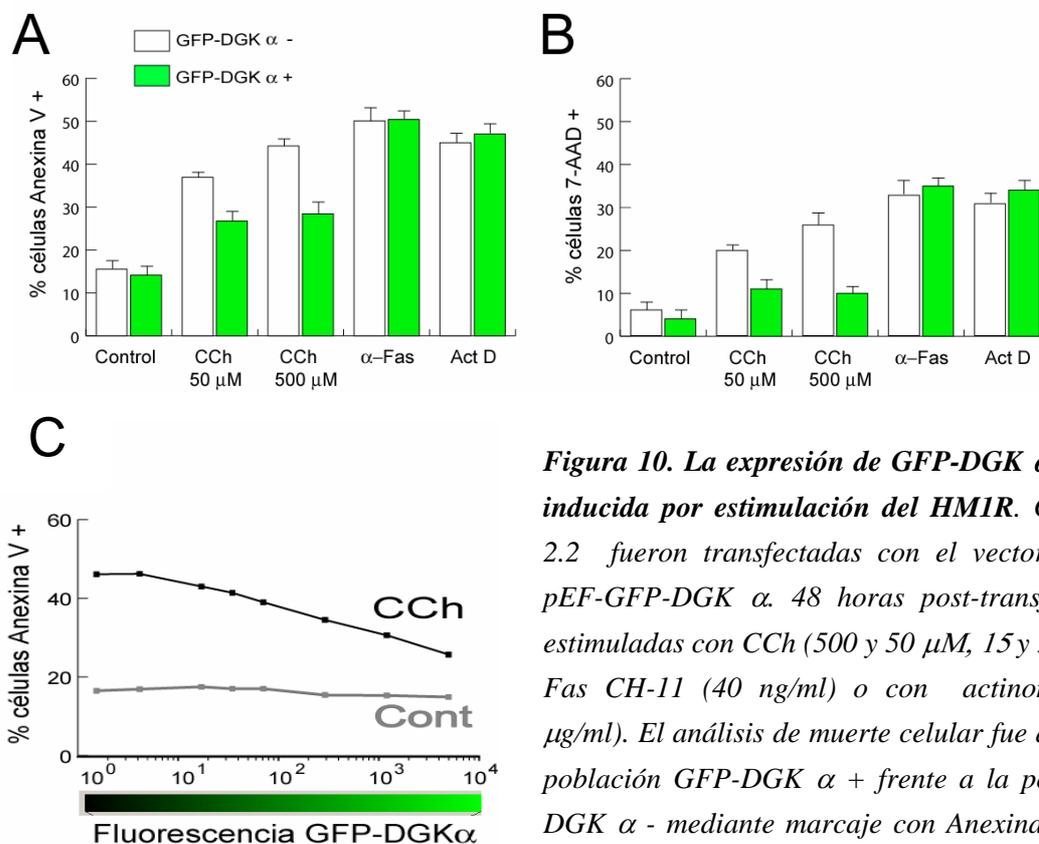
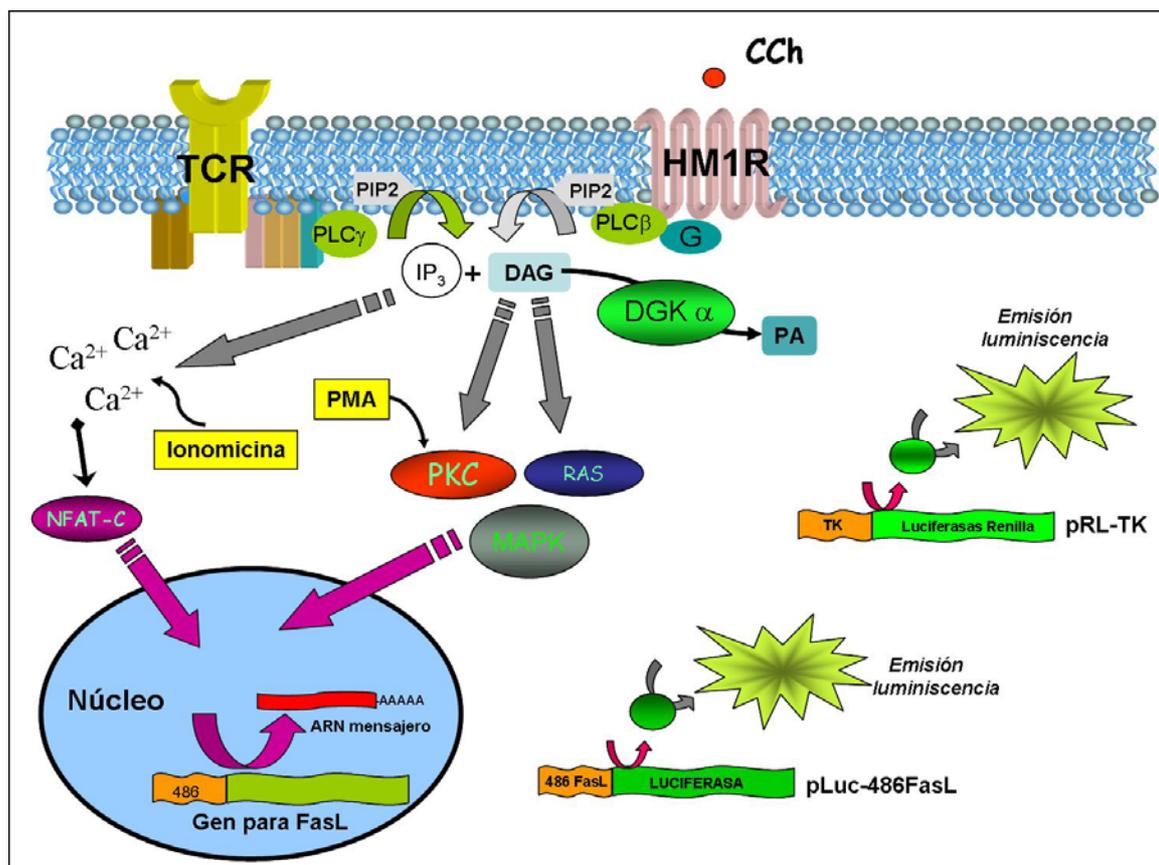


Figura 10. La expresión de GFP-DGK α inhibe AICD inducida por estimulación del HM1R. Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con el vector de expresión pEF-GFP-DGK α . 48 horas post-transfección fueron estimuladas con CCh (500 y 50 μ M, 15 y 20 h), con anti-Fas CH-11 (40 ng/ml) o con actinomicina D (0.1 μ g/ml). El análisis de muerte celular fue analizado en la población GFP-DGK α + frente a la población GFP-DGK α - mediante marcaje con Anexina V-PE (A,C) y permeabilidad a 7-AAD (B) y análisis mediante citometría de flujo.

4.7 La DGK α no afecta la regulación transcripcional del gen de FasL.

La estimulación del receptor HM1R en células JHM1-2.2 induce en etapas tempranas (2-3 h) regulación positiva del ARN mensajero para FasL [Izquierdo et al., 1996]. Se ha descrito que la vía Ras/MAPK está implicada en el control transcripcional de FasL [Latinis et al., 1997], así como que la DGK α regula la vía de señalización mediada por Ras [Jones et al., 2002]. Todos estos datos podrían sugerir que el efecto inhibitorio observado de la DGK α sobre la AICD inducida por estimulación del HM1R podría deberse a una inhibición de la vía de señalización de Ras y de la transcripción del gen de FasL.

Con el fin de analizar el efecto de la DGK α sobre la transcripción del gen de FasL, se realizaron ensayos de actividad de un gen reportero de luciferasa que contiene el promotor del gen de FasL. Las células JHM1-2.2 fueron co-transfectadas con un vector de expresión inducible que contiene el gen reportero para la luciferasa pLuc-486FasL, gen que se encuentra bajo el control de los primeros 486 nucleótidos corriente arriba del sitio de inicio del gen de FasL (esquema).



Esquema del ensayo de actividad de gen reportero de luciferasa bajo el promotor del gen de FasL.

Los datos de actividad de luciferasa medidos como emisión de luz fueron comparados con el punto control de células sin estimular, para así obtener el número de veces de inducción del gen reportero a estudio. La figura 11 muestra como tras la estimulación durante 4.5 horas del HM1R en células JHM1-2.2, se produce una inducción de 4-5 veces del gen reportero para FasL. La inhibición farmacológica de la DGK α con R59949 no afectó la inducción del gen reportero para FasL tras estimulación con CCh. La estimulación farmacológica con esteres de forbol (PMA), que inducen la activación de la proteína quinasa C (PKC), junto con el ionóforo de calcio ionomicina (Ionom) fue utilizada como control interno de inducción del gen de FasL, y como control de inducción del gen de FasL por activación de PKC y aumento de calcio intracelular en condiciones independientes de los niveles de DAG e IP₃ generados tras estimulación del receptor.

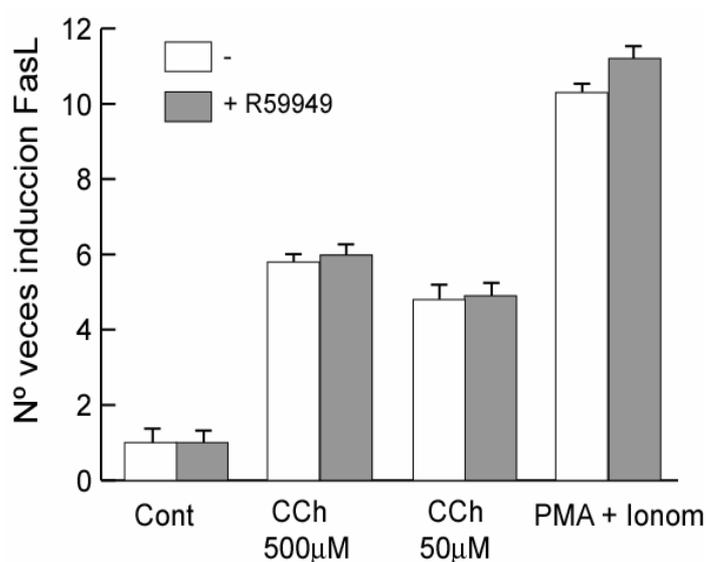


Figura 11. La inhibición farmacológica de DGK α no afecta la regulación transcripcional del gen de FasL. Células JHM1-2.2 fueron co-transfectadas con el vector de expresión inducible pLuc-486FasL y el vector de expresión pRL-TK. 48 h post-transfección las células fueron estimuladas durante 4.5 h con CCh (500 y 50 μ M), PMA (10 ng/ml) más Ionomicina (0.5 μ g/ml), en presencia o ausencia de R59949 (10 μ M). El ensayo de actividad de luciferasa fue llevado a cabo como se indica en materiales y métodos.

A continuación, se estudió el efecto que la expresión de la construcción GFP-DGK α tenía sobre la regulación del promotor del gen de FasL. Para ello, las células JHM1-2.2 fueron co-transfectadas con el vector para la GFP-DGK α (pEF-GFP-DGK α) o con un vector control (pEF4B), junto con el vector de expresión inducible que contiene el gen reportero para la luciferasa pLuc-486FasL y el vector para la luciferasa de *Renilla* pRL-TK.

La expresión de la construcción GFP-DGK α en las células JHM1-2.2 tampoco afectó los niveles de inducción del gen de FasL tras 4.5 y 6 horas de estimulación con CCh (Figura 12).

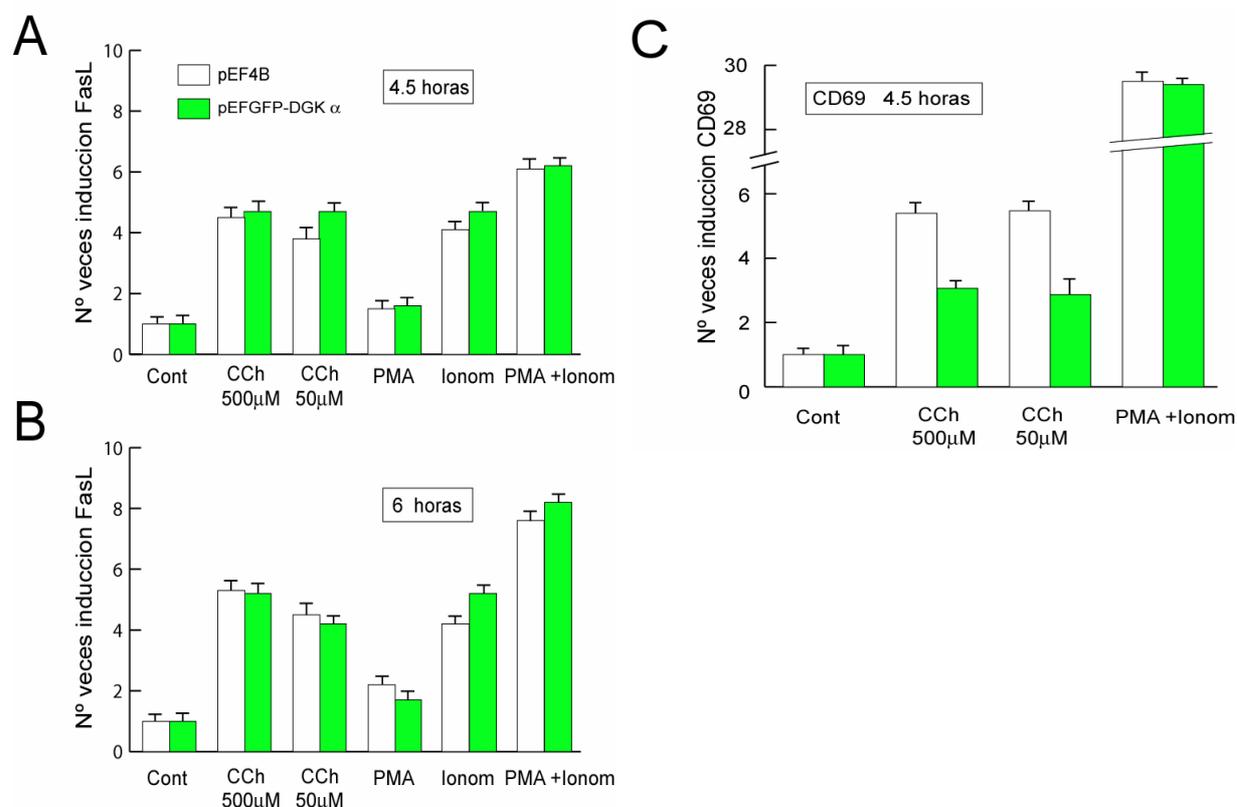


Figura 12. La expresión de GFP-DGK α no afecta a la regulación transcripcional del gen de FasL, pero sí afecta la regulación transcripcional del gen de CD69. (A,B) Células JHM1-2.2 fueron co-transfectadas con el vector pEF-GFP-DGK α o con vector vacío pEF4B, junto con los vectores pLuc-486FasL y pRL-TK. 48 h post-transfección las células fueron estimuladas durante 4.5 y 6 h con CCh (500 y 50 μ M), PMA (10 ng/ml), Ionomicina (0.5 μ g/ml) o PMA más Ionomicina. (C) Células JHM1-2.2 fueron co-transfectadas con el vector pEF-GFP-DGK α o con vector vacío pEF4B, junto con los vectores pAIM1.4-Luc y pRL-TK. 48 h post-transfección las células fueron estimuladas durante 4.5 h con CCh (500 y 50 μ M), o PMA (10 ng/ml) más Ionomicina (0.5 μ g/ml).

Resultados previos indicaban que la DGK α está implicada en la inhibición de las señales de activación a través de la vía Ras/MAPK, atenuando la expresión en membrana plasmática del marcador de activación celular CD69 [Sanjuan et al., 2001; Jones et al., 2002; Sanjuan et al., 2003]. Cuando las células JHM1-2.2 fueron co-transfectadas con el vector de expresión inducible pAIM1.4-Luc, vector de expresión bajo el control del promotor del gen de CD69, la expresión de GFP-DGK α redujo la inducción del “reportero” para CD69 (Figura 12C).

Los datos obtenidos de inducción del gen reportero para FasL tras la estimulación con el ester de forbol PMA, indican que la vía de señalización mediada exclusivamente por activación de PKC no regula de manera significativa la inducción del gen de FasL (fig. 11, fig. 12). En cambio la estimulación con ionomicina, que produce aumento de calcio intracelular, produce una inducción de 4-5 veces del gen de FasL. Estos resultados junto con el hecho de que la DGK α y la vía de DAG no afectarían la inducción del gen de FasL, pero sí la inducción del gen para CD69 (fig. 12), sugieren la existencia de un punto de divergencia entre las señales que conllevan activación y apoptosis tras la estimulación de receptor. Otras vías reguladas por el recambio de fosfatidilinositol, como el aumento de calcio intracelular en lugar de la vía DAG/PKC, regularían la inducción del gen de FasL mediada por estimulación de receptor [Izquierdo et al., 1996], mientras que la vía DAG/PKC estaría implicada en la regulación de las señales de activación (fig. 12C).

Los resultados sobre la inducción del gen de FasL obtenidos muestran que el efecto de la DGK α observado sobre la apoptosis mediada por FasL no es debido a un efecto sobre la regulación transcripcional de FasL. Por lo tanto, las siguientes aproximaciones experimentales se centraron en caracterizar el posible efecto de la DGK α en la regulación post-transcripcional de FasL.

4.8 La DGK α no afecta los niveles intracelulares de FasL.

Está descrito que células Jurkat y blastos T humanos sin estimular expresan niveles significativos de FasL intracelular [Martínez-Lorenzo et al., 1996], y la estimulación del TCR, así como la estimulación del HM1R regulan de forma positiva el ARN mensajero para FasL, con una inducción máxima entre las 3 y 5 horas de estimulación [Izquierdo et al., 1996]. En primer lugar se analizó mediante *Western Blotting* los niveles totales de FasL tras estimulación con CCh durante 4, 6 y 8 horas, observándose una inducción en los niveles intracelulares de FasL a estos tiempos (figura 13).

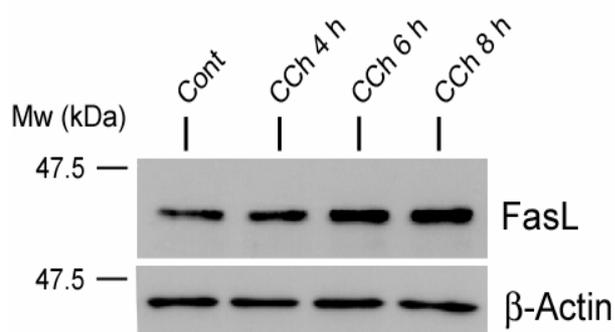


Figura 13. Inducción de expresión de FasL tras estimulación con CCh. Células JHM1-2.2 fueron estimulados con CCh (500 μ M) durante 4, 6 y 8 horas para inducir la expresión de FasL. La expresión de FasL se detectó por WB utilizando el anticuerpo contra FasL Q-20.

Para estudiar la posible regulación a nivel traduccional de FasL por parte de la DGK α , se analizaron los niveles totales de FasL tras estimulación con CCh durante 6 y 8 horas, en presencia o ausencia del inhibidor de DGKs R59949. Como se muestra en la figura 14, el tratamiento con R59949 en células JHM1-2.2 no afectó los niveles totales de FasL preformado (puntos Control +/- R59949). La estimulación con CCh (6 y 8 horas) indujo aumento en los niveles intracelulares de FasL, no viéndose afectados los niveles de FasL por el pre-tratamiento con el inhibidor de DGKs R59949.

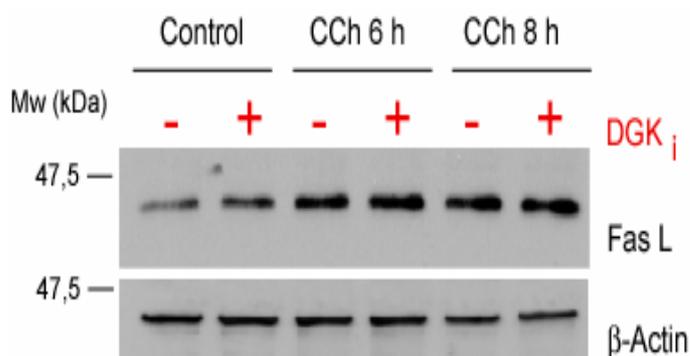


Figura 14. La inhibición farmacológica de DGK α no afecta la expresión intracelular de FasL. Células JHM1-2.2 fueron estimulados con CCh (500 μ M) durante 6 y 8 horas en presencia a ausencia de R59949 (DGK_i 10 μ M). La expresión de FasL se detectó por WB utilizando el anticuerpo anti-FasL Q-20.

A continuación, se analizó mediante citometría de flujo el efecto de la expresión de la construcción GFP-DGK α sobre los niveles totales de FasL. En este caso para la detección de FasL se utilizó el anticuerpo anti-FasL NOK-1 sobre células fijadas y permeabilizadas, ya que el anticuerpo anti-FasL Q-20 sólo es válido para la detección de FasL mediante WB. El análisis de los niveles intracelulares de FasL en células JHM1-2.2 transfectadas con la construcción GFP-DGK α , tanto en condiciones basales (control sin estimular), como en condiciones de inducción de expresión de FasL (estimulación con CCh o con PMA más Ionomicina durante 6 y 8 horas), mostraron niveles intracelulares similares de FasL entre la población GFP-DGK α + y la población que no expresa la construcción (GFP-DGK α -) (Figura 15).

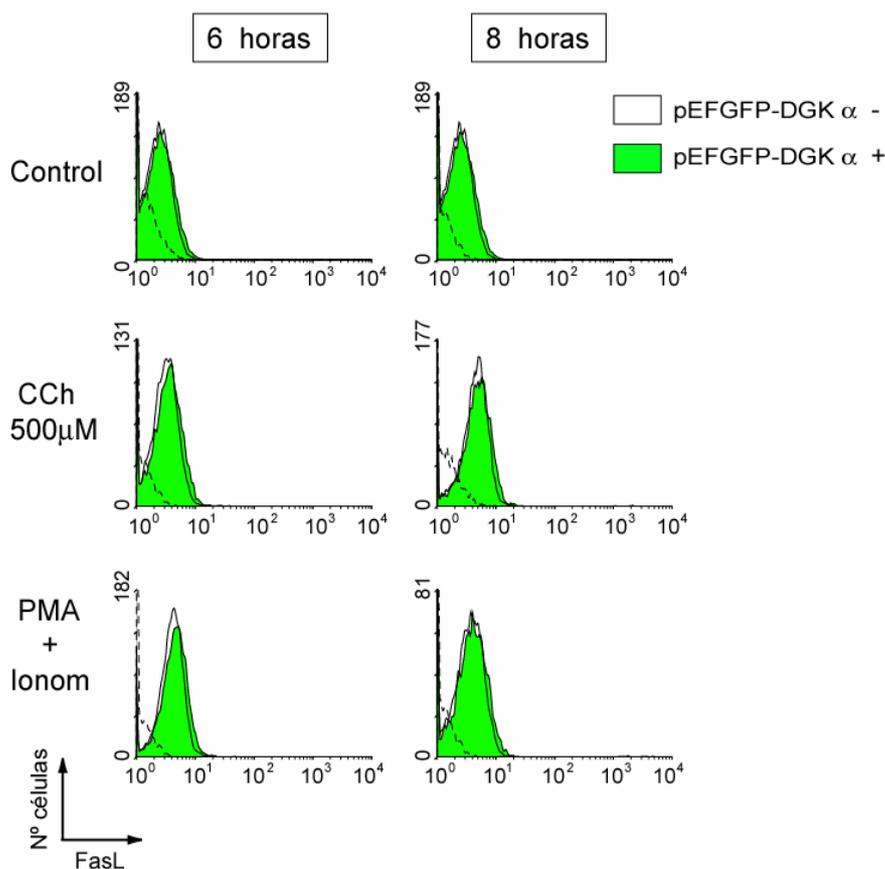


Figura 15. La expresión de GFP-DGK α no afecta los niveles intracelulares de FasL. Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con la construcción GFP-DGK α . Tras 48 h fueron estimuladas con CCh (500 μ M, 50 μ M) PMA (10 ng/ml) más Ionomicina (0.5 μ g/ml) durante 6 y 8 horas. La expresión intracelular de FasL fue analizada en células permeabilizadas utilizando marcaje indirecto con el anticuerpo mAb anti-FasL (NOK-1) y análisis por citometría de flujo en la población GFP-DGK α + (perfil verde) y en la población GFP-DGK α - (perfil blanco). Los perfiles punteados corresponden a los controles negativos (control isotópico). El eje de abscisas (eje X) indica la intensidad de fluorescencia y el eje de ordenadas (eje Y) indica el número de células.

El análisis llevado a cabo representa el efecto promedio de la expresión transitoria de la GFP-DGK α , que produce niveles de expresión muy heterogéneos (figura 16A): hay células con expresión baja (niveles bajos de intensidad de fluorescencia verde), junto a células con una alta expresión (niveles altos de intensidad de fluorescencia verde). Para evitar un posible enmascaramiento del efecto de la GFP-DGK α debido a la heterogeneidad en sus niveles de expresión, se analizaron los niveles de FasL intracelular de las células que expresan altos niveles de GFP-DGK α (población GFP-DGK α +++), frente a la población que no expresa la construcción (GFP-DGK α -). Como se puede observar en la figura 16B, tampoco se observaron diferencias en los niveles intracelulares de FasL entre ambas poblaciones celulares.

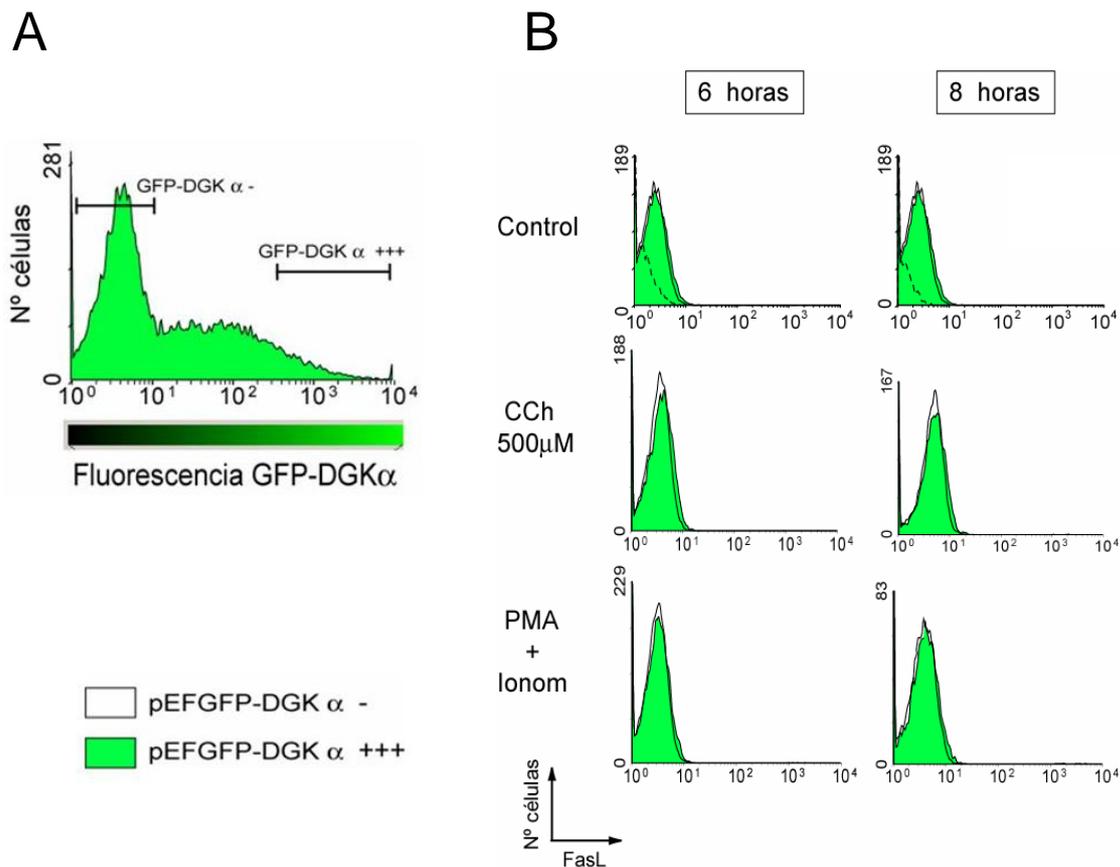


Figura 16. Niveles altos de expresión de GFP-DGK α no afectan los niveles intracelulares de FasL. (A) Perfil de expresión de la construcción GFP-DGK α analizado por citometría de flujo. (B) Células JHM1-2.2 fueron tratadas y analizadas como se indica en la figura 15. La expresión intracelular de FasL fue analizada en células permeabilizadas utilizando marcaje indirecto con el anticuerpo mAb anti-FasL (NOK-1) y posterior análisis por citometría de flujo en la población que expresa altos niveles de intensidad de fluorescencia verde/GFP (población GFP-DGK α +++, perfil verde) y en la población GFP-DGK α - (perfil blanco). Los perfiles punteados corresponden a los controles negativos (marcaje con Ms IgG, control isotípico). Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con Cy5. El eje de abscisas (eje X) indica la intensidad de fluorescencia y el eje de ordenadas (eje Y) indica el número de células.

Algunos resultados previos indicaban que la DGK α se encuentra implicada en la inhibición de las señales de activación a través de la vía Ras/MAPK, atenuando la expresión en membrana plasmática del marcador de activación celular CD69 [Sanjuán et al., 2001; Jones et al., 2002; Sanjuán et al., 2003;]. Por ello se analizó el efecto de la expresión de la construcción GFP-DGK α en la expresión en membrana plasmática de CD69 tras estimulación con CCh. Se analizaron los niveles de este marcador por citometría de flujo en células JHM1-2.2 transfectadas con la construcción GFP-DGK α , estudiando la expresión de este marcador entre la población GFP-DGK α + y la población GFP-DGK α - como control.

Como se observa en la figura 17, las células en estado basal, sin estimular, no expresan CD69 en la membrana plasmática. Tras la estimulación con CCh (500 y 50 μ M durante 6 horas) se induce expresión de CD69 (desplazamiento del pico de fluorescencia). Comparando los perfiles de expresión de CD69 entre ambas poblaciones, se observa que la población de células GFP-DGK α + expresa niveles menores de CD69 tras estimulación con CCh (desplazamiento del pico de fluorescencia menor cuando se compara con el marcaje de las células GFP-DGK α -). El análisis de la expresión de CD69 en aquellas células que expresan altos niveles de GFP-DGK α (población GFP-DGK α +++) mostró que el grado de atenuación en la expresión de CD69 observado fue mayor.

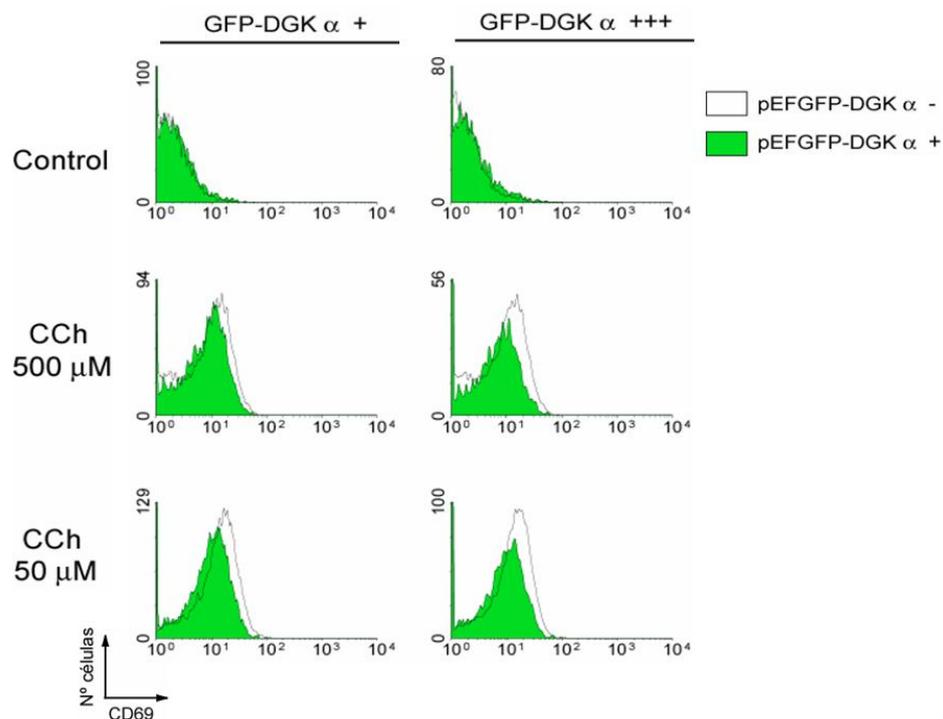


Figura 17. La expresión de DGK α atenúa la expresión del marcador de activación celular CD69. Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con la construcción GFP-DGK α . Tras 48 h fueron estimuladas con CCh 500 μ M, 50 μ M durante 6 h. La expresión en membrana plasmática de CD69 fue analizada utilizando marcaje directo con el anticuerpo mAb anti-CD69-Cy-Chrome y posterior análisis por citometría de flujo en la población GFP-DGK α + y GFP-DGK α +++ (perfil verde) y en la población GFP-DGK α - (perfil blanco).

4.9 La expresión de formas constitutivamente activas de DGK α no inhiben la AICD inducida por CCh.

En los apartados anteriores se observó como la expresión de DGK α en células JHM1-2.2 reducía tanto la inducción del gen para CD69 (apartado 4.7, fig. 12C) como la expresión en membrana plasmática de este marcador de activación celular (apartado 4.8, fig. 16) tras la estimulación con CCh. Resultados previos habían demostrado que la expresión de formas constitutivamente activas de la DGK α , localizadas en la membrana plasmática actúan como moduladores negativos del DAG generado tras la activación del TCR o del HM1R, reduciendo la expresión de CD69 en la membrana plasmática [Sanjuan et al., 2001]. Por lo tanto, la utilización de estos mutantes constitutivamente activos podrían constituir un herramienta más potente para analizar un posible papel de la DGK α en la regulación transcripcional del gen para FasL a través de la vía DAG/Ras/PKC. Por ello se analizó el efecto sobre la inducción del gen reportero para FasL de dos construcciones constitutivamente activas de DGK α : GFP- Δ (1-192)DGK α y Myr-GFP-DGK α . Estas construcciones se encuentran localizadas de forma permanente en la membrana plasmática (Figura 17A), y están implicadas en la reducción de los niveles de DAG producidos en esta localización tras la estimulación de los receptores [Sanjuan et al., 2001]. La expresión de estas construcciones en células JHM1-2.2 tampoco produjo ningún efecto sobre la inducción del gen de FasL, como se observa en la figura 18A.

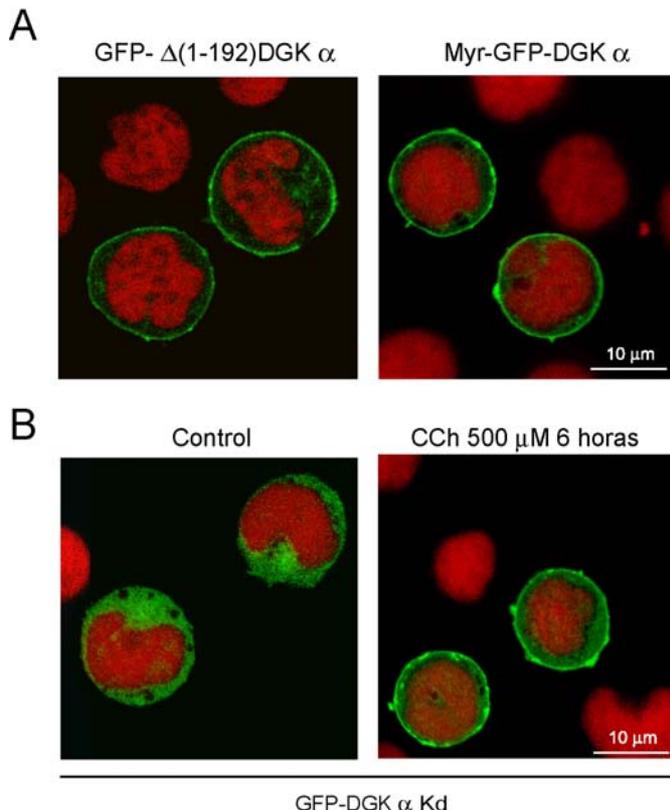


Figura 17. Localización en membrana plasmática de las construcciones GFP- Δ (1-192) DGK α , Myr-GFP-DGK α y GFP-DGK α Kd. (A) Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con las construcciones GFP- Δ (1-192)DGK α , Myr-GFP-DGK α . 48 horas después fueron analizadas por microscopía confocal. (B) Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con la construcción GFP-DGK α Kd. 48 horas después fueron estimuladas con CCh (500 μ M, 6 horas) y analizadas por microscopía confocal. Los núcleos fueron visualizados utilizando marcaje con 7-AAD.

También se estudió el efecto de la expresión de una construcción de DGK α catalíticamente inactiva, GFP-DGK α Kd (del inglés “*kinase dead*”), sobre la inducción del gen de FasL. Tras la estimulación con CCh, esta construcción transloca de forma permanente a la membrana plasmática (figura 17B) y se comporta como una forma dominante negativa de la DGK α endógena localizada en la membrana plasmática [Sanjuan et al., 2001]. La expresión de esta construcción catalíticamente inactiva en células JHM1-2.2 induce una acumulación sostenida de los niveles de DAG tras estimulación del receptor, produciéndose una señalización prolongada a través de la vía Ras/MAPK [Jones et al., 2002]. Como se observa en la figura 18A, la expresión de esta construcción no afectó la inducción del gen de FasL. Las consecuencias de la expresión de estas construcciones sobre la AICD fueron también analizados. Ninguna de estas construcciones ejerció efecto alguno sobre la apoptosis inducida tras estimulación con CCh (figura 18B).

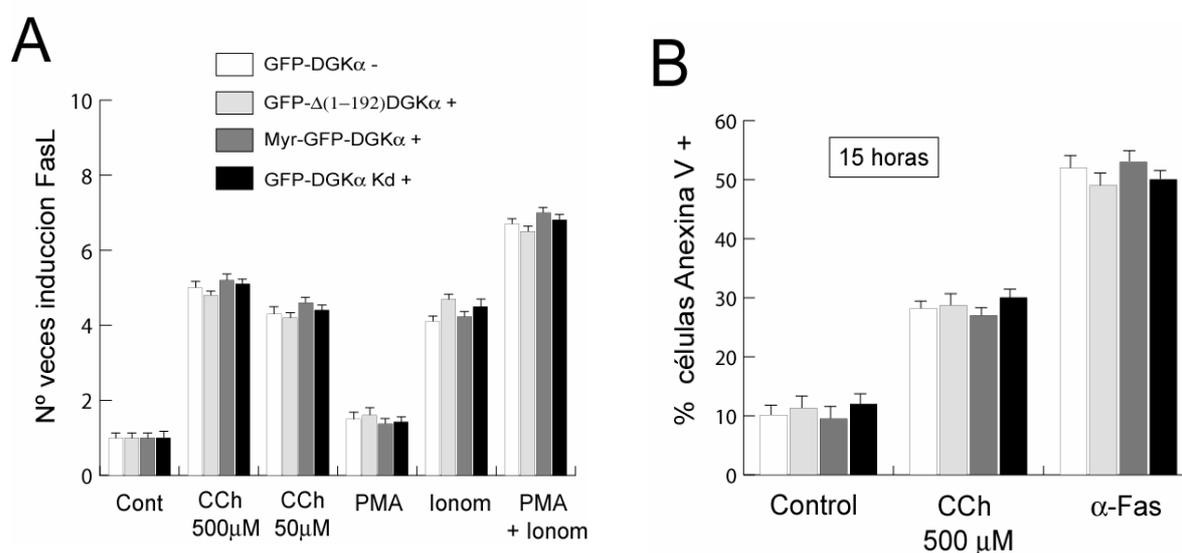


Figura 18. La expresión de construcciones GFP-DGK α localizadas en la membrana plasmática no afectan la inducción del gen de FasL ni la AICD inducida tras estimulación con CCh. (A) Células JHM1-2.2 fueron co-transfectadas con los vectores pEF-GFP- $\Delta(1-192)$ DGK α , pEF-Myr-GFP-DGK α , pEF-GFP-DGK α Kd o vector vacío pEF4B, junto con el vector pLuc-486FasL y el vector pRL-TK. 48 h post-transfección las células fueron estimuladas durante 6 h con CCh (500 y 50 μ M), PMA (10 ng/ml), Ionomicina (0.5 μ g/ml) o PMA más Ionomicina. El ensayo de actividad de luciferasa fue llevado a cabo como se indica en materiales y métodos. (B) Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con pEF-GFP- $\Delta(1-192)$ DGK α , pEF-Myr-GFP-DGK α o pEF-GFP-DGK α Kd. 48 horas post-transfección fueron estimuladas durante 15 horas con CCh (500 μ M) o con anti-Fas CH-11 (40 ng/ml). El análisis de muerte celular fue analizado en la población GFP positiva frente a la población GFP negativa mediante citometría de flujo y marcaje con Anexina V-PE.

Los resultados obtenidos en el apartado 4.7 (figura 11 y 12), mostraban que la expresión de DGK α y la regulación de la vía del DAG no afectaban la inducción del gen de FasL, pero sí la inducción del gen de CD69 (fig. 12). Además, la DGK α no afecta la transcripción ni la traducción de FasL (fig. 14 y 15), pero en cambio sí que afecta la expresión en membrana plasmática del marcador de activación celular CD69 (figura 12 y 17). Todos estos resultados, junto con el hecho de que mutantes de DGK α regulan la activación celular, confirmaría la existencia de un punto de divergencia entre las señales reguladas por el DAG que median la regulación de genes implicados en la activación y en la apoptosis del linfocito T.

4.10 La forma bioactiva, no procesada de FasL (mFasL) no se detectó en membrana plasmática.

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que la inhibición de apoptosis dependiente de FasL llevada a cabo por la DGK α no es ejercida a nivel transcripcional ni traduccional del FasL, por lo tanto se procedió al estudio de un posible efecto regulador a un nivel post-traduccional.

Tras la inducción de la síntesis de FasL, la estimulación del linfocito T induce la expresión de FasL en la membrana plasmática en su forma de 40 kDa (**mFasL**). Una vez en la membrana plasmática, FasL es rápidamente procesado por metaloproteasas de la matriz extracelular [Kayagaki et al., 1995], generándose un fragmento C-terminal soluble e inactivo de 24 kDa (sFasL), y un fragmento N-terminal unido a la membrana plasmática de 16 kDa. Este procesamiento proteolítico ha sido implicado en la inhibición funcional (regulación negativa) de la actividad pro-apoptótica de FasL [Tanaka et al., 1998].

En primer lugar se procedió al análisis mediante citometría de flujo de la expresión en la membrana plasmática de la forma no procesada de FasL (mFasL) en las células JHM1-2.2 tras estimulación. Para ello se utilizó el anticuerpo mAb NOK-1, anticuerpo dirigido contra el extremo C-terminal de FasL, y que por tanto sólo reconoce la forma de membrana no procesada de FasL (mFasL). Como se observa en la figura 19A, fue imposible detectar la forma de membrana plasmática no procesada de FasL (mFasL) tras estimulación con CCh o con PMA más Ionomicina, incluso en presencia de dos inhibidores de metaloproteasas: GM6001 y 1,10-phenantroline [Mariani et al., 1995; Martinez-Lorenzo et al., 1996].

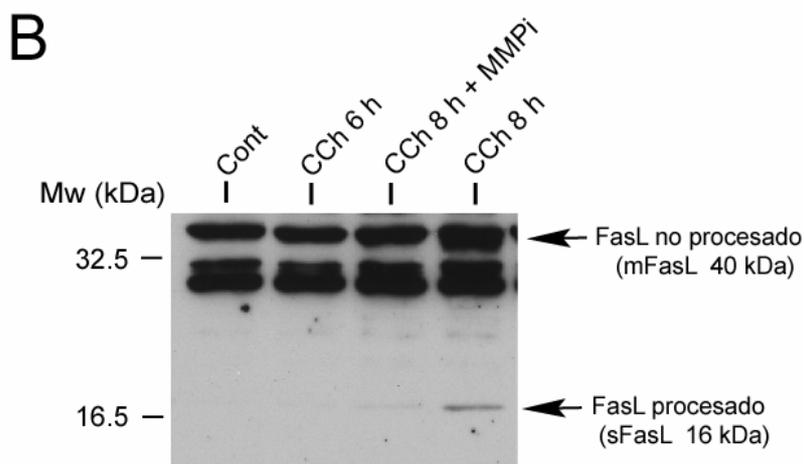
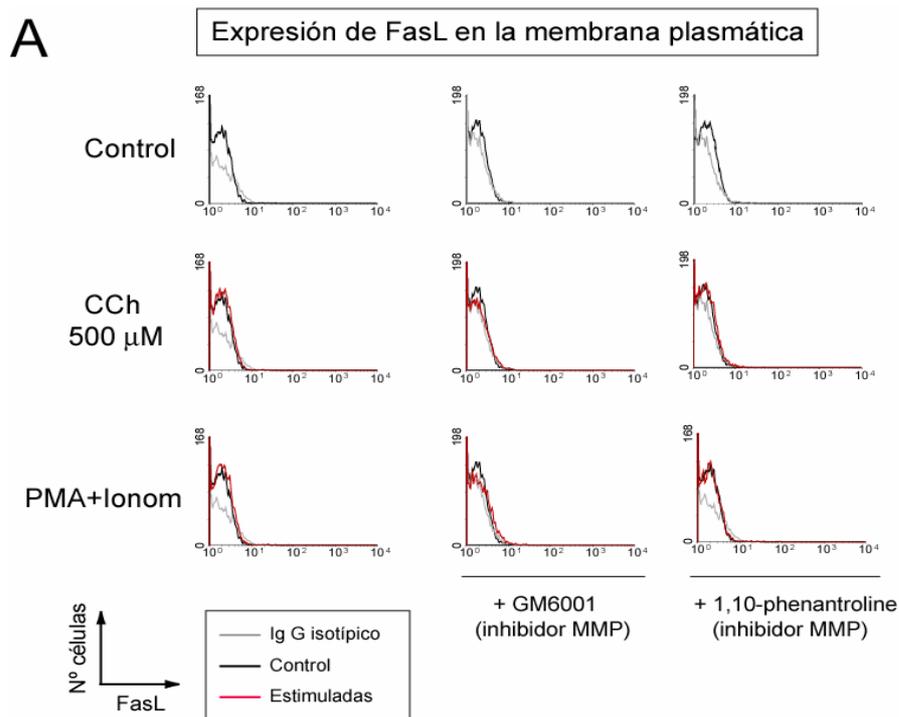


Figura 19. Detección de FasL en sus formas no procesada (mFasL) y procesada en células JHM1-2.2. (A) Células JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh (500 μ M), PMA (10 ng/ml) más Ionomicina (0.5 μ g/ml) durante 8 horas en presencia o ausencia de los inhibidores de metaloproteasas GM6001 (50 μ M) o 1,10-phenantroline (2.5 mM). La presencia de FasL en la membrana plasmática fue analizada por citometría de flujo utilizando marcaje indirecto con anticuerpo mAb anti-FasL NOK-1 y posterior marcaje con anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con Cy5. (B) Análisis por Western Blot de la expresión de FasL en células JHM1-2.2 estimuladas con CCh (500 μ M, 6 y 8 horas) utilizando el anticuerpo anti-FasL Q-20.

A continuación, se analizó la presencia de la forma procesada presente en la membrana plasmática (fragmento N-terminal de 16 kDa) mediante *Western Blotting* en lisados totales de células JHM1-2.2 estimuladas con CCh (Figura 19B). Para ello se utilizó el anticuerpo anti-FasL Q-20, anticuerpo dirigido contra la parte N-terminal de FasL y, que por tanto, reconoce tanto la forma no procesada de FasL (**mFasL, 40 kDa**) como la forma procesada de 16 kDa. Únicamente tras una sobre-exposición de la membrana se pudo detectar una banda débil de 14 kDa (mFasL procesado) comparada con la banda de FasL no procesado (40 kDa). El tratamiento con el inhibidor de metaloproteasas de amplio espectro GM6001 indujo una disminución de los niveles de la forma procesada de FasL de 16 kDa, corroborándose de esta forma la efectividad de este inhibidor, así como la acción proteolítica de las metaloproteasas sobre FasL (figura 19A). La comparación de los niveles de proteína de la forma procesada de FasL (16 kDa) con la forma no procesada (40 kDa), indican que solo una pequeña fracción de FasL alcanzaría la membrana plasmática, que a su vez sería procesada por las metaloproteasas de la matriz. El hecho de que no pudiésemos detectar la forma no procesada, y por tanto bioactiva (mFasL, 40 kDa) en la membrana plasmática (figura 19A), incluso en presencia de los inhibidores de metaloproteasas, sugieren que la pequeña parte que llegaría a la membrana plasmática (banda de 16 kDa en la figura 19B) sería rápidamente proteolizada por estas proteasas.

Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que tanto la expresión de la DGK α como su inhibición farmacológica interfieren en la vía de muerte mediada por FasL a un nivel post-traducciona. El hecho de que no fuera posible detectar FasL en su forma no procesada y, por tanto inductora de apoptosis (mFasL), en la membrana plasmática de las células JHM1-2.2 nos planteó considerar que la DGK α podría estar afectando otro mecanismo involucrado en la apoptosis mediada por FasL.

4.11 La estimulación del receptor HM1R induce la secreción de microvesículas/exosomas con FasL bioactivo.

Se ha descrito que uno de los mecanismos que tienen lugar en la inducción de muerte en linfocitos T implica la secreción al medio extracelular de exosomas/microvesículas que contienen FasL en su forma no procesada (mFasL) [Martínez-Lorenzo et al., 1999; Monleón et al., 2001; Andreola et al., 2002; Abrahams et al., 2003]. Los exosomas o microvesículas son pequeñas estructuras de membrana que se forman por invaginación interna hacia el lumen de la membrana de endosomas tardíos [Denzer et al., 2000]. Estos exosomas se acumulan en endosomas de tipo multivesicular, denominados cuerpos multivesiculares (MVBs). En células T se ha descrito que FasL es almacenado intracelularmente dentro de estos compartimentos [Bossi and Griffiths, 1999; Monleón et al., 2001; Blott et al., 2001]. A su vez, la estimulación

con anti-TCR o con fitohemaglutinina (PHA) en células Jurkat o linfocitos T humanos activados induce la degranulación y fusión de estos cuerpos multivesiculares (MVBs) con la membrana plasmática [Blanchard et al., 2002], con la consiguiente secreción/liberación al exterior celular de las microvesículas/exosomas que contienen mFasL, en una fracción particulada y ultracentrifugable. Como consecuencia de este proceso, FasL es liberado al exterior celular en su forma bioactiva no proteolizada (mFasL de 40 kDa) [Martínez-Lorenzo et al., 1999; Monleón et al., 2001].

El antígeno CD63 se ha descrito como uno de los marcadores específicos presentes en la membrana de estas microvesículas/exosomas [Escola et al., 1998]. CD63 se encuentra presente en los exosomas secretados por células T humanas tras su estimulación a través de TCR [Monleón et al., 2001, Blanchard et al., 2002], pero no se expresa en la membrana plasmática. CD63 es una proteína de la familia de las tetraspaninas que presenta diferentes grados de glicosilación, detectándose en condiciones no reductoras como una glicoproteína heterogénea de 40-60 kDa. Este marcador fue utilizado para analizar si la estimulación con CCh en células JHM1-2.2 inducía la secreción de microvesículas/exosomas al exterior celular. Utilizando protocolos de aislamiento/purificación de exosomas descritos previamente [Martínez-Lorenzo et al., 1999; Blanchard et al., 2002;], se recogieron los sobrenadantes de cultivo de células estimuladas con CCh durante 10 horas y se procedió a la purificación de estos exosomas. Pare ello los sobrenadantes de cultivo de células JHM1-2.2 fueron sometidos a varias centrifugaciones secuenciales a baja velocidad (eliminación de células y de restos celulares), seguidas de ultracentrifugación a 100.000 x g durante 16 horas. La presencia de CD63 en los pellets ultracentrifugados fue analizada por *Western Blotting* (figura 20). Se puede observar como la estimulación con CCh (500 y 50 μ M, 10 horas) indujo un aumento en la detección de CD63 frente al correspondiente pellet del sobrenadante de células sin estimular (puntos control).

La presencia de otro marcador específico de endosomas tardíos, lamp-1 [Lebrand et al., 2002; Kobayashi et al., 2002] fue también analizada. Como se puede observar estos exosomas también contienen FasL, cuya presencia fue analizada utilizando el anticuerpo anti-FasL Q-20. Para verificar que realmente la fracción ultracentrifugada obtenida de los sobrenadantes de cultivo no contenía restos celulares y/o cuerpos apoptóticos, se analizó la presencia de CD45 y CD28, dos marcadores de membrana plasmática. CD45 y CD28 son proteínas transmembrana que se expresan altamente en la membrana plasmática de linfocitos T. Ambos marcadores se encuentran ausentes en los exosomas derivados de células T [Blanchard et al., 2002], excluyendo la posibilidad de que la fracción ultracentrifugada CD63⁺ y lamp-1⁺ derive de restos de membrana plasmática o cuerpos apoptóticos.

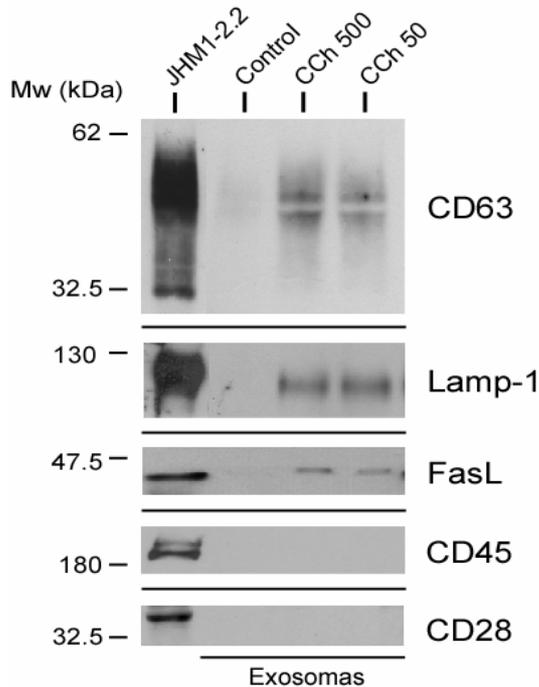


Figura 20. La estimulación de HMIR con CCh induce la secreción de microvesículas con FasL. 2×10^7 células JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh (500 y 50 μM) durante 10 horas. Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos como se indica en materiales y métodos, y sometidos a ultracentrifugación. Se analizó la presencia de CD63, lamp-1, FasL, CD45 y CD28 en los pellets ultracentrifugados mediante WB. El carril izquierdo corresponde a un lisado total de células JHM1-2.2 y fue utilizado como referencia

Resultados previos habían descrito que el mantenimiento de los niveles intracelulares de DAG en el aparato de Golgi se requiere para la dinámica del tráfico intracelular, así como en el proceso de secreción de vesículas emergentes del aparato de Golgi [Sprong et al., 2001; Baron et al., 2002]. Para analizar el requerimiento de DAG en la secreción de exosomas, se utilizó un análogo permeable de DAG, el 1,2-dioctanoyl-*sn*-glicerol (DOG), el cual sufre internalización entre la membrana plasmática y las membranas intracelulares [Baron et al., 2002]. El tratamiento de las células con DOG durante 10 horas fue suficiente para inducir la secreción de microvesículas CD63⁺ y lamp-1⁺ (figura 21). A su vez, el tratamiento con DOG potenció la secreción de microvesículas inducida tras estimulación con CCh.

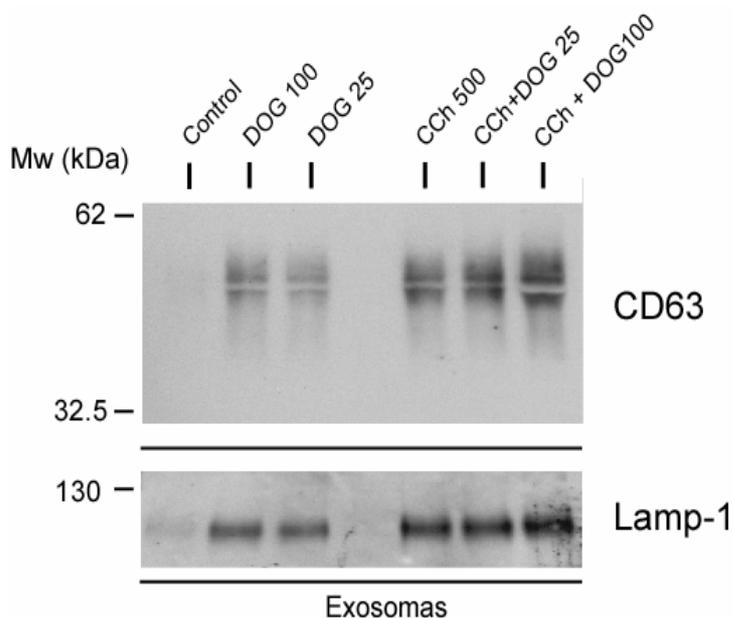


Figura 21. DAG exógeno induce la liberación de microvesículas en células JHM1-2.2. 2×10^7 células JHM1-2.2 fueron tratadas con 1,2-dioctanoyl-*sn*-glicerol (DOG, 100 y 25 $\mu\text{g/ml}$) o con CCh (500 μM) durante 10 horas. Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos como se indica en materiales y métodos, y sometidos a ultracentrifugación. Se analizó la presencia de los marcadores CD63 y lamp-1 mediante WB.

4.12 La inhibición de la DGK α aumenta la secreción de exosomas bioactivos con FasL.

Dado que el efecto inhibitor sobre la AICD llevado a cabo por la DGK α tiene lugar a un nivel post-traduccional, se hipotetizó con la posibilidad de que la DGK α , disminuyendo los niveles de DAG en el aparato de Golgi, pudiera inhibir la formación de vesículas secretoras a partir del TGN y/o la dinámica/formación de los cuerpos multivesiculares. De esta forma la DGK α estaría regulando la muerte celular derivada de la secreción de los exosomas con FasL. Para ello se analizó el posible papel regulador de la DGK α en la secreción de estas microvesículas/exosomas, estudiando el efecto del inhibidor R59949 sobre este proceso. Las células, preincubadas o no con el inhibidor R59949, fueron estimuladas con CCh durante 10 horas y la presencia de CD63 y CD45 en los sobrenadantes de cultivo fue analizada por WB (figura 22). El tratamiento con el inhibidor de la DGK α aumentó la cantidad de CD63, y por lo tanto la cantidad de exosomas secretados tras estimulación con CCh, siendo también estas fracciones negativas para el marcador de membrana plasmática CD45.

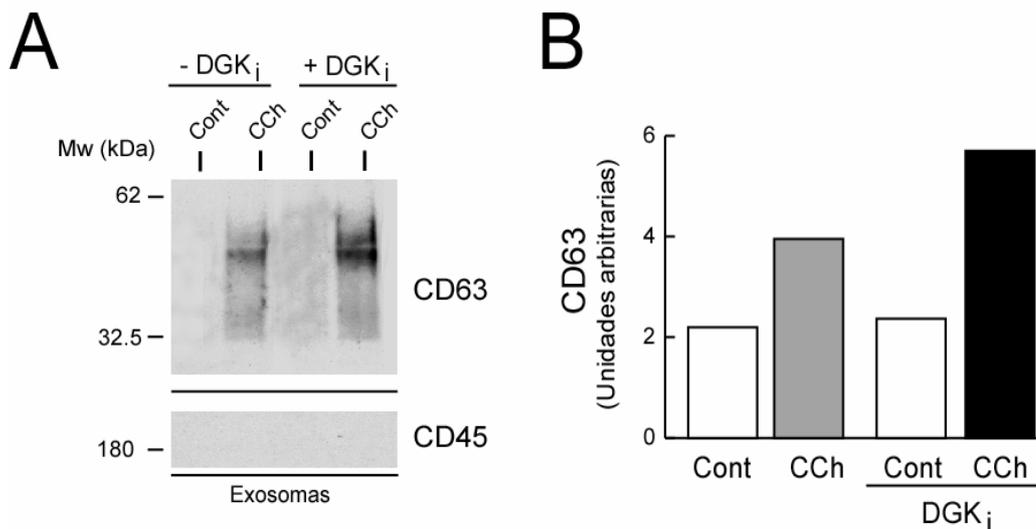


Figura 22. La inhibición farmacológica de la DGK α aumenta la secreción de exosomas. (A) 2×10^7 células JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh (500 μ M) durante 10 horas en presencia o ausencia de R59949 (10 μ M). Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos como se indica en Materiales y Métodos, y sometidos a ultracentrifugación. Se analizó la presencia de CD63 y CD45 en los pellets ultracentrifugados mediante WB. La posición y el tamaño de los pesos moleculares se muestran a la izquierda. (B) Análisis por densitometría de los niveles de CD63 detectados por WB y analizados en (A).

La presencia de FasL en estas fracciones fue analizada por WB, utilizando el anticuerpo anti-FasL Q-20, anticuerpo dirigido contra la parte N-terminal de FasL, que reconoce tanto la forma no procesada de FasL (40 kDa) como la forma N-terminal procesada de FasL (14 kDa). La estimulación con CCh durante 10 horas indujo la secreción de exosomas que contienen FasL (figura 23). La inhibición farmacológica de la DGK α incrementó los niveles de FasL presentes en estas fracciones, lo que concuerda con el aumento de CD63 observado (Figura 22) y, por tanto, con la cantidad de microvesículas secretadas.

Debido a los problemas de especificidad observados con varios anticuerpos comerciales dirigidos contra FasL [Restifo et al., 2000; Strater et al., 2001] se procedió a la validación de la especificidad del anticuerpo Q-20 (que reconoce tanto la forma no procesada de FasL como la forma procesada de 14 kDa) mediante la expresión de FasL en células HEK293. La expresión ectópica de FasL en células no hematopoyéticas induce su localización en la membrana plasmática [Blott et al., 2001], donde es accesible a la acción de las metaloproteasas de la matriz extracelular. En el panel derecho de la figura 23 se muestra el WB contra FasL (utilizando el anticuerpo Q-20) en células HEK293 transfectadas con el vector de expresión pEF4B-FasL y un vector vacío pEF4B. Las células HEK293 transfectadas con el vector para FasL expresan la forma no procesada de FasL (mFasL, 40 kDa), y también se detectaron niveles altos de FasL en su forma procesada (14 kDa). La especificidad del anticuerpo Q-20 también fue validada bloqueando la unión del anticuerpo Q-20 a FasL con el péptido inmunógeno (péptido bloqueante).

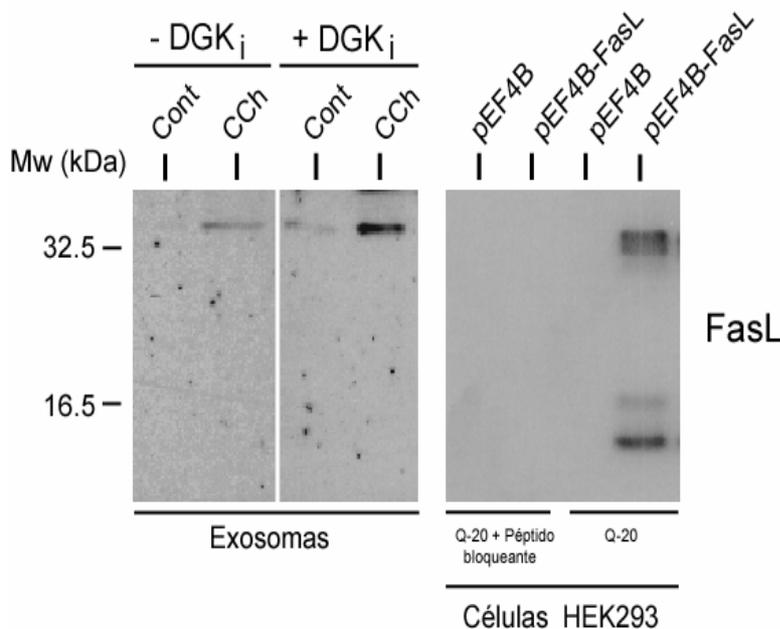


Figura 23. La inhibición de DGK α aumenta la secreción de microvesículas que contienen FasL en su forma no procesada. 2×10^7 células JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh (500 μ M, 10 h) en presencia o ausencia de R59949 (10 μ M). Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos y sometidos a ultracentrifugación. Se analizó la presencia de FasL en los pellets ultracentrifugados, utilizando el anticuerpo anti-FasL Q-20. **Derecha:** células HEK293 transfectadas con vector vacío (pEF4B) o con el vector de expresión pEF4B-FasL.

El análisis de la presencia de FasL en las microvesículas secretadas tras estimulación con CCh muestra como éstas únicamente contienen la forma no procesada de FasL (mFasL, banda de 40 kDa, figura 23), no detectándose la forma procesada de FasL de 14 kDa. Este resultado, junto con el marcaje negativo para CD45 y CD28 (figura 20 y 22), confirma que la fracción purificada por ultracentrifugación de los sobrenadantes de cultivo no deriva de restos contaminantes de membrana plasmática.

4.13 Ensayo de la citotoxicidad de las microvesículas secretadas.

Los resultados anteriores sugerían que el efecto de la inhibición de DGK α sobre el aumento en AICD podría ser debido a un aumento en la secreción de microvesículas/exosomas que contienen FasL en su forma bioactiva no procesada (mFasL). Para confirmar este punto, se analizó la capacidad inductora de apoptosis de la fracción de microvesículas obtenida de los sobrenadantes de cultivo de células efectoras JHM1-2.2 cuando es enfrentada a células diana que expresan el receptor Fas (esquema página siguiente).

Las células efectoras JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh (500 μ M) o fitohemaglutinina (PHAm, 5 μ g/ml, pulso de 5 minutos [Martinez-Lorenzo et al., 1996]. A las 10 horas de estimulación, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y éstos fueron clarificados por centrifugaciones a baja velocidad como se indica en Materiales y Métodos. El sobrenadante clarificado de esta forma fue sometido a ultracentrifugación. A continuación se enfrentó a células diana tanto el sobrenadante ultracentrifugado como el pellet ultracentrifugado (que contiene la fracción de exosomas). Se utilizaron las células Jurkat E6.1 como células diana ya que no expresan el receptor HM1, y por tanto no son sensibles a la muerte celular inducida por CCh, lo que evita así el posible efecto del CCh presente en el medio de cultivo sobre las células diana. A las 15 y 24 horas se analizó la apoptosis inducida mediante marcaje con Anexina V (figura 24A) y análisis de permeabilidad a 7-AAD (figura 24B). Se puede observar que el pellet ultracentrifugado indujo apoptosis cuando fue enfrentado a las células diana Jurkat E6.1, mientras que no se detectó inducción de muerte por parte del sobrenadante ultracentrifugado (sin fracción de microvesículas). La capacidad citotóxica observada fue dependiente del número de células efectoras JHM1-2.2 estimuladas: a mayor número de células (10×10^6), lo cual correspondería con un mayor número de microvesículas secretadas, mayor inducción de apoptosis.

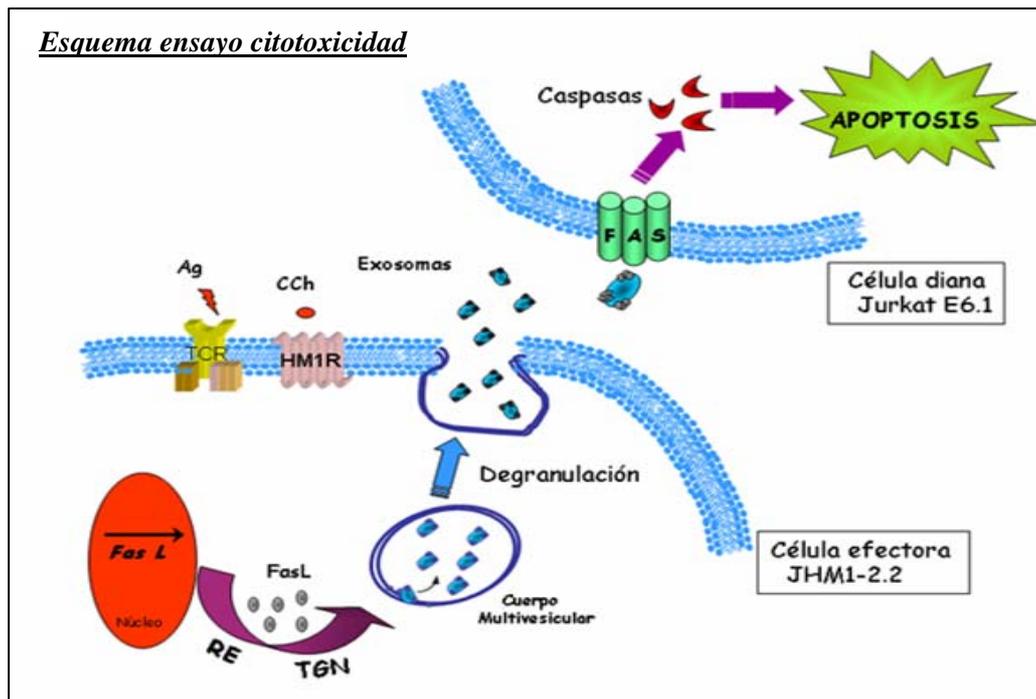
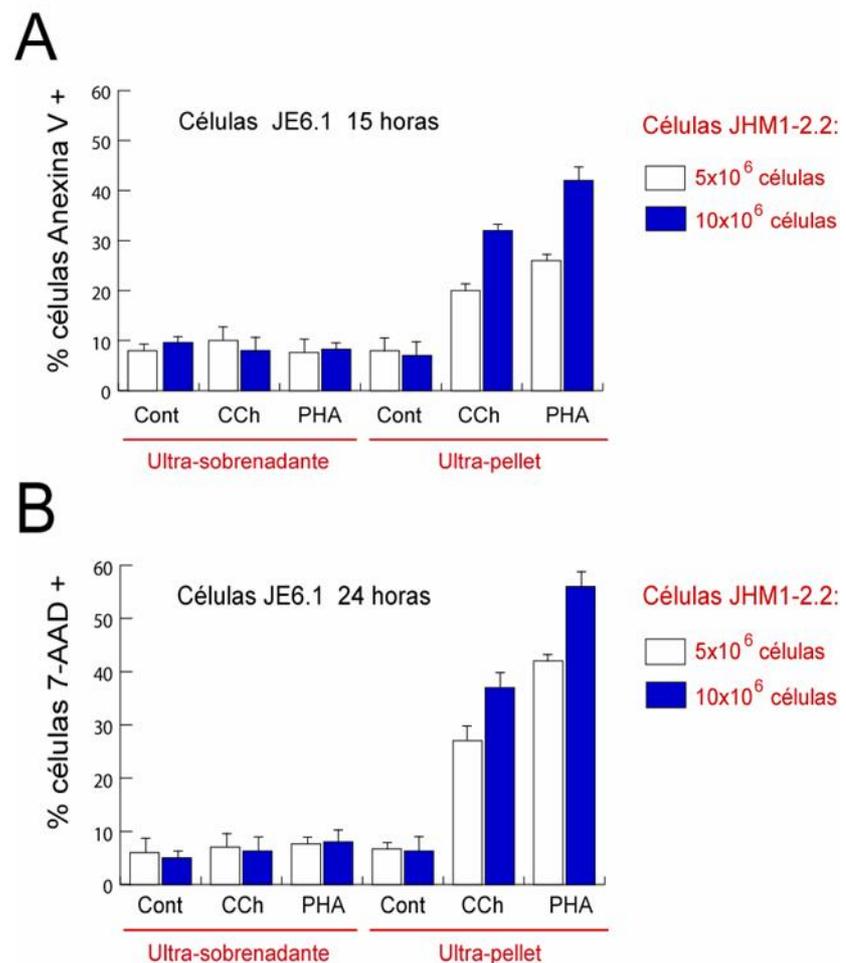


Figura 24. Ensayo de citotoxicidad de las fracciones obtenidas de la ultracentrifugación de los sobrenadantes de cultivo de células JHM1-2.2. Análisis de la muerte celular inducida por el sobrenadante ultracentrifugado (Ultra-Sobrenadante) y por el pellet ultracentrifugado (Ultra-Pellet) de los sobrenadantes de cultivo de 5×10^6 o 10×10^6 células efectoras JHM1-2.2, sobre células diana Jurkat E6.1. Como marcadores de apoptosis se analizó la unión de Anexina V-PE a las 15 horas (A), y permeabilidad a 7-AAD a las 24 horas (B), y análisis por citometría de flujo.



Se ha descrito que la estimulación con PHAm de células Jurkat y blastos T induce la liberación de exosomas que contienen FasL siguiendo un patrón bifásico: un primer pico tras 1 hora de estimulación correspondiente a la liberación de FasL pre-formado (pico de secreción independiente de procesos de síntesis de proteínas), y un segundo pico a partir de 7 horas. Este segundo pico de liberación es dependiente de la síntesis de novo de ARN mensajero para FasL y la posterior síntesis de FasL [Martínez-Lorenzo et al., 1996].

Para analizar la contribución del sistema Fas/FasL en la actividad citotóxica de los sobrenadantes de cultivo de células efectoras JHM1-2.2, así como la participación del FasL pre-existente y del FasL sintetizado *de novo*, se realizaron los siguientes experimentos en paralelo, sobre las células efectoras, sobre la fracción de microvesículas obtenida, así como sobre las células diana:

- 1) Las células efectoras JHM1-2.2 fueron pre-incubadas durante 30 minutos con Ciclosporina A (CsA, 200 ng/ml) antes de la inducción con los diferentes estímulos. La ciclosporina A es un potente inhibidor de la calcineurina [Dhein et al., 1995], induciéndose bloqueo del factor de transcripción NF-ATc y la expresión del gen para FasL [Izquierdo et al., 1996].
- 2) El pellet procedente de la ultracentrifugación fue resuspendido en medio completo y fue incubado durante 30 minutos con el anticuerpo bloqueante anti-FasL NOK-1, antes de su incubación con las células diana Jurkat E6.1.
- 3) Las células diana Jurkat E6.1 fueron pre-incubadas durante 30 minutos con el anticuerpo bloqueante anti-Fas DX2 antes de añadir el pellet ultracentrifugado.

La inhibición de la síntesis *de novo* de FasL con CsA en las células efectoras prácticamente inhibió la apoptosis inducida por el pellet ultracentrifugado de los sobrenadantes de cultivo de células efectoras JHM1-2.2 estimuladas con CCh o PHAm durante 15 horas (Figura 25A y 25B). En cambio, la secreción de microvesículas no se vió afectada por el tratamiento con CsA (figura 25C), confirmándose que la presencia de mFasL sintetizado de novo en los exosomas es necesaria para su capacidad inductora de apoptosis. El bloqueo de la interacción de FasL con su receptor Fas con los anticuerpos bloqueantes anti-Fas DX2 (a nivel de la célula diana) y anti-FasL NOK-1 (a nivel de las microvesículas), también inhibió la apoptosis inducida sobre las células diana Jurkat E6.1.

En el caso de la estimulación de las células efectoras con PHA, sólo se produjo una inhibición parcial de la apoptosis inducida sobre las células diana, sugiriendo la existencia de otros mecanismos a parte de FasL en la inducción de apoptosis, como Apo2L y/o $\text{TNF}\alpha$ [Martinez-Lorenzo et al., 1996].

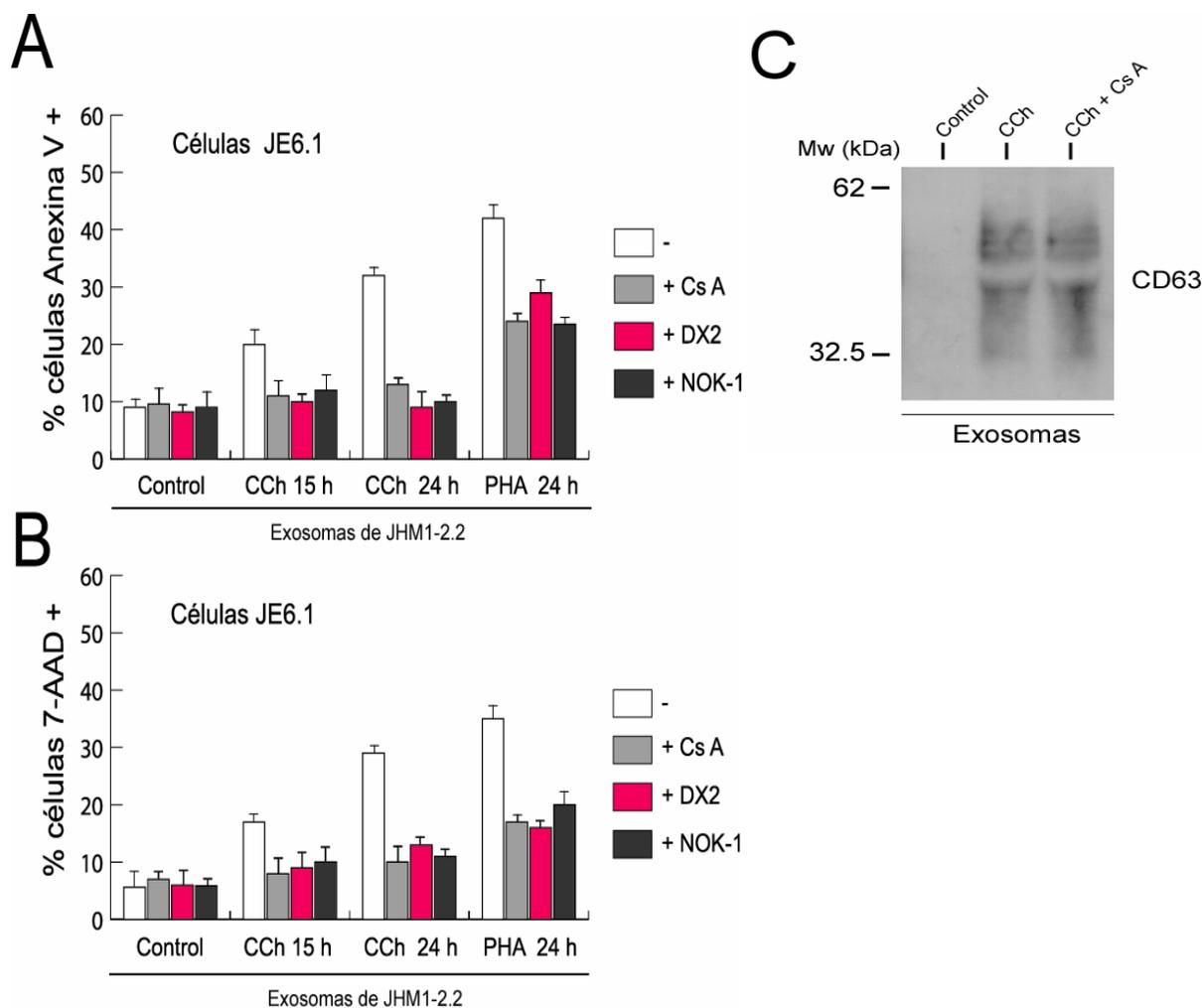


Figura 25. Implicación del sistema Fas/FasL en la citotoxicidad de las microvesículas secretadas por células efectoras JHM1-2.2 sobre células diana Jurkat E6.1. 10×10^6 células efectoras JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh ($500 \mu\text{M}$) o PHA ($5 \mu\text{g/ml}$, pulso de 5 minutos) en presencia o ausencia de CsA (200 ng/ml). A las 10 horas de estimulación la fracción de microvesículas secretadas fue recogida e incubada con anticuerpo anti-FasL NOK-1 ($0,5 \mu\text{g/ml}$) como se indica y fue enfrentada a células diana Jurkat E6.1 en presencia o ausencia del anticuerpo anti-Fas DX2 ($0,5 \mu\text{g/ml}$). La muerte celular inducida a las 15 y 24 horas se analizó mediante marcaje con Anexina V (A) y permeabilidad a 7-AAD (B), mediante citometría de flujo. (C) 20×10^7 células JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh ($500 \mu\text{M}$) durante 10 horas en presencia o ausencia de CsA (200 ng/ml). Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos y sometidos a ultra-centrifugación. Se analizó la presencia de CD63 en los pellets ultracentrifugados mediante WB.

4.14 La inhibición de la DGK α potenció la citotoxicidad de la fracción de exosomas secretada tras estimulación con CCh.

Como se muestra en las figuras 22 y 23, la inhibición farmacológica de DGK α con R59949 en las células JHM1-2.2 indujo una mayor secreción de microvesículas al medio extracelular tras la estimulación con CCh. Por ello, se analizó la capacidad inductora de apoptosis de las microvesículas secretadas en estas condiciones sobre células diana Jurkat E6.1. El tratamiento con R59949 sobre las células efectoras JHM1-2.2 también potenció la capacidad inductora de apoptosis de las microvesículas secretadas (figura 26), proceso que a su vez fue también inhibido por el bloqueo de la interacción Fas/FasL con el anticuerpo bloqueante anti-Fas DX2.

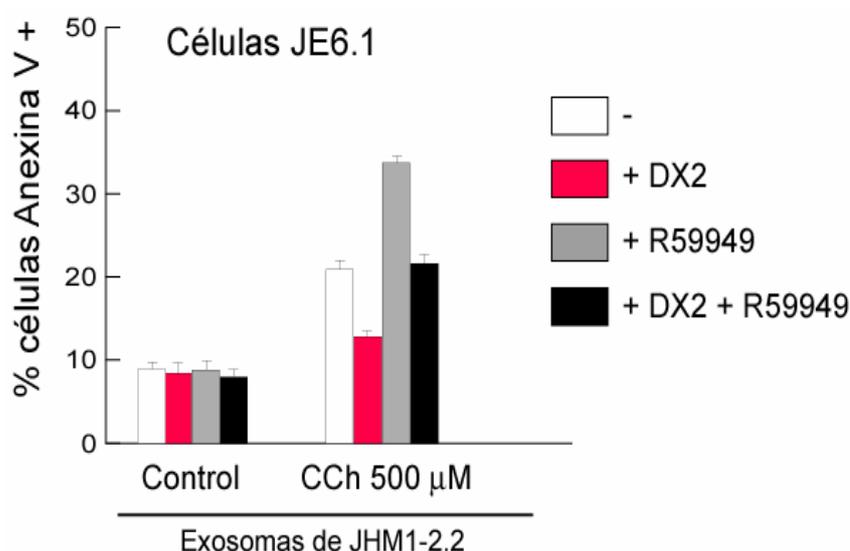


Figura 26. La inhibición farmacológica de DGK α en células efectoras JHM1-2.2 induce una mayor citotoxicidad de las microvesículas secretadas. 10×10^6 células efectoras JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh (500 μ M) en presencia o ausencia de R59949 (10 μ M). Tras 10 horas de estimulación la fracción de microvesículas secretadas fue recogida y enfrentada a células diana Jurkat E6.1 en presencia o ausencia del anticuerpo anti-Fas DX2. La muerte celular fue analizada a las 24 horas mediante marcaje con Anexina V.

A continuación, se realizaron una serie de experimentos complementarios para excluir la posibilidad de que la fracción de microvesículas secretada consistiera de restos celulares o cuerpos apoptóticos procedentes de las células efectoras JHM1-2.2. Con esta finalidad se analizó la apoptosis inducida por CCh a las 10 horas (tiempo en el cual se recogió la fracción de microvesículas secretadas) mediante marcaje con Anexina V. También se analizó la morfología celular mediante microscopía de transmisión. Como control de apoptosis se analizó la muerte

celular inducida por actinomicina D, que induce apoptosis de una manera independiente a la secreción de microvesículas (figura 27 y 28). A las 10 horas de estimulación con CCh en presencia de R59949 no se detectó ni marcaje con Anexina V ni presencia de cuerpos apoptóticos (“blebs”) en las células efectoras JHM1.2-2 (figura 27). En cambio, la actinomicina D indujo a esos tiempos una muerte del $40\pm 6\%$ (% de células AnexinaV +), así como presencia de cuerpos apoptóticos y restos celulares en el medio de cultivo.

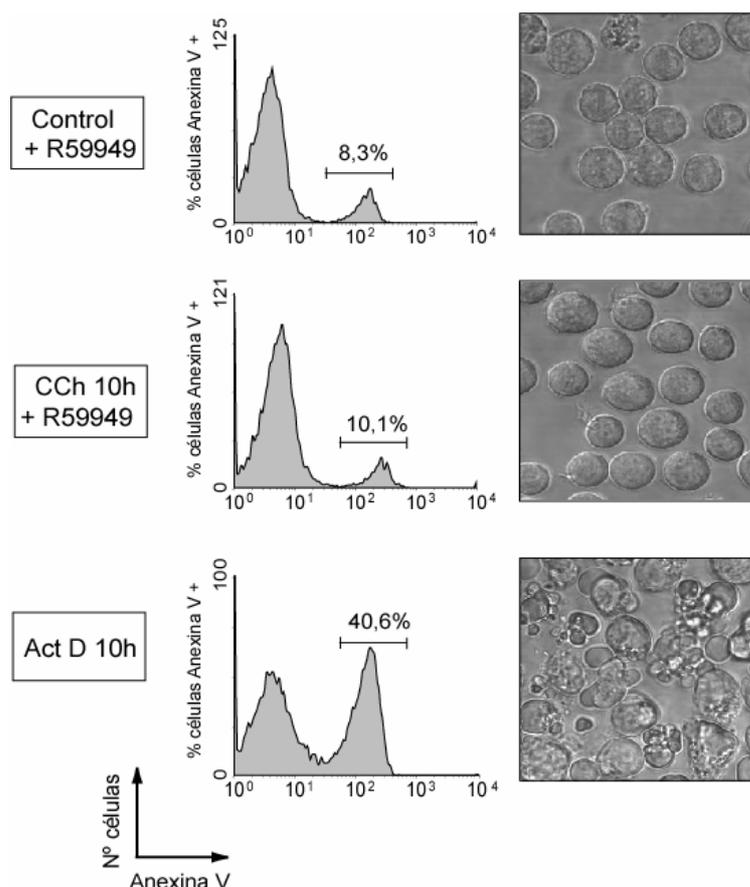


Figura 27. Análisis de la muerte celular inducida por CCh y actinomicina D en células efectoras JHM1-2.2. 1×10^6 células JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh ($500 \mu\text{M}$) en presencia de R59949 ($10 \mu\text{M}$), o actinomicina D ($0.1 \mu\text{g/ml}$) durante 10 μM horas. La apoptosis inducida fue analizada por unión de Anexina V y citometría de flujo (parte izquierda). Para analizar la presencia de cuerpos apoptóticos se tomaron imágenes por microscopía de transmisión a este tiempo (panel derecho).

Como segunda aproximación se analizó la secreción de microvesículas en condiciones donde no había apoptosis, tratando las células efectoras JHM1-2.2 con el inhibidor de caspasas de amplio espectro z-VAD.fmk antes de su estimulación con CCh. Como se observa en la figura 28A, el pre-tratamiento con z-VAD.fmk no afectó a la secreción de microvesículas medida mediante WB revelado con anti-CD63. A su vez, el pellet ultracentrifugado de los sobrenadantes de cultivo de células JHM1-2.2 tratadas con actinomicina D (que presentan un alto porcentaje de muerte celular y la presencia de cuerpos apoptóticos) no contenía microvesículas (figura 28A carril derecho).

A continuación, la capacidad de inducción de apoptosis sobre las células diana Jurkat E6.1 de los pellets ultracentrifugados de células efectoras JHM1-2.2 tratados en estas condiciones fue analizada (Figura 28B). El tratamiento de las células efectoras con z-VAD.fmk no afectó la capacidad citotóxica de las microvesículas secretadas, mientras que la fracción de microvesículas de los sobrenadantes de cultivo en condiciones de apoptosis (JHM1-2.2 tratadas con actinomicina D) no indujo muerte celular sobre células diana Jurkat E6.1.

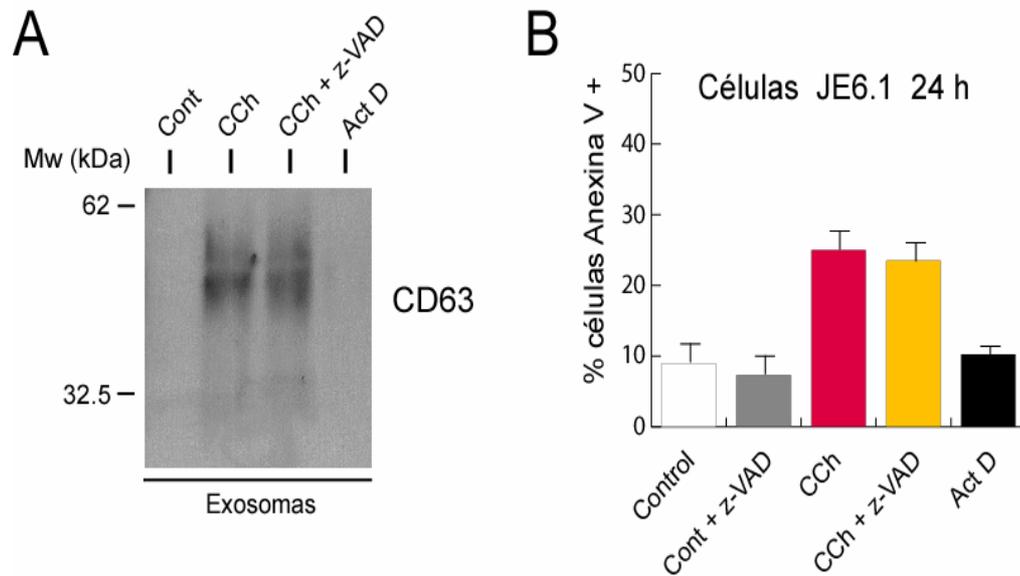


Figura 28. Validación de la fracción de microvesículas obtenida de los sobrenadantes de cultivo de células efectoras JHM1-2.2. (A) 10×10^6 células efectoras JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh (500 μ M) en presencia o ausencia de z-VAD.fmk (100 μ M), o actinomicina D (0.1 μ g/ml). A las 10 horas de estimulación la fracción de microvesículas secretadas fue recogida como se indica en materiales y métodos. Se analizó la presencia de CD63 en los pellets ultracentrifugados mediante WB. La posición y el tamaño de los pesos moleculares se muestran a la izquierda. (B) La fracción de microvesículas obtenida en el apartado (A) fue enfrentado a células diana Jurkat E6.1. La fracción de microvesículas obtenida de células JHM1-2.2 tratadas con z-VAD.fmk fue lavada con medio completo por ultracentrifugación antes de ser enfrentada a células diana Jurkat E6.1 para así eliminar posibles restos de z-VAD.fmk. La muerte celular fue analizada a las 24 horas por marcaje con Anexina V mediante citometría de flujo.

Todos estos resultados confirmaron que la fracción de microvesículas/exosomas obtenida de los sobrenadantes de cultivo de células efectoras JHM1-2.2 estaba formada exclusivamente por microvesículas y no contenía restos celulares o cuerpos apoptóticos. A su vez, estos resultados mostraron que la inducción de apoptosis llevada a cabo por esta fracción era debida a la presencia de microvesículas/exosomas que contienen FasL bioactivo.

4.15 La sobre-expresión de DGK α disminuye la secreción/liberación de exosomas que contienen FasL.

Los últimos resultados muestran que la inhibición de la DGK α aumenta la secreción de microvesículas/exosomas con FasL. De acuerdo con estos resultados, si el efecto inhibitor de la DGK α sobre AICD observado se ejerce a nivel de aumento en la secreción de exosomas con mFasL, entonces la sobre-expresión de DGK α debería inhibir esta secreción. Se analizó la secreción de microvesículas tras estimulación con CCh en células JHM1-2.2 transfectadas con la construcción GFP-DGK α , en comparación con la secreción de microvesículas de células JHM1-2.2 transfectadas con vector vacío pEF4B (figura 29). Para analizar mejor el efecto de la expresión de DGK α , se utilizaron células JHM1-2.2 con un porcentaje de expresión de células GFP⁺ de aproximadamente un 67%. La expresión de DGK α disminuyó la cantidad de microvesículas secretadas. A su vez, la cantidad de FasL asociado con estas microvesículas también disminuyó.

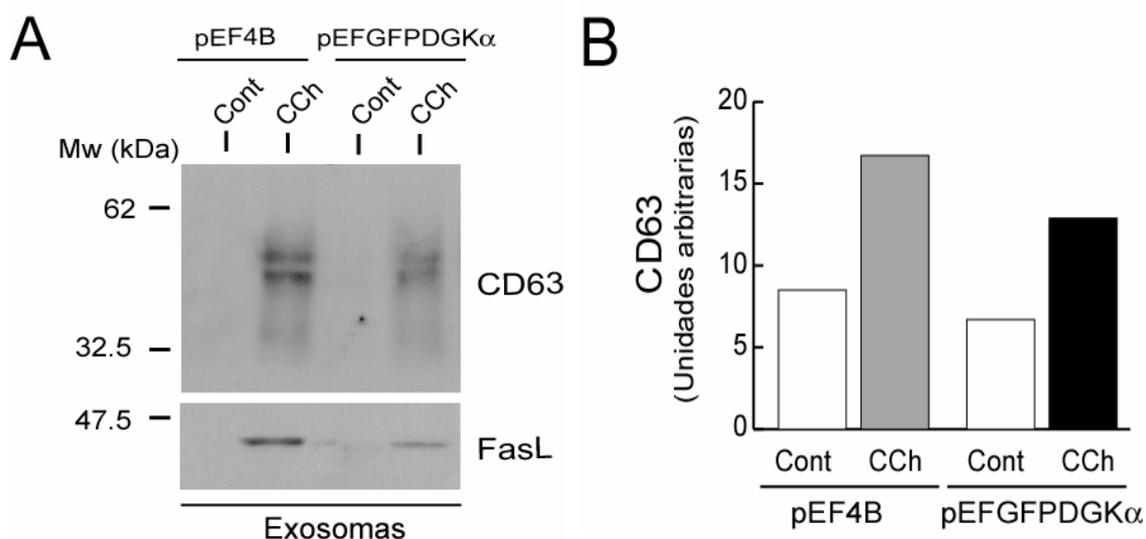


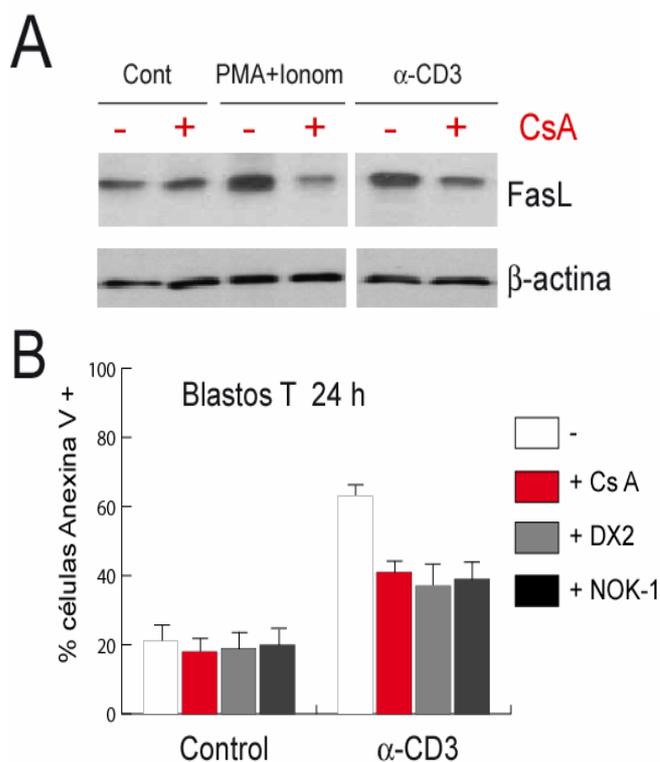
Figura 29. La expresión de DGK α disminuye la secreción de exosomas con FasL. (A) Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con pEFGFP-DGK α o con vector vacío pEF4B. A las 48 horas, 2×10^7 células fueron estimuladas con CCh (500 μ M) durante 10 horas. Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos como se indica en materiales y métodos, y sometidos a ultracentrifugación. Se analizó la presencia de CD63 y FasL (anticuerpo anti-FasL Q-20) en los pellets ultracentrifugados mediante WB. La posición y el tamaño de los pesos moleculares se muestran a la izquierda. (B) Análisis por densitometría de los niveles de CD63 detectados por WB y analizados en (A).

4.16 Implicación del sistema Fas/FasL en la AICD inducida en cultivos primarios de blastos T humanos.

Nos propusimos extender los resultados obtenidos anteriormente en un modelo de línea tumoral T (JHM1-2.2), a cultivos primarios de linfocitos T humanos. Para ello, a partir de sangre periférica de donantes sanos se obtuvieron células mononucleares. A partir de estas células se generaron blastos T por activación de los linfocitos T con el mitógeno fitohemaglutinina (PHAm). Tras tres días de estimulación con PHAm, los blastos T activados se estimularon con interleuquina-2 humana (20 ng/ml, día 0), factor de proliferación de linfocitos T que induce la expansión de los blastos T.

Se analizó la implicación del sistema Fas/FasL en la AICD inducida en blastos T cultivados durante 6 días con IL-2. El análisis por WB de los niveles totales de FasL tras estimulación con PMA más Ionomicina, o con anti-CD3, mostró que el tratamiento con CsA inhibía la inducción de la expresión de FasL (figura 30A). La AICD inducida tras estimulación con PHA o con anti-CD3 fue inhibida parcialmente cuando los blastos T se estimularon en presencia de CsA, sugiriendo la implicación de la síntesis *de novo* de FasL en la inducción de AICD (figura 30B). El bloqueo de la interacción Fas/FasL con los anticuerpos bloqueantes anti-Fas DX2 y anti-FasL NOK-1 también inhibió parcialmente la AICD observada, indicando la presencia de otros mecanismos (Apo2L, TNF α o el sistema perforina/granzimas [Zheng et al., 1995; Martinez-Lorenzo et al., 1999] además del sistema Fas/FasL en la inducción de AICD.

Figura 30. Implicación del sistema Fas/FasL en la AICD inducida en cultivos primarios de blastos T humanos. (A) Blastos T humanos cultivados durante 6 días con IL-2 (20 ng/ml) fueron estimulados con anti-CD3 pegado a plástico (5 μ g/ml) o con PMA (50 ng/ml) más Ionomicina (0.5 μ g/ml) durante 6 horas, en presencia o ausencia de CsA (200 ng/ml). La expresión de FasL se detectó por WB utilizando el anticuerpo anti-FasL Q-20. (B) Blastos T humanos fueron estimulados con anti-CD3 pegado a plástico (5 μ g/ml) durante 24 horas en presencia o ausencia de CsA (200 ng/ml), anticuerpo anti-Fas DX2 (0.5 μ g/ml) o anticuerpo anti-FasL NOK-1 (0.5 μ g/ml) La muerte celular fue analizada por unión de Anexina V y análisis por citometría de flujo.



4.17 La inhibición de DGK α aumenta la AICD inducida en cultivos primarios de blastos T humanos.

A continuación se analizó el efecto del inhibidor de DGKs de tipo I R59949 en la AICD inducida en blastos T humanos tras estimulación con anti-CD3 o con PHA. El tratamiento con el inhibidor de DGKs potenció ligeramente la apoptosis temprana (figura 31A) y la apoptosis tardía (figura 31B) inducida por estos estímulos: de un $38.4 \pm 3\%$ a un $50.3 \pm 6\%$ de células Anexina V⁺ tras estimulación con anti-CD3, y de un $48.4 \pm 2\%$ a un $68.3 \pm 5\%$ de células Anexina V⁺ tras estimulación con PHA.

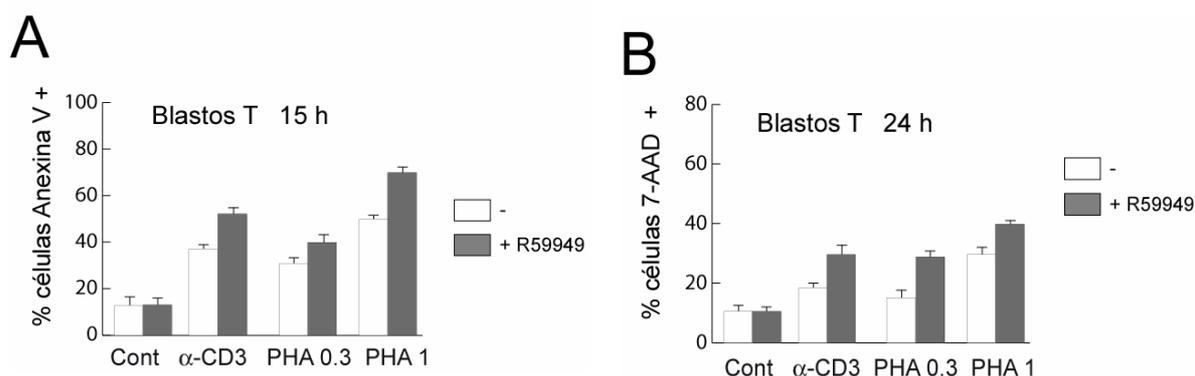


Figura 31. La inhibición de DGKs en cultivos de blastos T humanos aumenta la AICD. Blastos T humanos cultivados durante 6 días con IL-2 (20ng/ml) fueron pre-incubados con R59949 (10 μ M) durante 30 minutos. Posteriormente fueron estimulados con anti-CD3 pegado a plástico (5 μ g/ml) o con PHAm (0.3 y 1 μ g/ml) durante 24 horas. La muerte celular fue analizada mediante marcaje con Anexina V (A) y permeabilidad a 7-AAD (B), y análisis por citometría de flujo.

El análisis de la expresión de los marcadores CD4 y CD8 en la población de blastos T humanos cultivados durante 6 días con IL-2 mostró que el cultivo estaba formado por una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ del 60% y una subpoblación CD8⁺ del 40% (figura 32A). La estimulación con anti-CD3 o con PHA constituyen un estímulo de naturaleza policlonal que podría inducir citotoxicidad mediada por los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) presentes en la población de blastos T. Esta citotoxicidad podría estar mediada por la expresión de FasL en la membrana plasmática de los CTLs, así como por la secreción de perforina/granzimas [Stinchcombe et al., 1999], lo que podría contribuir a la AICD inducida. Con el fin de descartar estos mecanismos de inducción de apoptosis, así como excluir la contribución de diferentes mecanismos apoptóticos actuando sobre cada subpoblación de blastos T [Zheng et al., 1995], se analizó la muerte celular inducida en la subpoblación CD4⁺ purificada. Las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ presentes en los cultivos de blastos T fueron separadas mediante MACS (“Magnetic Automatic Cell Sorting”). La verificación de la correcta separación de las dos subpoblaciones fue realizada mediante análisis de la expresión en membrana plasmática de los marcadores CD4 y CD8 mediante citometría de flujo (figura 32B).

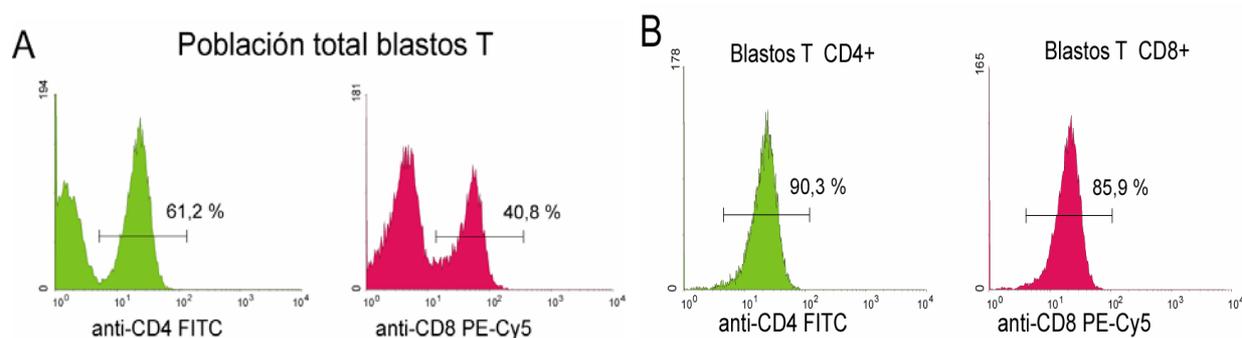


Figura 32. Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD4 y CD8 blastos T humanos. (A) Blastos T humanos cultivados durante 6 días con IL-2 (20ng/ml) fueron recogidos. Se analizó la expresión en superficie de CD4 y CD8 utilizando anticuerpo anti-CD4 conjugado con FITC y anticuerpo anti-CD8 conjugado con PE-Cy5, y posterior análisis por citometría de flujo. (B) La subpoblación de blastos T CD4⁺ fue separada mediante MACS por selección positiva y la subpoblación CD8⁺ fue separada por selección negativa.. El marcador indica el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺.

A continuación, se analizó el efecto del inhibidor de DGKs de tipo I R59949 en la muerte inducida por anti-CD3 y PHAm en la subpoblación de linfoblastos T CD4⁺. El pre-tratamiento con R59949 potenció la AICD inducida por estos estímulos (figura 33). El bloqueo de la interacción Fas/FasL con los anticuerpos bloqueantes DX2 y NOK-1, así como la inhibición de la síntesis de novo de FasL con CsA, revertió el efecto potenciador de AICD ejercido por el R59949 (figura 33).

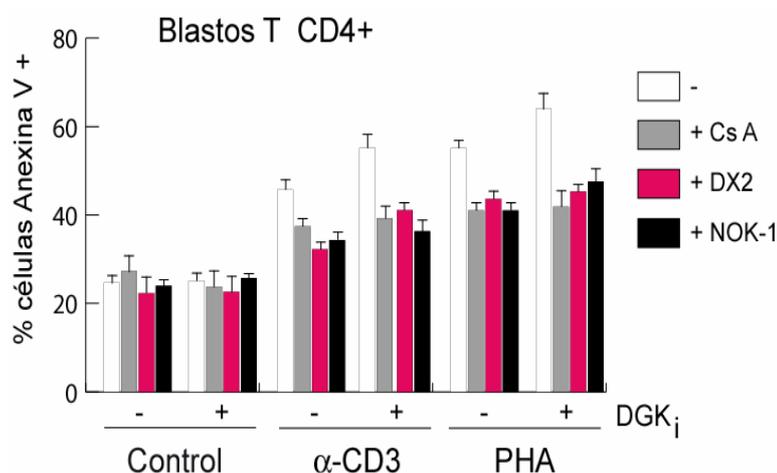


Figura 33. La inhibición de DGKs aumenta la AICD en linfoblastos T CD4⁺. Blastos T CD4⁺ fueron pre-incubados con R59949 (10 μ M), CsA (200 ng/ml), anticuerpo bloqueante anti-Fas DX2 (0.5 μ g/ml) y anticuerpo bloqueante anti-FasL NOK-1 (0.5 μ g/ml) durante 30 minutos. A continuación fueron estimulados con anti-CD3 pegado a plástico (5 μ g/ml) o con PHAm (0.5 μ g/ml) durante 24 horas. La muerte celular fue analizada mediante marcaje con Anexina V y análisis por citometría de flujo.

4.18 La inhibición de la DGK α aumenta la secreción de exosomas que contienen mFasL bioactivo en linfoblastos T CD4⁺.

Con el fin de analizar la contribución de la secreción de exosomas conteniendo FasL a la AICD inducida tras estimulación del TCR, se analizó el efecto del inhibidor de DGKs R59949 en la secreción de exosomas tras la estimulación con anti-CD3 y PHA. El tratamiento con R59949 potenció la secreción de exosomas (aumento en la fracción CD63+) que contienen FasL sin procesar (mFasL de 40 kDa) en células JHM1-2.2 estimuladas con anti-CD3 (figura 34, izquierda). Cuando linfoblastos T CD4⁺ fueron estimulados con anti-CD3 o con PHA (figura 34, derecha), se observó también un aumento en la secreción de exosomas con mFasL en los blastos T CD4⁺ tratados con R59949.

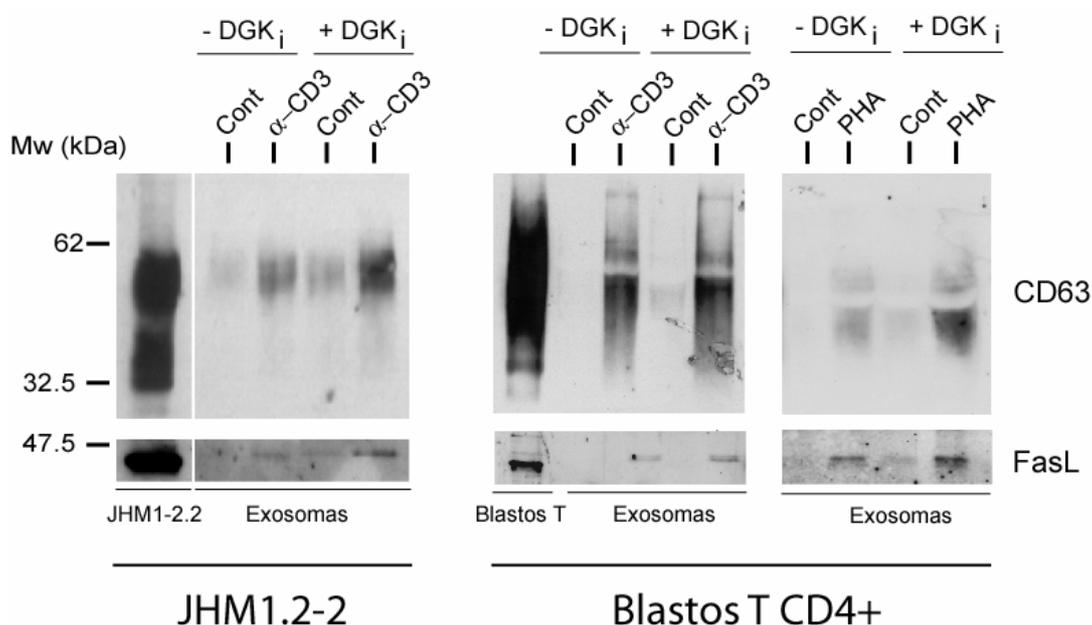


Figura 34. La inhibición de DGK α aumenta la secreción de exosomas que contienen mFasL. 20×10^6 células JHM1-2.2 (izquierda) o blastos T CD4⁺ (derecha) fueron estimuladas con anti-CD3 pegado a plástico (0.5 $\mu\text{g/ml}$) o con PHAm (pulso de 5 minutos con 50 $\mu\text{g/ml}$) durante 10 horas en presencia o ausencia de R59949 (10 μM). Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos, y posteriormente sometidos a ultracentrifugación. Se analizó la presencia de CD63 y FasL en los pellets ultracentrifugados mediante WB.

A continuación la capacidad inductora de apoptosis de la fracción de microvesículas obtenida de los sobrenadantes de cultivo de linfoblastos T CD4⁺ efectoras fue analizada (figura 35). Cuando las células diana Jurkat E6.1 fueron enfrentadas con la fracción de microvesículas obtenidas de blastos T CD4⁺, éstas indujeron muerte celular. El tratamiento de los blastos T efectoras con el inhibidor de DGKs R59949 potenció la citotoxicidad de la fracción de microvesículas. A su vez, la muerte celular observada dependía del sistema Fas/FasL: tanto la

inhibición de la síntesis de FasL con CsA en los blastos T efectores, como el bloqueo del receptor Fas con DX2 en las células diana Jurkat E6.1 redujeron la apoptosis inducida por las microvesículas secretadas.

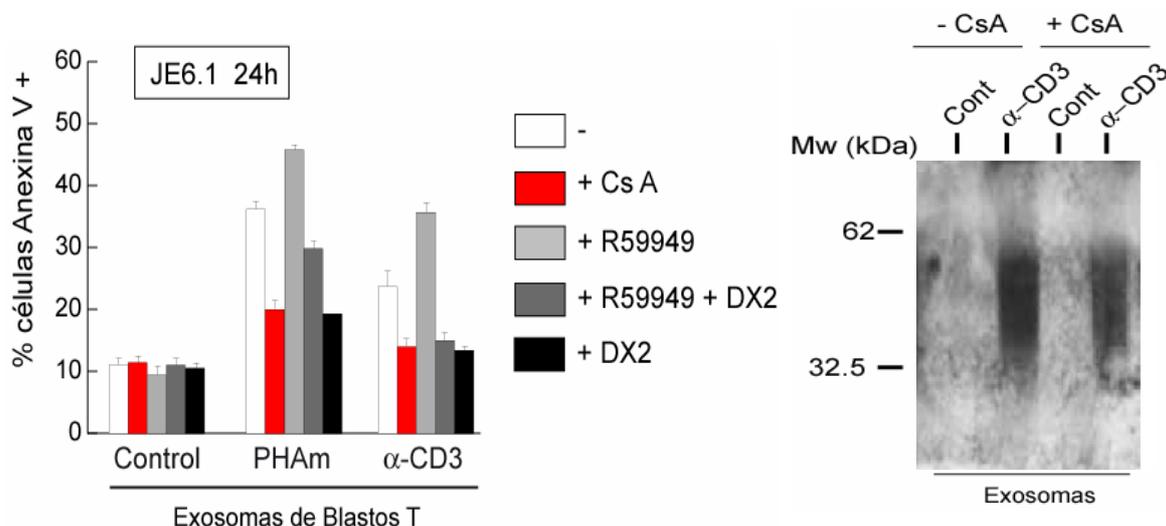


Figura 35. Implicación del sistema Fas/FasL en la citotoxicidad de las microvesículas secretadas por blastos T CD4⁺ humanos. 20×10^6 blastos T CD4⁺ fueron estimuladas con anti-CD3 pegado a plástico (0.5 μ g/ml) o PHAm (5 μ g/ml, pulso de 5 minutos) en presencia o ausencia de CsA (200 ng/ml) o R59949 (10 μ M). A las 10 horas de estimulación, la fracción de microvesículas secretadas fue recogida y enfrentada a células diana Jurkat E6.1 en presencia o ausencia del anticuerpo anti-Fas DX2. La muerte celular fue analizada a las 24 horas mediante marcaje con Anexina V y análisis por citometría de flujo (izquierda). 2×10^7 blastos T CD4⁺ fueron estimuladas con anti-CD3 (0.5 μ g/ml, 10 horas) en presencia o ausencia de CsA (200 ng/ml). Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos y sometidos a ultracentrifugación. Se analizó la presencia de CD63 en los pellets ultracentrifugados mediante WB (derecha).

4.19 Efecto de la estimulación con CCh sobre la formación de endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares (MVBs).

Como se comentó en el apartado 4.11, los exosomas o microvesículas son pequeñas estructuras de doble membrana que se forman por invaginación interna hacia el lumen de la membrana de endosomas tardíos [Denzer et al., 2000]. Estos exosomas se acumulan en endosomas de tipo multivesicular, denominados cuerpos multivesiculares (MVBs). La dinámica intracelular del tráfico de vesículas de tipo secretor se inicia mediante la formación de vesículas a nivel de la red *trans* del aparato de Golgi (TGN, del inglés “*trans golgi network*”), la posterior formación de cuerpos multivesiculares (MVBs) y, como último paso, la fusión de

estos MVBs con la membrana plasmática. Como primera aproximación al estudio de la generación intracelular de los exosomas, se analizó mediante microscopía confocal el efecto de la estimulación del TCR en blastos T humanos (figura 36) y de la estimulación del receptor HM1R en células JHM1-2.2 (figura 37), sobre la formación de vesículas y cuerpos multivesiculares. Tras 6 horas de estimulación se recogieron las células, fueron fijadas y se procedió a su marcaje para CD63 (marcador específico de cuerpos multivesiculares MVBs/exosomas, apartado 4.11). Como se pudo observar, el tratamiento con anti-CD3 (blastos T, figura 36) o con CCh (células JHM1-2.2, figura 37) durante 6 horas indujo un aumento en el marcaje para CD63 en ambos tipos celulares (mayor intensidad en el patrón punteado/vesicular observado con anti-CD63), indicando un incremento en el proceso de formación de estas estructuras. En el caso de los blastos T el marcaje para CD63 obtenido muestra una acumulación pronunciada para este marcador en la región perinuclear de la célula (figura 36).

Figura 36. Distribución intracelular de CD63. Blastos T humanos cultivados durante 6 días con IL-2 fueron estimulados con anti-CD3 pegado a plástico (0.5 $\mu\text{g/ml}$). Se realizó un marcaje intracelular utilizando mAb anti-CD63 y posterior anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC. Se tomaron imágenes mediante microscopía confocal a diferentes planos y se procedió a su proyección en el eje Z.

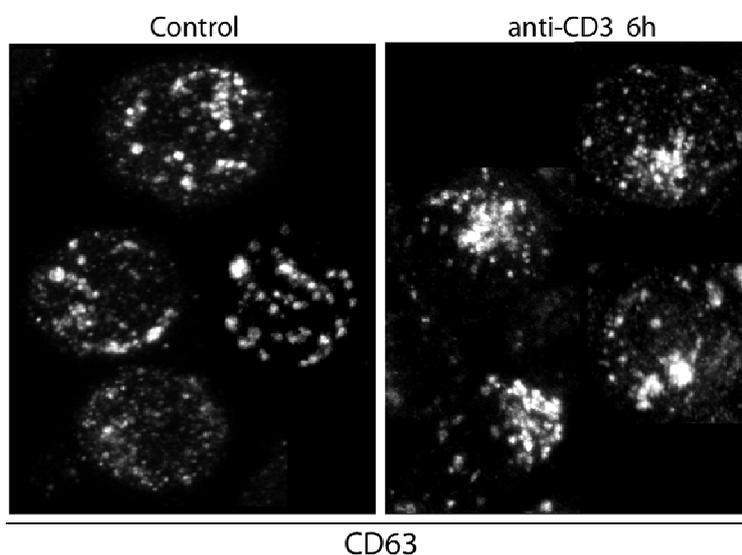
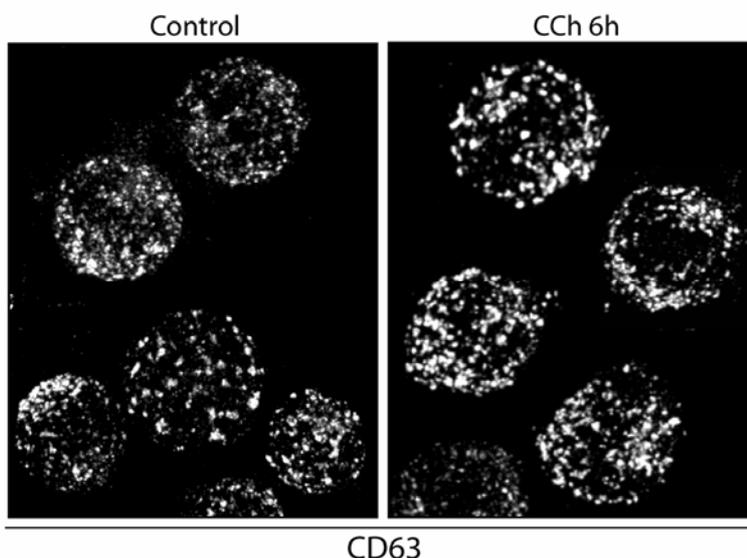


Figura 37. Distribución intracelular de CD63. Células JHM1-2.2 fueron estimulados con CCh (500 μM) durante 6 horas. Se realizó un marcaje intracelular utilizando mAb anti-CD63 y posterior anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC. Se tomaron imágenes mediante microscopía confocal a diferentes planos y se procedió a su proyección en el eje Z.

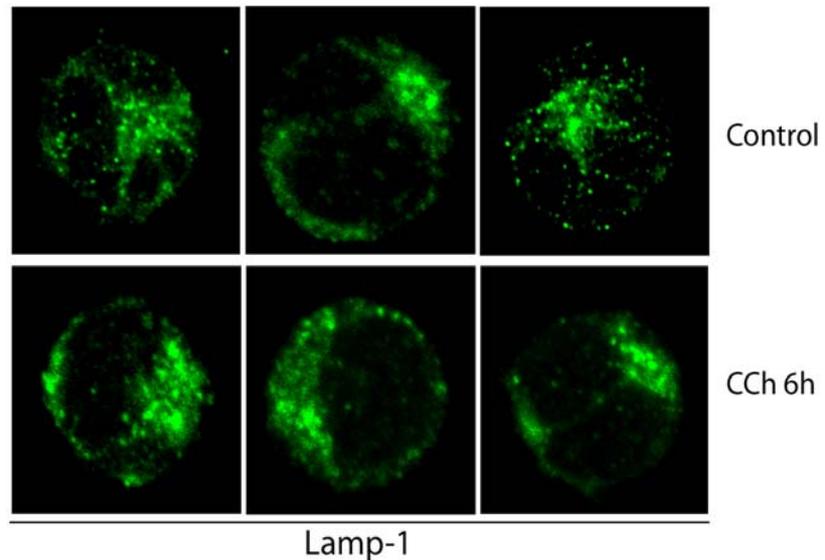


Resultados

También se analizó el efecto del CCh en la distribución y en la localización de otro marcador específico de endosomas tardíos, lamp-1, proteína asociada a la membrana de lisosomas [Kobayashi et al., 2002] (figura 38). En células control, se observa una acumulación en la región perinuclear junto con un marcaje punteado. Tras estimulación con CCh se detectó un mayor marcaje de lamp-1.

Figura 38. Distribución intracelular de lamp-1.

Células JHM1-2.2 fueron estimulados con CCh (500 μ M, 6h). Se realizó un marcaje intracelular utilizando mAb anti-lamp-1 y posterior anticuerpo anti-ratón conjugado con FITC. Se tomaron imágenes de diferentes planos de la célula mediante microscopía confocal y se procedió a su proyección en el eje Z.



4.20 Estudio de la formación de endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares (MVBs).

A la vista de estos resultados, se abordó el estudio de la formación intracelular de estructuras vesiculares/endosomas tardíos/MVBs con una aproximación bioquímica mediante fraccionamientos subcelulares en gradientes de densidad. Esta técnica, que ha sido utilizada previamente para aislar lisosomas secretores que contienen FasL en linfocitos T citotóxicos [Bossi and Griffiths, 1999], se aplicó en células JHM1-2.2 para estudiar a nivel intracelular el proceso y la dinámica del tráfico de proteínas, así como la localización y la distribución de diferentes marcadores durante este proceso. Para ello se procedió al lisado suave por homogeneización mecánica de células JHM1-2.2. El lisado se sometió a centrifugación a alta velocidad en un gradiente de densidad en Percoll, separándose los diferentes componentes subcelulares en función de su densidad. Se recogieron fracciones de volumen constante desde la parte superior del gradiente hasta el final (25 fracciones en total) y posteriormente se sometieron a electroforesis en geles SDS y WB. En primer lugar, se analizó la distribución y localización de los marcadores de MVBs/exosomas CD63 y lamp-1 [Lebrand et al., 2002;

Kobayashi et al., 2002] mediante WB. Las células sin estimular (control) o estimuladas con CCh (6h) fueron sometidas a fraccionamiento subcelular, y las fracciones obtenidas fueron analizadas para diferentes marcadores. En células control, en las fracciones 5, 9, 12, 13 y 25 se localiza mayoritariamente el marcaje para CD63, que en el caso de lamp-1 fue predominantemente en las fracciones 5, 12 y 13 (figura 39) Tras estimulación con CCh (6 horas) se observa un aumento en las fracciones CD63⁺, así como lamp-1⁺, lo cual reflejó bioquímicamente, junto con los datos de microscopía confocal, un incremento en la formación de estructuras vesiculares/MVBs (fracciones CD63⁺, lamp-1⁺) [Kobayashi et al., 2002].

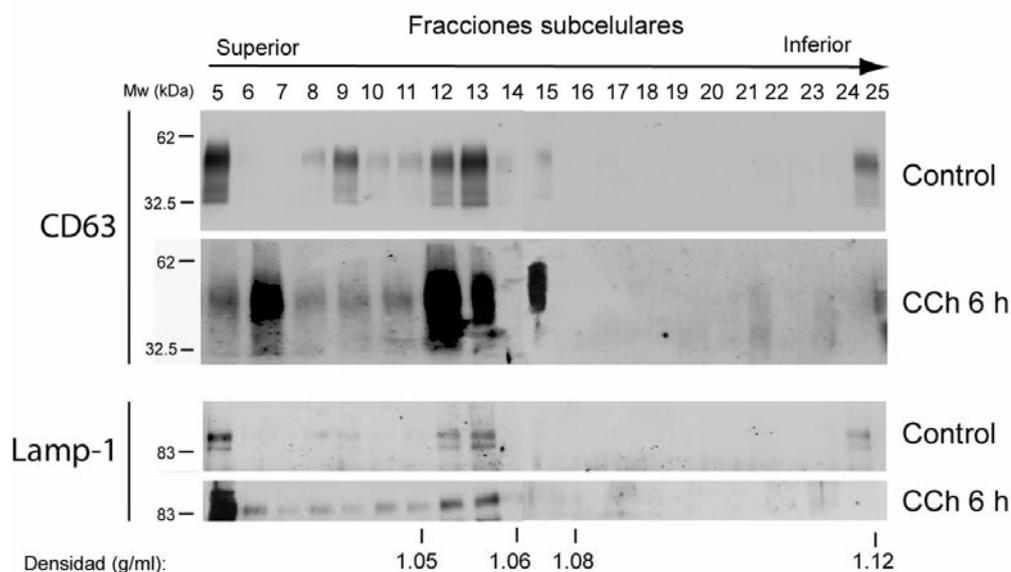


Figura 39. Localización intracelular de CD63 y lamp-1. Células JHM1-2.2 control o estimuladas con CCh (500 μ M, 6 h) fueron sometidas a fraccionamiento subcelular en gradiente de densidad en percoll.. La presencia de CD63 y lamp-1 fue analizada mediante WB en las fracciones obtenidas. Parte inferior: valores aproximados de densidad en el gradiente de percoll.

En linfocitos T citotóxicos, FasL es almacenado dentro de lisosomas de tipo secretor con características de cuerpos multivesiculares [Bossi and Griffiths, 1999; Monleón et al., 2001; Blott et al., 2001]. En células Jurkat, FasL pre-existente co-localiza intracelularmente con el marcador de MVBs CD63 [Monleon et al., 2001], lo que nos llevó a analizar la localización de FasL en estas fracciones subcelulares (figura 40). En células sin estimular la fracción de FasL pre-existente se localiza en las fracciones 5, 9, 12, 13 y 25 del gradiente, al igual que la localización para CD63 y lamp-1 (figura 39). Tras estimulación con CCh, que induce la íntesis *de novo* de FasL, la cantidad de FasL aumenta también en estas fracciones, al igual que ocurría para CD63 y lamp-1, lo que indicaría su acumulación y localización en estas fracciones.

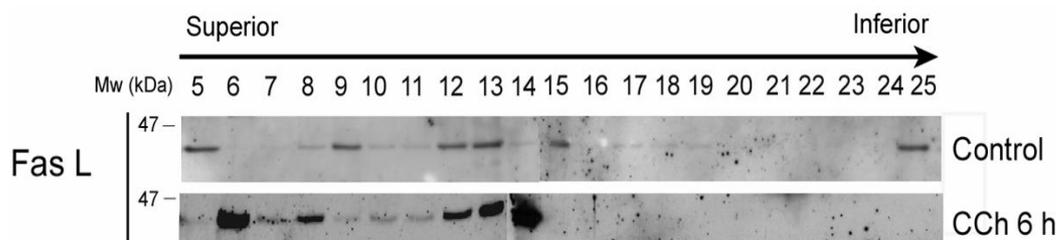
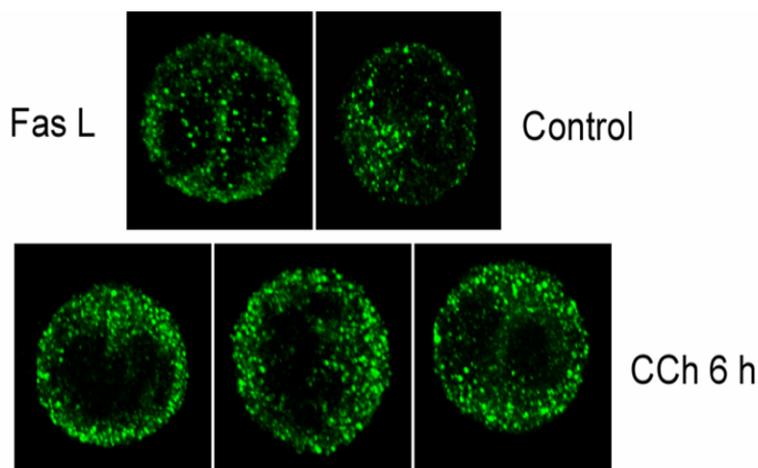


Figura 40. Localización intracelular de FasL. Células JHM1-2.2 control o estimuladas con CCh (500 μ M, 6 horas) fueron sometidas a fraccionamiento subcelular en gradiente de densidad. La presencia de FasL fue analizada mediante WB utilizando el anticuerpo anti-FasL Q-20.

El efecto de la estimulación con CCh sobre la expresión y la distribución de FasL se analizó también mediante microscopía confocal (figura 41). En células sin estimular, se observó un patrón intracelular vesicular para el FasL pre-formado, que aumentó tras la estimulación con CCh. Por tanto, mediante microscopía confocal y fraccionamiento subcelular, se podría analizar el proceso de formación de MVBs y los posibles reguladores de dicho proceso.

Figura 41. Distribución intracelular de FasL. Células JHM1-2.2 fueron estimulados con CCh (500 μ M, 6h). Se realizó un marcaje intracelular utilizando Ab anti-FasL (Q-20 ab) y posterior anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con FITC. Se tomaron imágenes mediante microscopía confocal a diferentes planos y se procedió a su proyección en el eje Z.

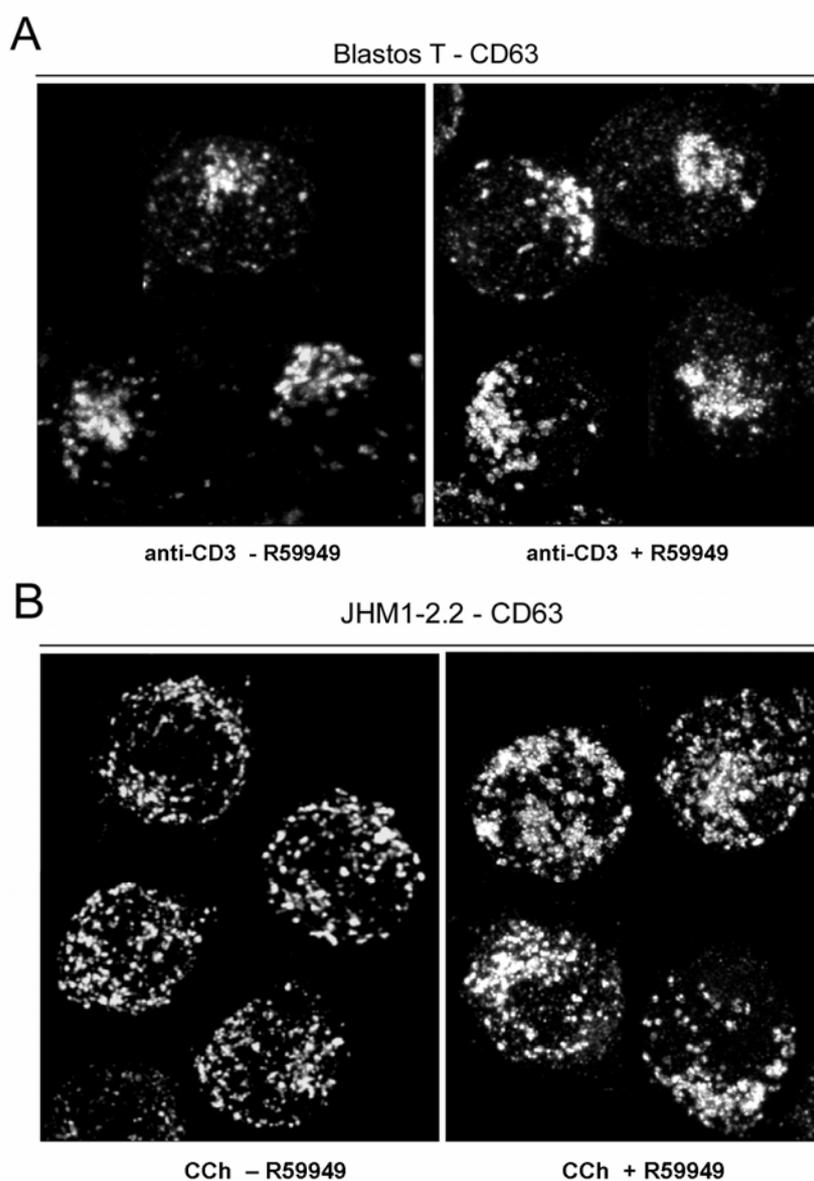


4.21 El inhibidor de DGKs R59949 induce cambios en la distribución y la localización de endosomas tardíos/MVBs.

Se ha descrito que el mantenimiento de los niveles pre-existentes de DAG en el aparato de Golgi es necesario para una dinámica correcta de la red *trans* del aparato de Golgi (TGN) [Baron et al., 2002], así como para la formación de vesículas secretoras desde el TGN [Sprong et al., 2001b]. En estos estudios, la inhibición farmacológica de la producción de DAG, daba

como resultado el bloqueo del transporte de proteínas desde el TGN hacia la membrana plasmática [Baron et al., 2002]. Estos hechos, junto con los resultados obtenidos en los apartados 4.12-4.15, los cuales mostraban que las alteraciones en la vía DAG/DGK α afectaban la secreción de microvesículas, nos llevaron a estudiar el efecto del inhibidor de DGKs de tipo I R59949 sobre la formación de vesículas, endosomas tardíos y de cuerpos multivesiculares (MVBs) que contienen los exosomas. Mediante microscopía confocal se analizó el efecto de R59949 sobre la distribución y localización del marcador CD63 en blastos T humanos estimulados durante 6 horas con anti-CD3 (estimulación del TCR) (figura 42A) y en células JHM1-2.2 estimuladas con CCh (estimulación del receptor HM1R) (figura 42B). El proceso de formación de estructuras vesiculares/MVBs que se produce tras estimulación de los receptores fue alterado por el tratamiento en ambos tipos celulares con el inhibidor R59949, observándose una distribución del patrón punteado de tipo vesicular con mayor intensidad, y una acumulación notable de estas estructuras vesiculares CD63⁺ (MVBs) en el interior celular.

Figura 42. Efecto del inhibidor de DGKs R59949 sobre la distribución intracelular de CD63. Blastos T humanos cultivados durante 6 días con IL-2 fueron estimulados con anti-CD3 pegado a plástico (0.5 μ g/ml) (A) y células JHM1-2.2 fueron estimulados con CCh (500 μ M, 6h) (B), en presencia o ausencia de R59949 (10 μ M). Se realizó un marcaje intracelular utilizando mAb anti-CD63 y posterior anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC. Se tomaron imágenes mediante microscopía confocal a diferentes planos y se procedió a su proyección en el eje Z.



El efecto del inhibidor R59949 sobre la distribución intracelular de CD63 observada mediante microscopía fue también confirmado bioquímicamente en fraccionamientos subcelulares (figura 43). El tratamiento con R59949 produjo una acumulación mayor de CD63 en las fracciones del gradiente de densidad, mostrando una alteración en la distribución de CD63 y una mayor producción de estructuras subcelulares CD63⁺.

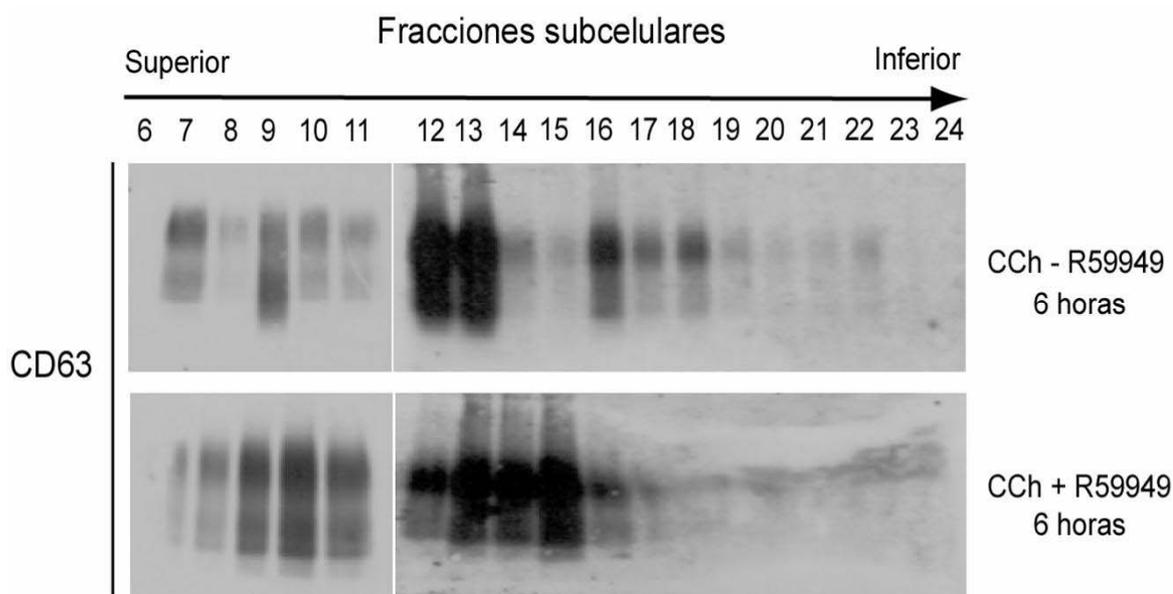


Figura 43. Localización subcelular de CD63. Células JHM1-2.2 estimuladas con CCh (500 μ M, 6 horas), en presencia o ausencia de R59949 (10 μ M), fueron sometidas a fraccionamiento subcelular en gradiente de densidad. La presencia de CD63 fue analizada mediante WB en las diferentes fracciones obtenidas.

Algunos lípidos son reguladores esenciales del tráfico intracelular de proteínas, aunque se conoce poco sobre su papel específico en estos procesos. Existen evidencias que sugieren la implicación de lípidos cuyos niveles pueden estar modulados por la actividad DGK, como el ácido liso(bis)fosfatídico (LBPA) y el ácido fosfatídico (PA), en la formación de vesículas desde el aparato de Golgi, así como en la formación de los cuerpos multivesiculares (MBVs) [Topham et al., 1999; Lebrand et al., 2002; Kobayashi et al., 2002]. En concreto, el ácido liso(bis)fosfatídico (LBPA) se encuentra enriquecido en las membranas internas de los MBVs co-localizando con lamp-1 y CD63 en los endosomas de tipo tardío [Kobayashi et al., 2002]. Por este motivo se analizó mediante microscopía confocal el efecto del inhibidor R59949 sobre la distribución de LBPA.

La figura 44 muestra como el tratamiento con CCh en células JHM1-2.2 (panel intermedio) induce formación de cuerpos multivesiculares (estructuras LBPA⁺), mientras que el tratamiento con R59949 (panel inferior) también afectó, al igual que lo observado para CD63, la distribución de estas estructuras, observándose un mayor número e intensidad de las mismas.

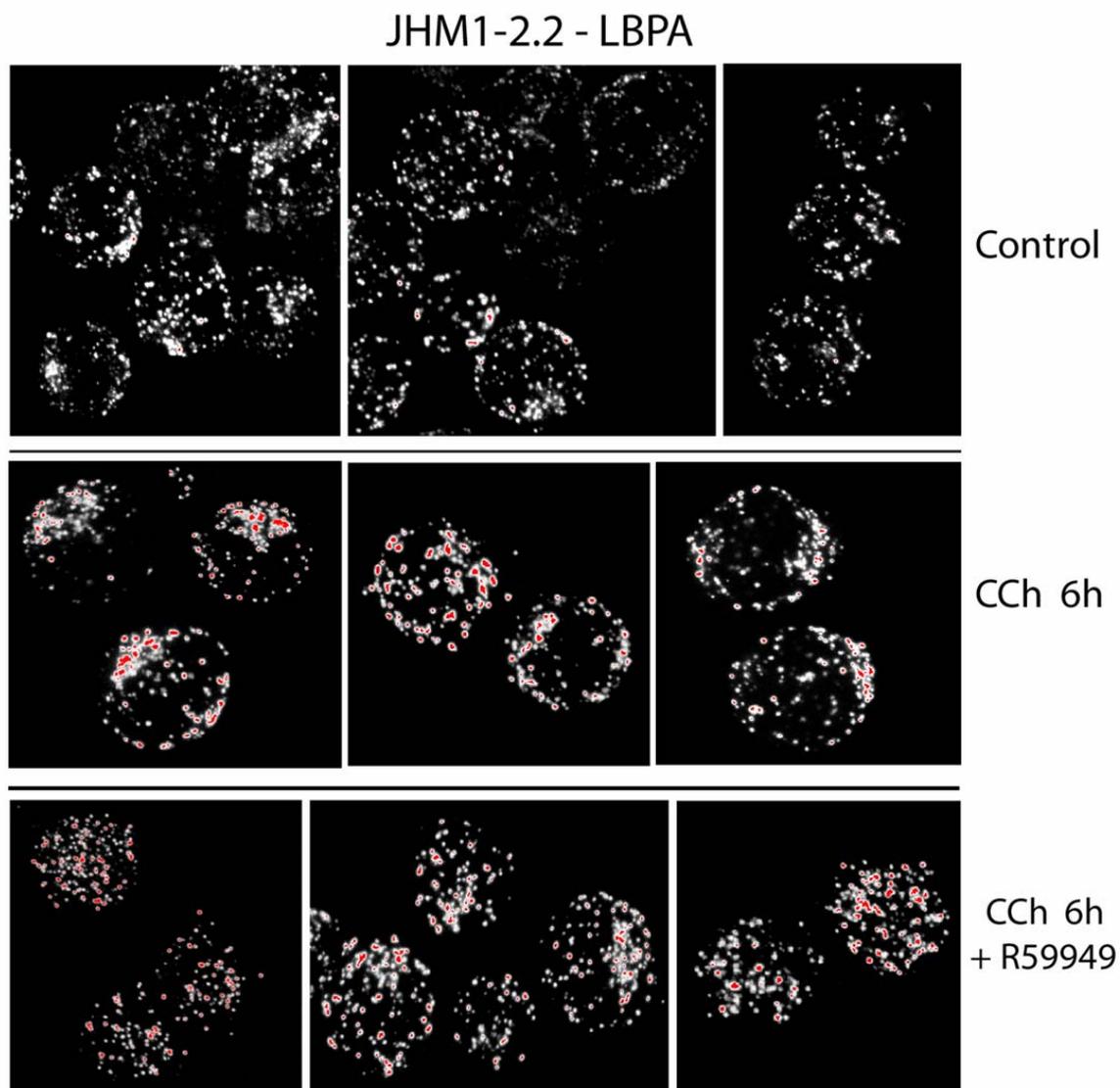


Figura 44. Efecto del R59949 sobre la distribución intracelular de LBPA. Células JHM1-2.2 control o estimulados con CCh (500 μ M, 6h), en presencia o ausencia de R59949 (10 μ M) fueron analizadas por microscopía confocal. Se realizó un marcaje intracelular utilizando mAb anti-LBPA y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC. Se tomaron imágenes de microscopía confocal a diferentes planos y se procedió a su proyección en el eje Z. El marcaje para LBPA se muestra en blanco y negro. El marcaje en color rojo representa aquellos pixeles donde existe una saturación de señal del marcaje para LBPA.

Por lo tanto, la inhibición de DGK llevado a cabo por el R59949 estaría induciendo una mayor formación/producción de endosomas tardíos/MVBs en el interior celular, resultado que correlacionaría con el aumento en la secreción de exosomas observado en presencia de este inhibidor (figuras 22,23 y 34).

4.22 Efecto del inhibidor de DGKs R59949 sobre la formación de vesículas desde la parte *trans* del aparato de Golgi (TGN).

La dinámica intracelular del tráfico de proteínas destinadas a la secreción está caracterizada por la formación de vesículas secretoras a nivel de la red *trans* del aparato de Golgi (TGN). Es en esta localización donde tienen lugar los procesos de fisión de la membrana del TGN que darán lugar a vesículas de pequeño tamaño implicadas en el tráfico constitutivo, a las vesículas implicadas en la biogénesis de lisosomas y del sistema endosomal, así como a las vesículas que han de ser secretadas de una manera regulada [Arvan and Castle, 1998]. La mayor generación de MVBs observada tras la inhibición de la DGK podría ser una consecuencia de un efecto previo de la DGK sobre la generación de vesículas secretoras en el TGN. Con el fin de establecer este punto, analizamos en primer lugar la localización y distribución del TGN en células JHM1-2.2 mediante microscopía confocal, al no ser los linfocitos T células especializadas con funciones secretoras. Para ello utilizamos un marcaje con un anticuerpo específico para la proteína de rata TGN38, descrita como un marcador específico de TGN [Ponnambalam et al., 1996] (figura 45). El análisis de planos confocales sucesivos de 0.1 μM de grosor mostró un marcaje en la región perinuclear, observándose un patrón definido en forma “circular”.

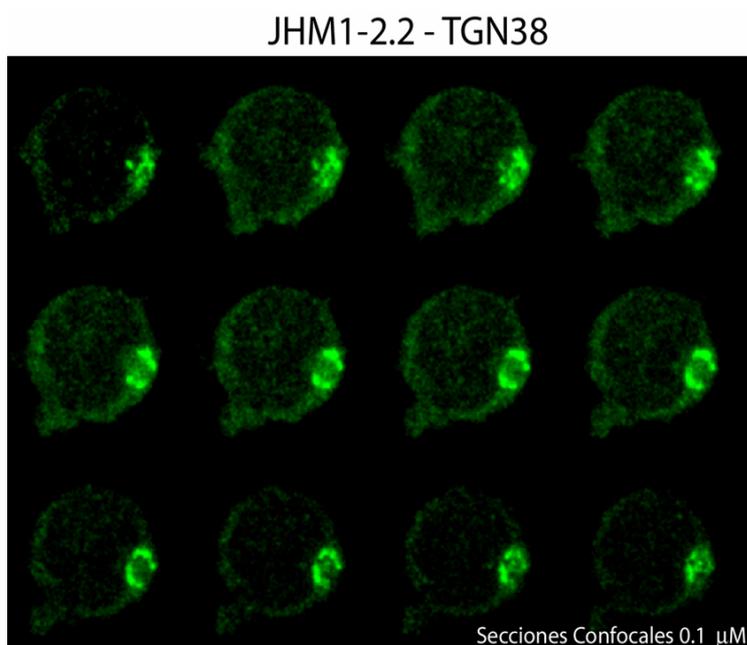


Figura 45. Localización del TGN en células JHM1-2.2. Se realizó un marcaje de la parte *trans* del aparato de Golgi (TGN) mediante microscopía confocal de fluorescencia en células JHM1-2.2 utilizando un anticuerpo anti-TGN38 y posterior anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con FITC. Se tomaron diversas imágenes mediante microscopía confocal de planos sucesivos de 0.1 μM de grosor.

TGN38 se ha descrito como una glicoproteína implicada en la formación de vesículas desde el TGN así como en el mantenimiento de la morfología del TGN [Banting and Ponnambalam, 1997]. Se estudió la distribución de este marcador tras estimulación con CCh, observándose un marcaje más intenso y condensado en la región del TGN, junto con presencia de pequeñas vesículas TGN38⁺ alrededor de la estructura circular del TGN y distribuidas por el citosol (figura 46), revelando un cambio en la morfología del TGN, la cual podría ser una consecuencia del proceso de formación de vesículas a partir de esta estructura inducida por el CCh.

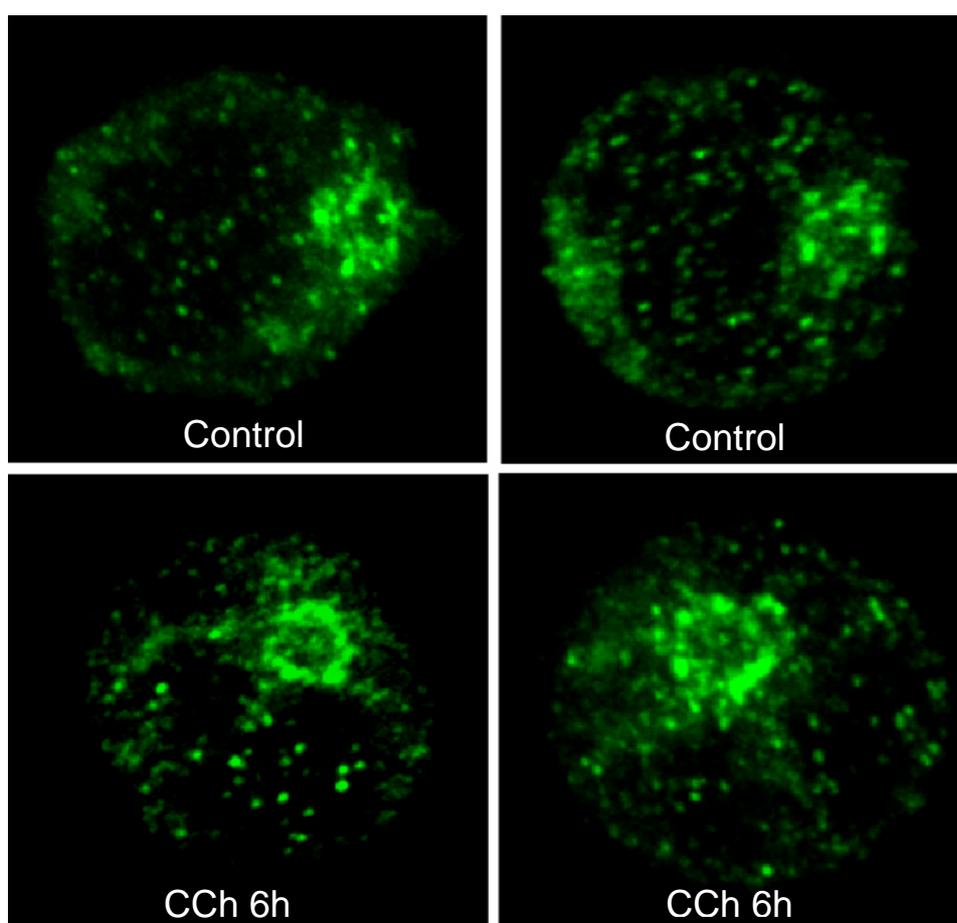


Figura 46. *Distribución de TGN38 tras estimulación con CCh. Células JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh (500 μ M) durante 6 horas para inducir la formación de vesículas/MVBs. Se realizó un marcaje de la parte trans del aparato de Golgi (TGN) mediante microscopía confocal de fluorescencia utilizando un anticuerpo anti-TGN38 y posterior anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con FITC. Se tomaron diversas imágenes mediante microscopía confocal de planos sucesivos y se procedió a su proyección en el eje Z.*

A continuación se realizó un doble marcaje para CD63, como marcador de endosomas tardíos/MVBs, y TGN38. Cuando las células JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh durante 6 horas para inducir la formación de endosomas tardíos/MVBs (proceso observado en las figuras 37, 38 y 39) se observó una acumulación de estructuras CD63⁺ (fluorescencia verde) alrededor del marcaje para TGN38 (fluorescencia roja), las cuales parecen “emerger” de esta parte del aparato de Golgi implicada en la formación de vesículas [Arvan and Castle, 1998] (figura 46).

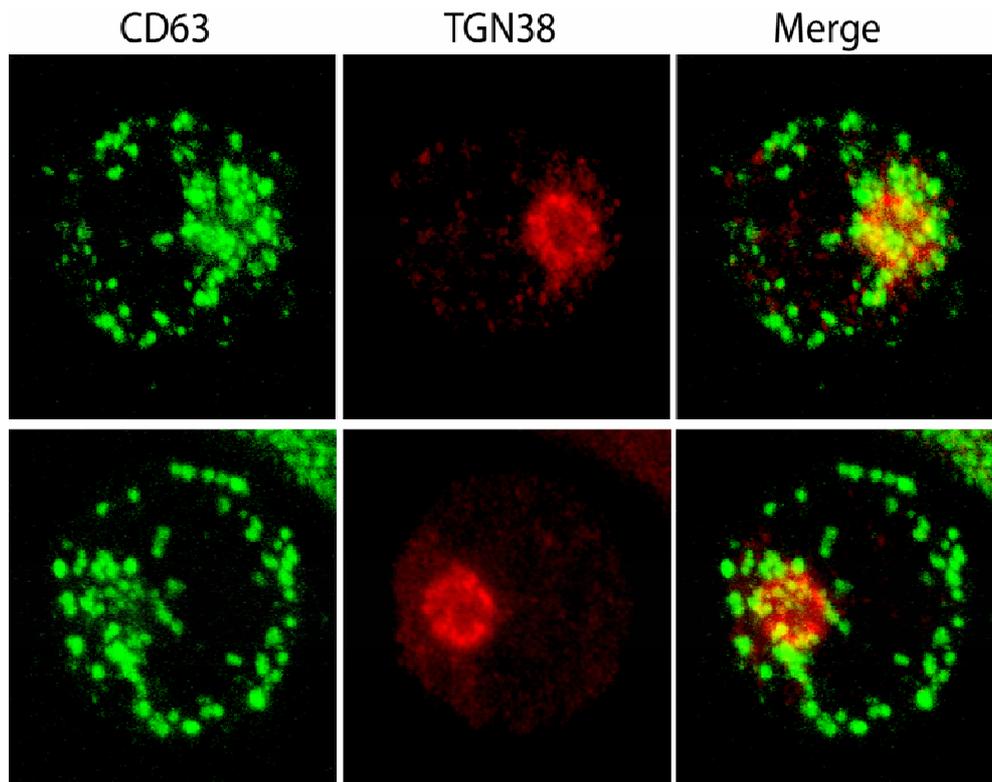


Figura 47. Doble marcaje para CD63 y TGN38. Células JHM1-2.2 fueron estimulados con CCh (500 μ M) durante 6 h. Se realizó un marcaje intracelular utilizando mAb anti-CD63 y posterior anti-cuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC (verde), seguido de marcaje con Ab anti-TGN38 y posterior anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Cy5 (rojo). Se tomaron imágenes mediante microscopía confocal de diferentes planos sucesivos y se procedió a su proyección en el eje Z.

El incremento en la secreción de exosomas con FasL que observamos tras tratar a las células con DOG (figura 21), así como la potenciación de dicha secreción observada con el inhibidor de DGKs R59949 (figuras 22 y 34) sugería que el DAG está favoreciendo el tráfico exocítico en linfocitos T. Se ha descrito que el mantenimiento de los niveles de DAG en el aparato de Golgi resultan esenciales para el proceso de fisión de las vesículas emergentes del TGN [Roth et al., 1999]. Además, el tratamiento con inhibidores de quinasas de lípidos produce cambios morfológicos en compartimentos positivos para la proteína TGN46 (ortólogo en humanos de TGN38) [Hickinson et al., 1997], lo que nos llevó a analizar el efecto del inhibidor de DGKs R59949 sobre la distribución de TGN46. El marcaje con TGN46 en células JHM1-2.2 mostró una distribución similar a TGN38 (figura 48A). Tras estimulación con CCh, también se observó un aumento del marcaje para TGN46 en este compartimento, apareciendo más intenso y con distribución más amplia. El tratamiento con R59949 dio lugar a un marcaje mucho más pronunciado y extendido a otras zonas (figura 48B), lo que indica un cambio morfológico en el TGN debido, posiblemente, a una mayor producción de vesículas desde el TGN como consecuencia del tratamiento con el inhibidor de DGKs.

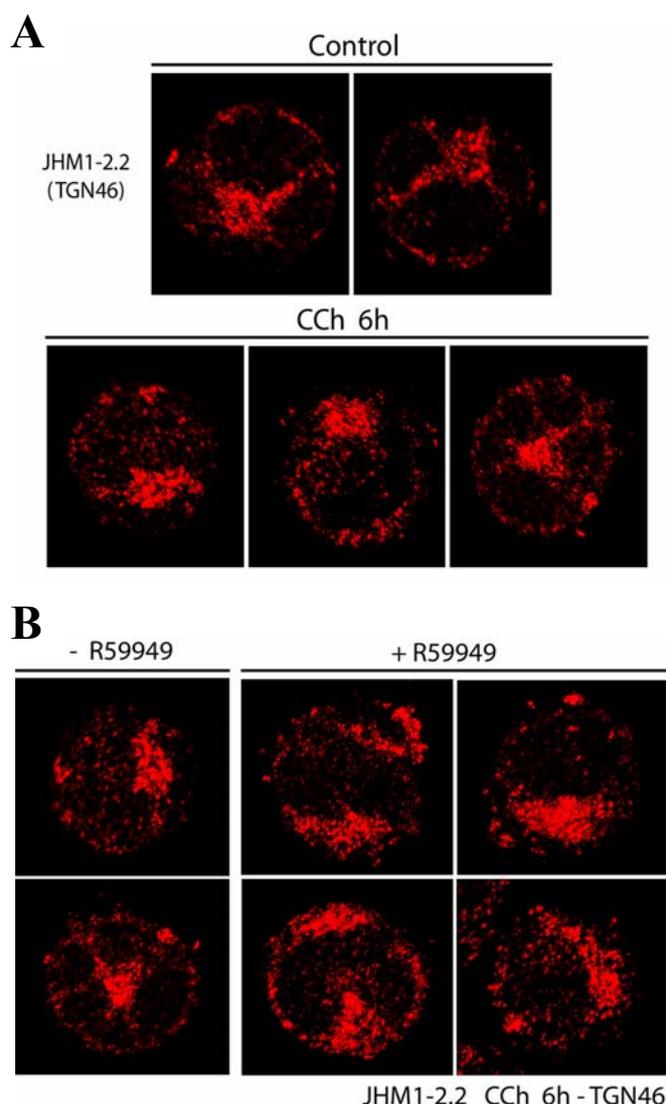


Figura 48. Distribución de TGN46 tras estimulación con CCh. (A) Células JHM1-2.2 control o estimuladas con CCh (500 μ M) durante 6 horas. Se realizó un marcaje de la parte trans del aparato de Golgi (TGN) mediante microscopía confocal de fluorescencia utilizando un anticuerpo anti-TGN46 y posterior anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Cy5. Se tomaron diversas imágenes mediante microscopía confocal de planos sucesivos y se procedió a su proyección en el eje Z. (B) Células JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh (500 μ M) durante 6 horas en presencia o ausencia de R59949 (10 μ M) y analizadas como se indica en (A).

Muchos de los estudios y observaciones realizados sobre la dinámica del transporte vesicular desde el TGN y en especial la distribución y morfología del TGN utilizando los marcadores TGN38 y TGN46 han sido realizados utilizando como modelo la línea celular Hela [Hickinson et al., 1997; Banting and Ponnambalam, 1997; Baron et al., 2002]. Estas células de origen epitelial poseen un citosol grande, con mayor tamaño y una maquinaria exocítica/endocítica basal más desarrollada respecto a los linfocitos T, por lo que se analizó el efecto del R59949 en la distribución de CD63 y TGN46 en estas células. Células Hela fueron tratadas con R59949 durante 8 horas y fueron analizadas por microscopía confocal. El tratamiento con R59949 también indujo una gran acumulación de estructuras vesiculares CD63⁺ (figura 49).

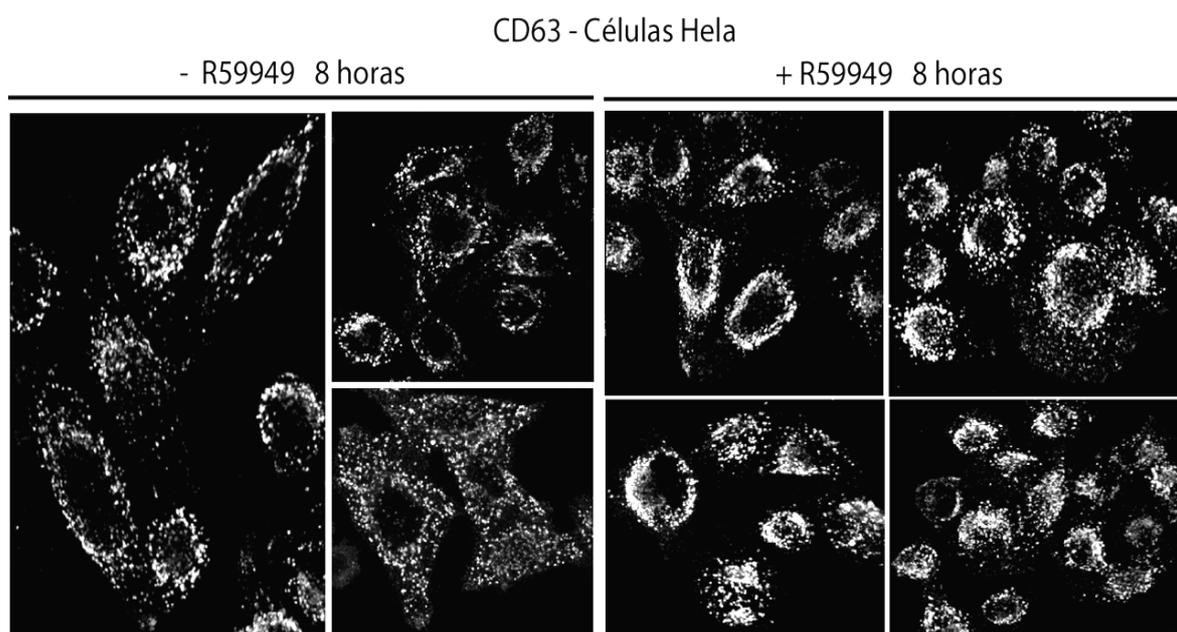


Figura 49. Efecto del inhibidor R59949 sobre la distribución intracelular de CD63. Células Hela fueron tratadas con R59949 (10 μ M) durante 8 horas. Se realizó un marcaje intracelular utilizando mAb anti-CD63 y posterior anticuerpo secundario conjugado con FITC. Se tomaron imágenes mediante microscopía confocal a diferentes planos y se procedió a su proyección en el eje Z.

El marcaje para TGN46 en estas células mostró, en condiciones basales, una distribución reticular con diversas tubulaciones, típica de la morfología del TGN (figura 50). Estas células fueron tratadas con R59949 durante 8 horas, tiempo utilizado para permitir la acumulación de posibles cambios en la dinámica de transporte intracelular llevados a cabo por el R59949. El tratamiento con este inhibidor de DGKs de tipo I indujo un cambio en la distribución y morfología del TGN46, observándose un marcaje más intenso y compactado (figura 50, panel derecho), al igual que lo observado en células JHM1-2.2 (figura 48).

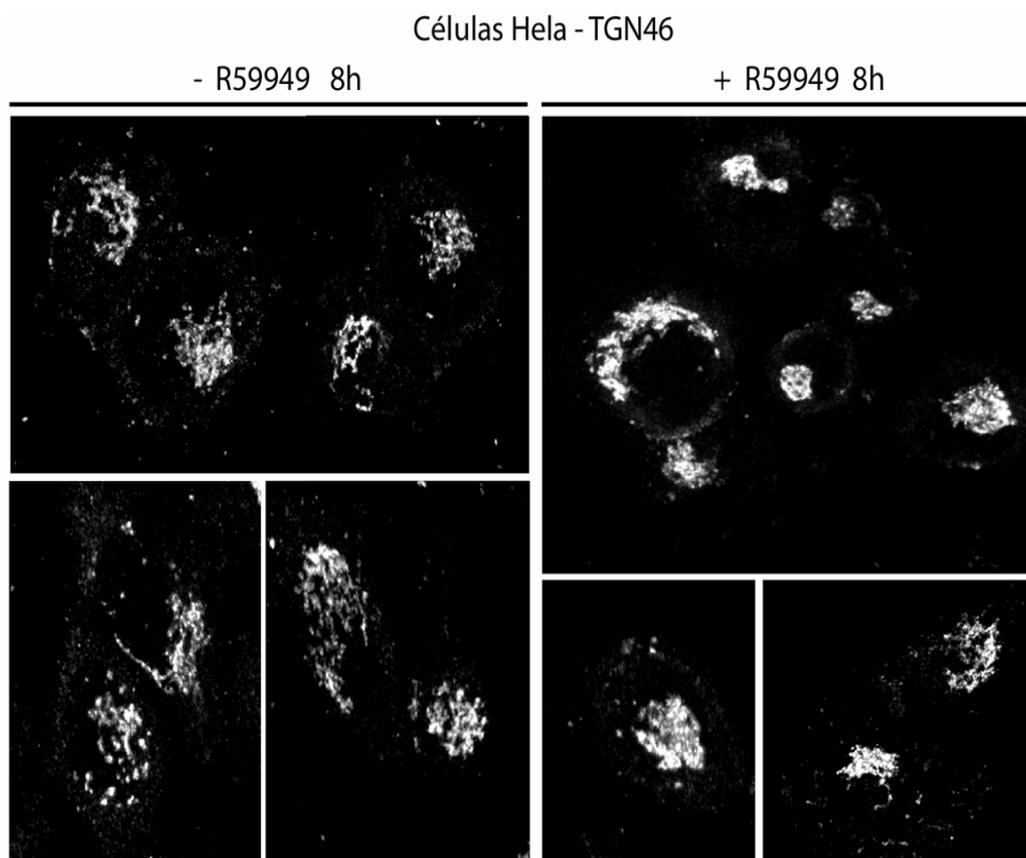
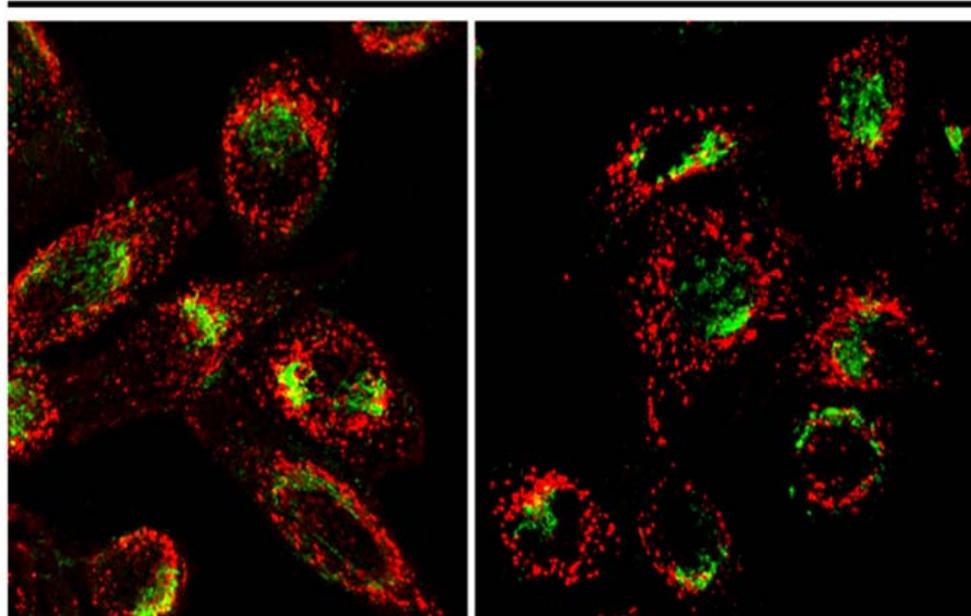


Figura 50. Efecto del inhibidor R59949 sobre la distribución intracelular de TGN46. Células Hela fueron tratadas con R59949 (10 μ M) durante 8 horas. Se realizó un marcaje intracelular utilizando Ab anti-TGN46 y posterior anticuerpo secundario conjugado con FITC. Se tomaron imágenes mediante microscopía confocal a diferentes planos y se procedió a su proyección en el eje Z.

A continuación se realizó un doble marcaje para CD63 y TGN46 en células Hela, con el fin de visualizar conjuntamente la distribución de ambos marcadores. En la figura 51 se puede observar el cambio inducido por el tratamiento durante 8 horas con el inhibidor de DGKs R59949, con una mayor cantidad de estructuras vesiculares CD63⁺ (fluorescencia roja), las cuales parecen emerger del TGN (fluorescencia verde). A su vez, la distribución del TGN presenta un marcaje más pronunciado.

- R59949 8h



+ R59949 8h

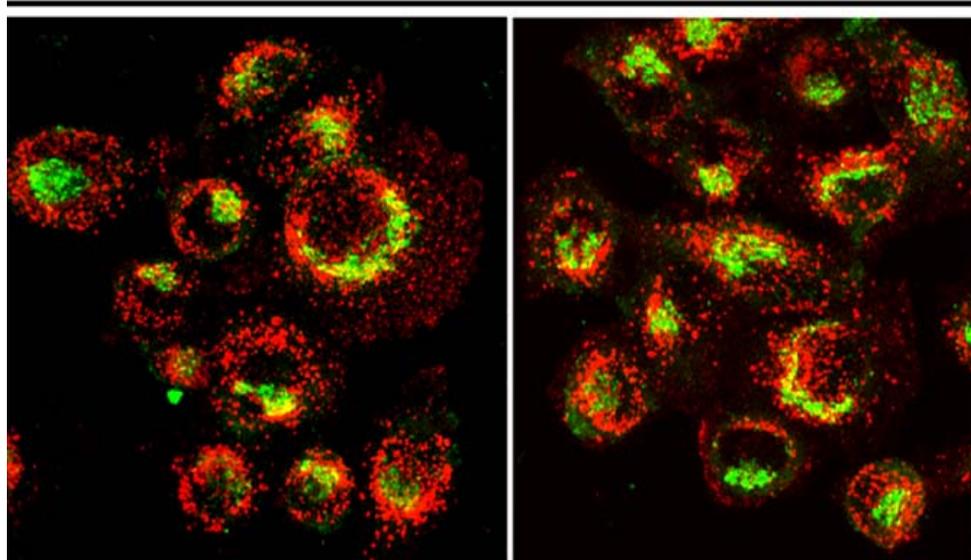


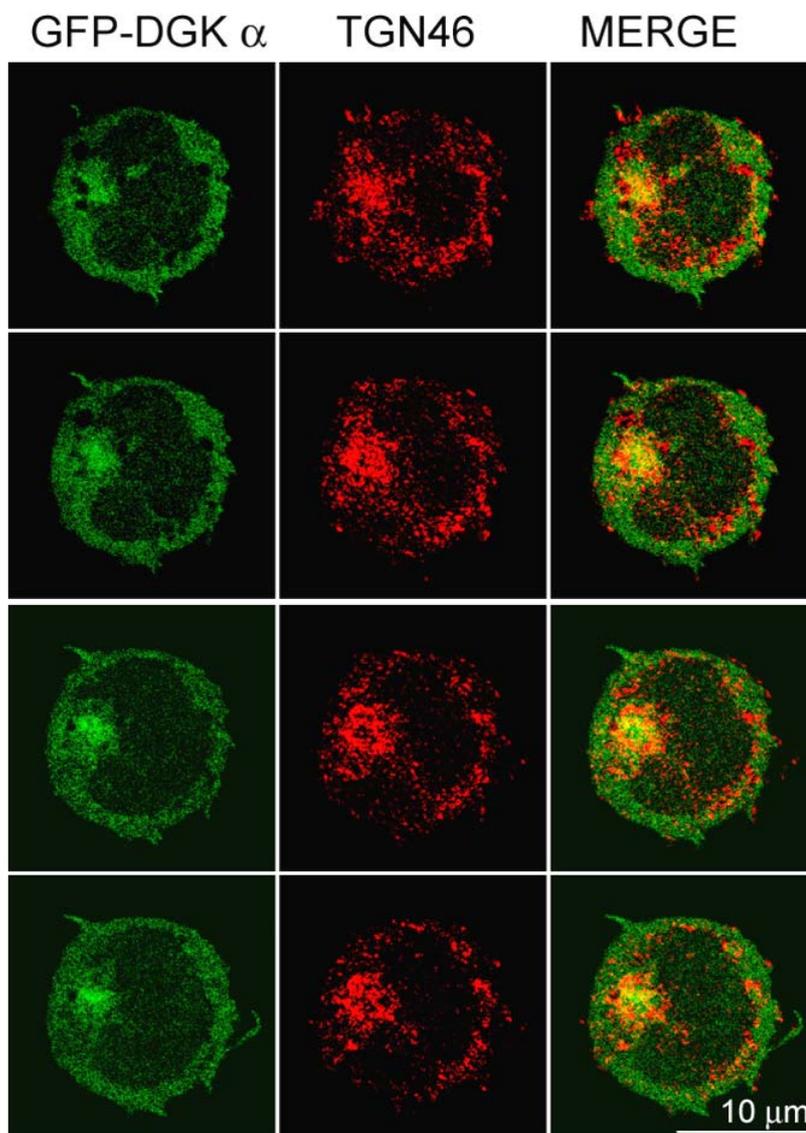
Figura 51. Doble marcaje para CD63 y TGN38. Células Hela fueron tratadas con R59949 (10 μ M) durante 8 h. Se realizó un doble marcaje intracelular utilizando mAb anti-CD63 y posterior anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC (verde), seguido de marcaje con Ab anti-TGN38 y posterior anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Cy5 (rojo). Se tomaron imágenes mediante microscopía confocal de diferentes planos sucesivos y se procedió a su proyección en el eje Z.

4.23 La DGK α se encuentra asociada al TGN.

Los últimos resultados obtenidos apuntaban a que la DGK α , mediante la regulación de los niveles de DAG endógenos podría estar controlando la generación de vesículas emergentes desde el TGN y/o la consiguiente formación de los cuerpos multivesiculares (MVBs). Por lo tanto, la presencia de la DGK α en estas estructuras proporcionaría una base molecular para explicar el efecto de la DGK α en el proceso de formación de vesículas emergentes del TGN, la formación de MVB, y la posterior secreción de exosomas con FasL observados. Como primera aproximación al análisis de la localización subcelular de la DGK α , se analizó mediante microscopía de fluorescencia confocal la localización subcelular de la construcción GFP-DGK α expresada en células JHM1-2.2 con el marcador TGN46 (figura 52). El análisis de diferentes planos confocales mostró un marcaje para GFP-DGK α (verde) predominantemente citosólico, observándose una acumulación de GFP-DGK α en la zona perinuclear, la cual mostró puntos de co-localización con el marcador TGN46 (panel derecho).

Figura 52. GFP-DGK α co-localiza con TGN46.

Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con el vector de expresión pEF-GFP-DGK α . 48 h después se realizó un marcaje intracelular utilizando Ab anti-TGN46 y posterior anticuerpo secundario conjugado con Cy5 (rojo). Se tomaron imágenes de microscopía de secciones confocales de 0.4 μ M. El panel izquierdo muestra la fluorescencia GFP (verde), el panel central el marcaje para TGN46 (rojo). En el panel derecho se muestra la mezcla (merge) de la fluorescencia verde y roja, apareciendo en amarillo el solapamiento de ambas señales (verde + rojo).



Resultados

Por el contrario, cuando se realizó un marcaje con Giantina, marcador de la parte *cis* y *media* del aparato de Golgi, no se observó ninguna co-localización con la GFP-DGK α (figura 53). La proyección en el eje Z de las diferentes secciones confocales obtenidas confirmó que la acumulación de GFP-DGK α observada se encuentra localizada en la parte *trans* del aparato de Golgi (TGN46⁺), pero no en la parte *cis* o *media* (Giantina⁺).

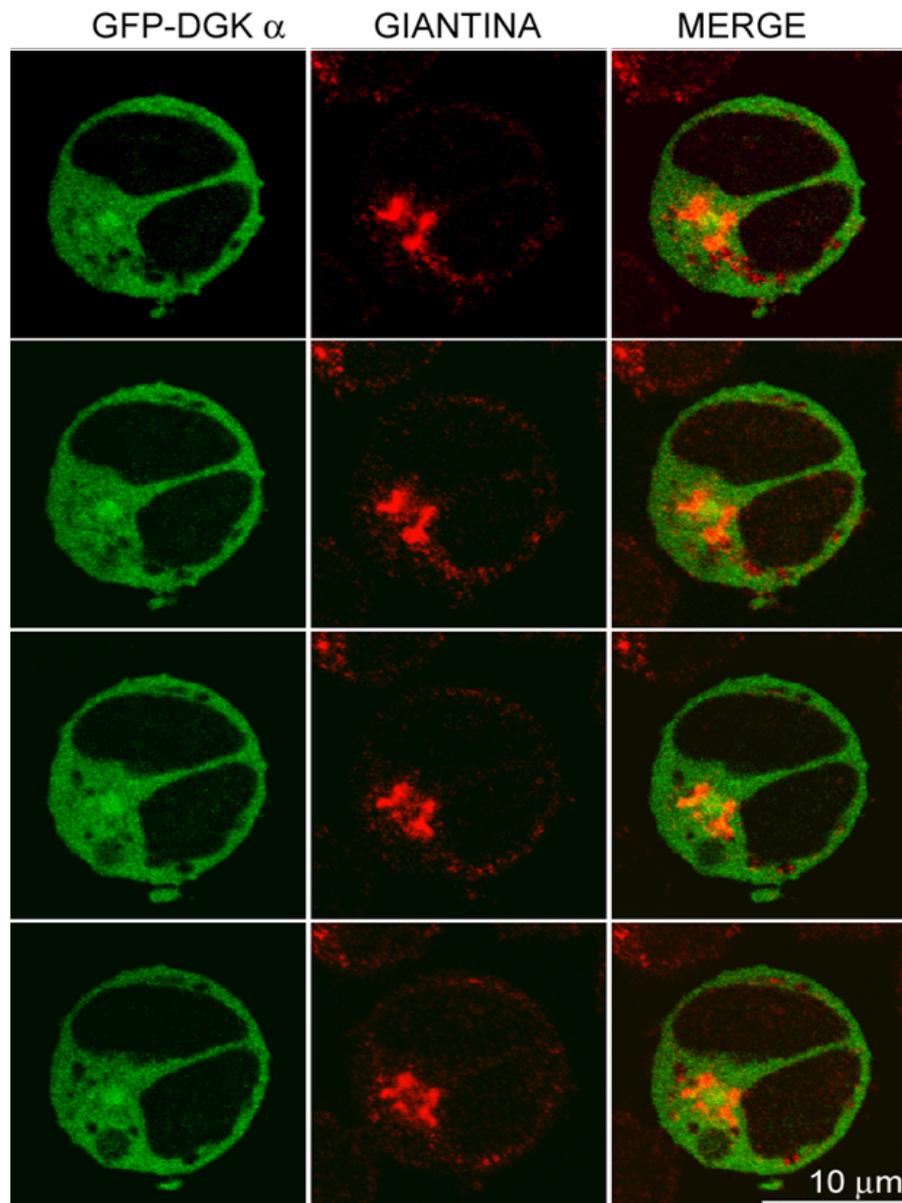
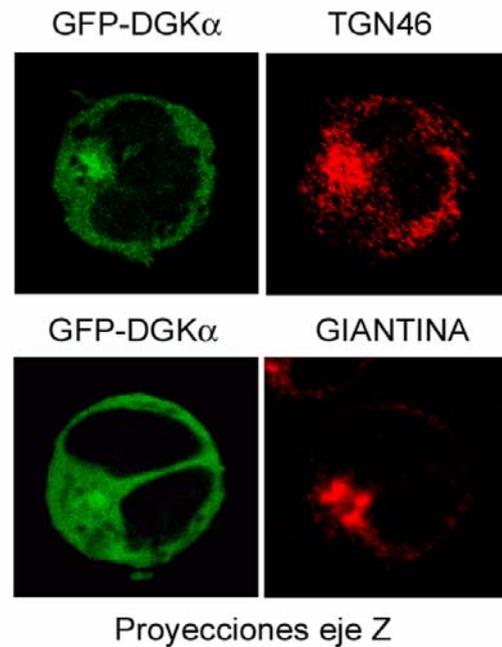


Figura 53. GFP-DGK α no co-localiza con la parte *cis* o *media* del aparato de Golgi. Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con el vector de expresión pEF-GFP-DGK α . 48 h después se realizó un marcaje intracelular utilizando Ab anti-Giantina y posterior anticuerpo secundario conjugado con Cy5 (rojo). Se tomaron imágenes de microscopía de secciones confocales de 0.4 μ M de grosor. El panel izquierdo muestra la fluorescencia GFP (verde), el panel central el marcaje para Giantina (rojo). El panel derecho muestra la mezcla (merge) de la fluorescencia verde y roja, apareciendo en amarillo el solapamiento de ambas señales (verde + rojo).

Figura 54. GFP-DGK α co-localiza parcialmente con TGN pero no con la parte cis o media del aparato de Golgi. Proyección en el eje Z de las diferentes secciones confocales obtenidas en las figuras 52 y 53. En el panel se muestra la fluorescencia de la GFP-DGK α (verde), y el marcaje para las proteínas TGN46 y Giantina se muestra en el panel izquierdo (rojo).



4.24 La estimulación con CCh induce translocación de la DGK α y de la proteína quinasa D (PKD) a la región perinuclear/cuerpos multivesiculares.

La asociación de la enzima proteína quinasa D (PKD) a la parte *trans* del aparato de Golgi ha sido implicada en la estimulación de la formación de vesículas a partir del TGN [Baron et al., 2002]. Así, se ha observado que una reducción en los niveles de DAG inhibía el reclutamiento de la PKD al TGN y se bloqueaba el proceso de formación de vesículas mediado por la PKD y, por consiguiente, el transporte de proteínas desde el TGN [Liljedahl et al., 2001; Baron et al., 2002]. Estos hechos nos llevaron a estudiar mediante fraccionamiento subcelular la localización intracelular de la DGK α y de la PKD en células JHM1-2.2. En la parte superior de la figura 55 se muestran, como referencia, la distribución de CD63 y del marcador Golgi58K en las diferentes fracciones subcelulares, observándose que las fracciones CD63⁺ 9, 12 y 13 también son Golgi58K⁺, mientras que las fracciones 6, 15, 16 y 17 son únicamente Golgi58K⁺. En condiciones basales (control) se detectó la presencia de DGK α en las fracciones CD63⁺/Golgi58k⁺, y tras estimulación con CCh se produce un aumento en la cantidad de DGK α presente en estas fracciones (fracciones 12, 13 y 14), así como un gran aumento en la fracción Golgi58K⁺ número 6. A su vez, la presencia de PKD en estas fracciones también fue detectada en condiciones basales, y la estimulación con CCh aumentó la localización de la PKD en las fracciones donde también aumentaba la presencia de DGK α (fracciones 12 y 13).

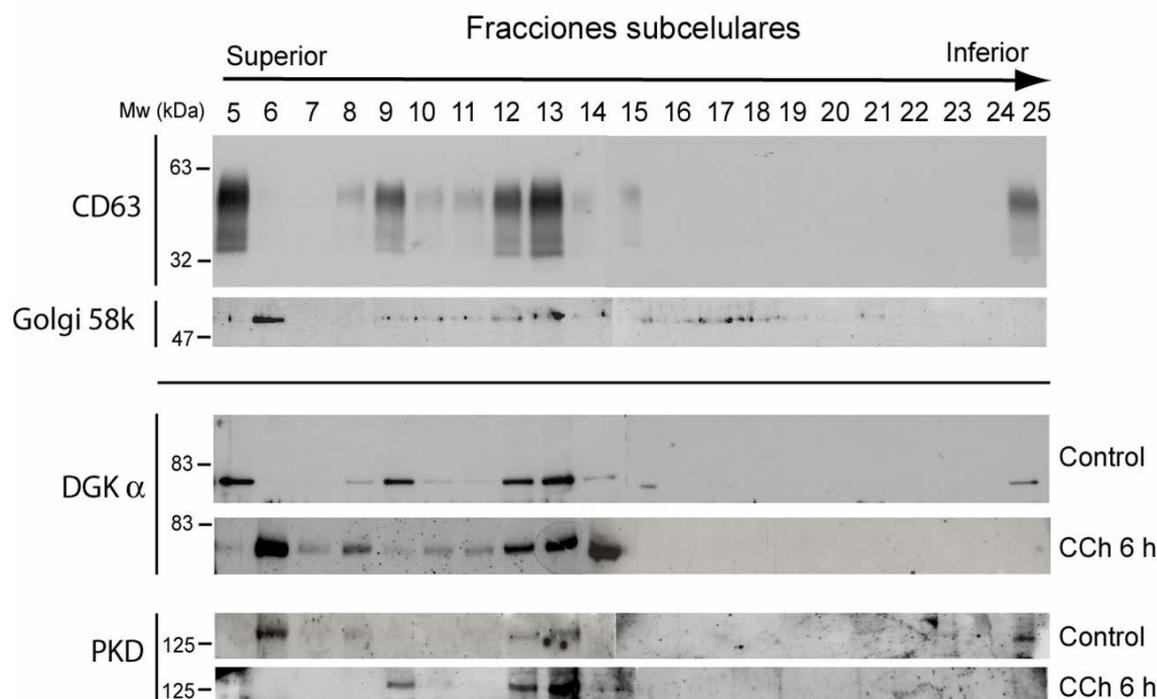


Figura 55. Localización intracelular de DGK α y PKD. Células JHM1-2.2 control o estimuladas con CCh (500 μ M) durante 6 horas fueron sometidas a fraccionamiento subcelular en gradiente de densidad como se indica en materiales y métodos. La presencia de DGK α y PKD fue analizada mediante WB.

En las figuras 39 y 40 se muestra como el tratamiento con CCh inducía un aumento de CD63, Lamp-1 y FasL en las fracciones 6, 12 y 13, lo que se interpreta como un aumento en la formación de endosomas tardíos/MVBs (ver, además, figuras 37, 41, 44, 46). A su vez, en estas mismas fracciones se observa también un aumento de DGK α tras la estimulación con CCh (figura 55), siendo su aumento en la fracción número 6 Golgi58K⁺/PKD⁺ muy acusado (fracción que también es CD63⁺ tras estimulación con CCh, figura 39). En el caso de las fracciones 9, 12 y 13, la PKD, al igual que la DGK α , también aumenta su presencia tras estimulación con CCh en estas fracciones.

Como se ha observado anteriormente, la estimulación con CCh indujo un aumento de DGK α endógena en las fracciones del gradiente de densidad correspondientes a estructuras endosomas tardíos/MVBs. A continuación, se analizó mediante microscopía de fluorescencia confocal la localización intracelular de la construcción GFP-DGK α expresada en células JHM1-2.2 (figura 56). Células control, sin estimular, mostraron un marcaje para GFP-DGK α (fluorescencia verde) predominantemente citosólico, observándose una acumulación de GFP-DGK α en la zona perinuclear. Se observa que, tras estimulación con CCh, se produce una acumulación mayor de la GFP-DGK α en esta región perinuclear/TGN.

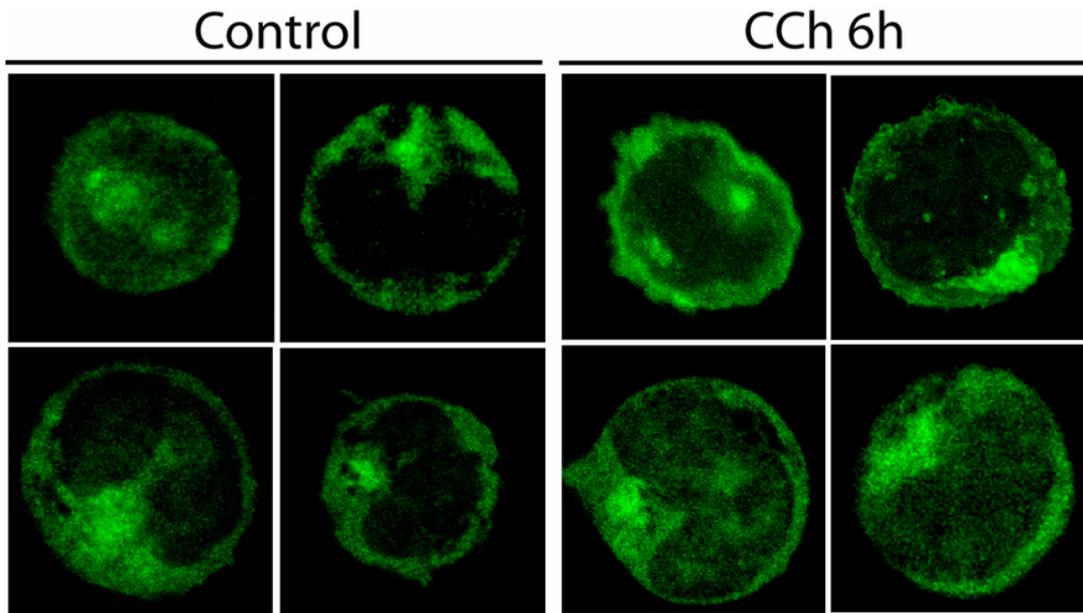


Figura 56. GFP-DGK α se localiza en la región perinuclear tras estimulación con CCh. Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con el vector de expresión pEF-GFP-DGK α . 48 h después fueron estimuladas con CCh (500 μ M, 6 horas). Se tomaron imágenes mediante microscopía confocal de planos sucesivos y se procedió a su proyección en el eje Z.

Cuando se realizó un marcaje por microscopía de fluorescencia confocal para el marcador de endosomas tardíos/MVBs CD63, se observó que la acumulación de la GFP-DGK α inducida tras la estimulación con CCh que se observaba en la región perinuclear/TGN también presentaba un alto grado de co-localización con CD63 (figura 57).

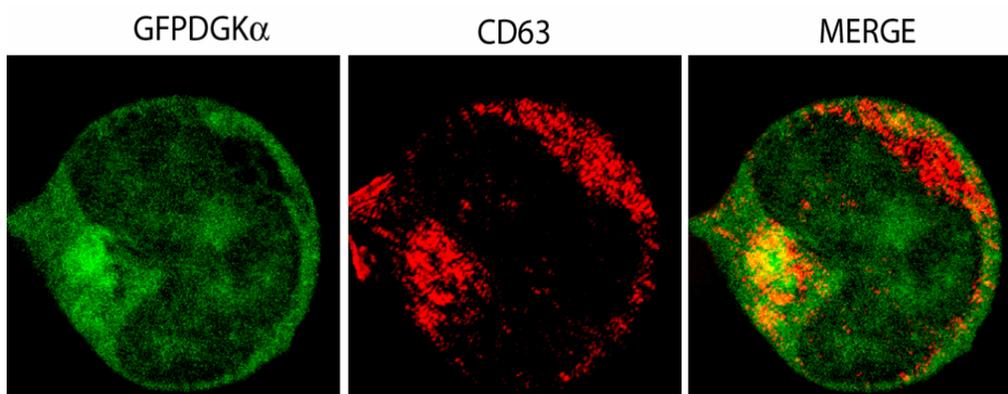


Figura 57. GFP-DGK α co-localiza con CD63 tras estimulación con CCh. Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con el vector de expresión pEF-GFP-DGK α . 48 h después se estimularon con CCh (500 μ M, 6 h) y se realizó un marcaje intracelular utilizando Ab anti-CD63 y anticuerpo secundario conjugado con Cy5 (rojo). Se tomaron imágenes de microscopía de secciones confocales de 0.5 μ M. En el panel derecho se muestra la mezcla (merge) de la fluorescencia verde y roja, el solapamiento de ambas señales aparece en amarillo.

La translocación de la PKD a estructuras de tipo endosomas tardíos/MVBs inducida tras la estimulación con CCh que se observaba mediante fraccionamiento subcelular (figura 55), nos llevó a estudiar la localización intracelular de esta proteína. Hasta la fecha no existen anticuerpos dirigidos contra la PKD que sean funcionales para microscopía de fluorescencia, lo cual nos llevó a estudiar la localización intracelular de una construcción que permite la expresión de la proteína de fusión GFP-PKD [Matthews et al., 1999]. En condiciones basales, la expresión de GFP-PKD en células JHM1-2.2 mostró un patrón citosólico, observándose pequeñas acumulaciones de GFP-PKD en la zona perinuclear. Tras la estimulación con CCh, además de observarse translocación de la PKD a la membrana plasmática, se puede observar la translocación de la GFP-PKD a la región perinuclear/TGN (figura 58).

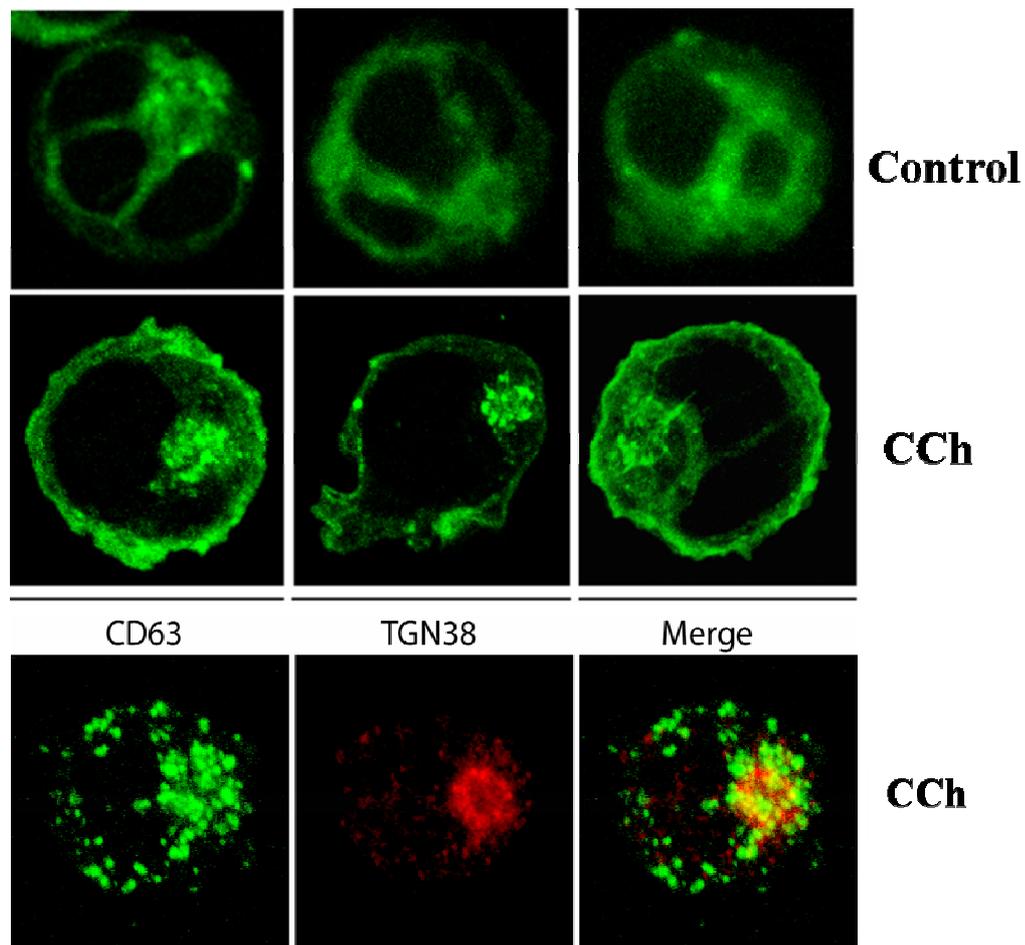


Figura 58. *GFP-PKD se localiza en la región perinuclear tras estimulación con CCh. Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con el vector de expresión pEF-GFP-PKD. 48 h después fueron estimuladas con CCh (500 μ M, 6 h). Se tomaron diversas imágenes de planos sucesivos mediante microscopía confocal y se procedió a su proyección en el eje Z. Panel inferior, doble marcaje para CD63 y TGN38. Marcaje intracelular utilizando anti-CD63 y posterior anti-cuerpo secundario anti-ratón con jugado con FITC (verde), seguido de marcaje con Ab anti-TGN38 y posterior anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Cy5 (rojo). Se tomaron imágenes mediante microscopía confocal de diferentes planos sucesivos y se procedió a su proyección en el eje Z.*

4.25 El inhibidor R59949 potencia la translocación de la proteína quinasas D (PKD) a la región perinuclear/TGN.

La interacción del DAG con el dominio C1a de la PKD se ha descrito como el paso limitante para la translocación de la PKD al TGN [Liljedahl et al., 2001; Baron et al., 2002]. Por tanto, la PKD constituye un posible efector de la vía DAG/DGK α , que podría mediar los efectos del DAG en la secreción de exosomas. Para establecer este punto, utilizamos la construcción para la proteína de fusión GFP-PKD para analizar el efecto del R59949 sobre la localización de la PKD. La estimulación con CCh indujo la translocación de la GFP-PKD a la región perinuclear/TGN (figura 59, izquierda). El tratamiento con R59949, que induce un aumento en los niveles de DAG, potenció la presencia de la PKD en esta localización observándose, además, acumulación de GFP-PKD en estructuras de tipo vesicular (figura 59, derecha).

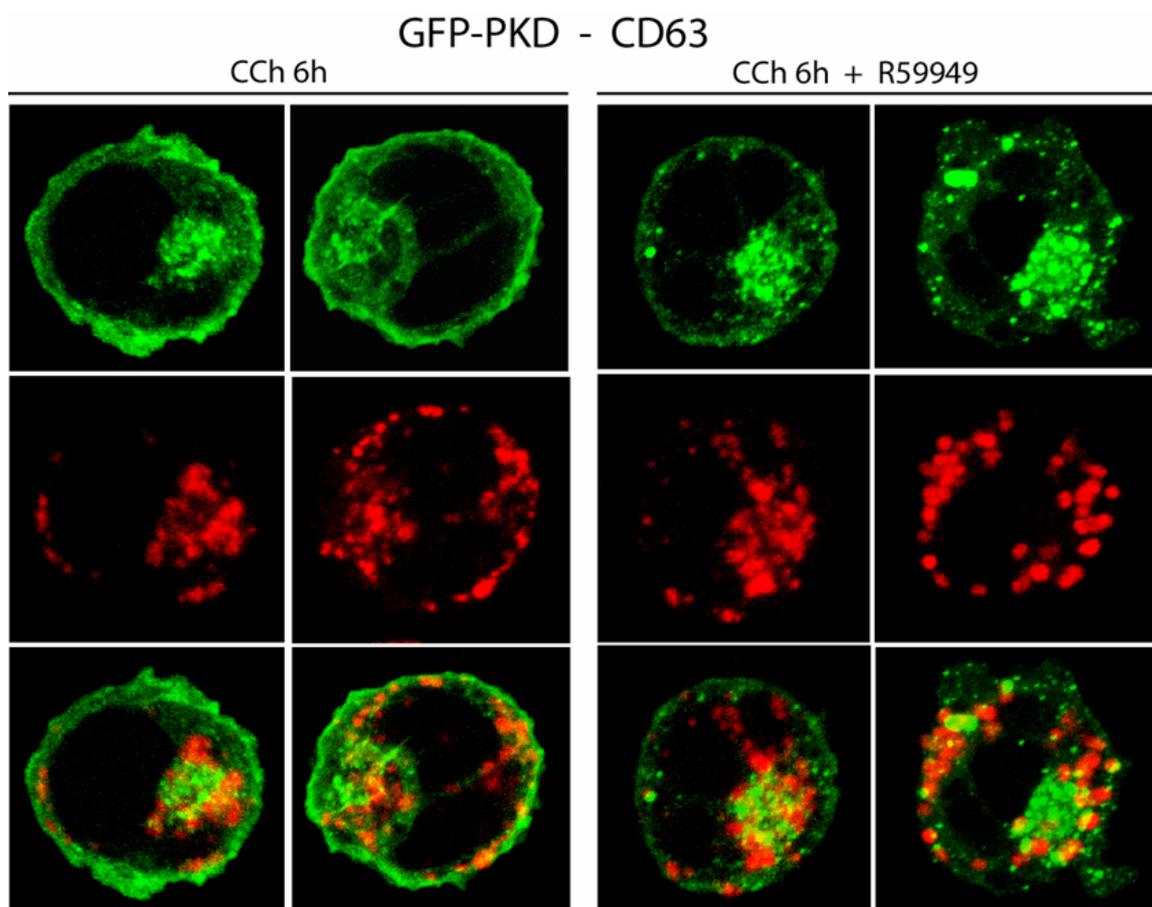


Figura 59. Efecto del R59949 sobre la localización de la construcción GFP-PKD y el marcador de MVBs CD63. Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con el vector de expresión pEF-GFP-PKD. 48 h después fueron estimuladas con CCh (500 μ M) durante 6 horas en presencia o ausencia de R59949 (10 μ M) y se realizó un marcaje intracelular utilizando Ab anti-CD63 y posterior anticuerpo secundario conjugado con Cy5 (rojo). Se tomaron diversas imágenes mediante microscopía confocal de planos sucesivos y se procedió a su proyección en el eje Z.

La sobre-expresión de la PKD (expresión de la construcción GFP-PKD) así como una mayor translocación de ésta inducida por unos niveles altos de DAG (llevado a cabo por el R59949) darían lugar a una formación excesiva o anormal de vesículas a nivel del TGN (proceso mediado por la PKD), lo cual explicaría la acumulación en estructuras vesiculares de la GFP-PKD observada en la región perinuclear. El marcaje de estas células con CD63 mostró una acumulación de estructuras vesiculares CD63⁺ de gran tamaño en presencia de R59949, circundantes a la región perinuclear marcada por la GFP-PKD (figura 59). Estos resultados apoyan que el tratamiento con R59949 induce una mayor translocación de GFP-PKD al TGN y sugieren que, como consecuencia, probablemente ocurre una mayor producción de vesículas desde el TGN mediada por la PKD, resultando en la alteración de la dinámica de formación de vesículas que darán lugar, a su vez, a un número mayor de endosomas tardíos/MVBs.

El efecto del R59949 sobre la localización de la GFP-PKD confirmaría la implicación del DAG, regulado por la DGK α , en la translocación de la PKD al TGN en células JHM1-2.2. Además, apoya la implicación del DAG y de su regulador, la DGK α , durante el proceso de formación de vesículas en el TGN llevado a cabo por la PKD.

4.26 El inhibidor R59949 potenció la localización de la GFP-DGK α en la región perinuclear/TGN y en estructuras vesiculares/MVBs.

Los resultados mostrados hasta el momento indican que la DGK α aumenta, tras estimulación, su localización en estructuras intracelulares de tipo TGN/MVBs. Estos datos sugieren que, mediante la regulación de los niveles de DAG, la actividad de la DGK α podría regular el reclutamiento de la PKD y la consiguiente generación de vesículas emergentes desde el TGN y/o la consiguiente generación de cuerpos multivesiculares (MVBs). Otra posibilidad, que no es excluyente de la anterior, es que el DAG o el PA podrían regular el proceso de vesicularización interna del endosoma tardío que tiene lugar durante la formación del MVB. En este sentido la DGK α podría estar implicada directamente en el proceso de formación del MVB. El fraccionamiento subcelular realizado en células JHM1-2.2 (figura 55), así como las imágenes de microscopía confocal (figuras 53 y 56) muestran que una fracción de la DGK α se encuentra localizada en células sin estimular en estructuras TGN/CD63/lamp-1 positivas. Además el inhibidor R59949 potenciaba el proceso de secreción de exosomas y la dinámica de los MVBs, mientras que la localización de DGK α en estas estructuras podría estar estrechamente vinculada al proceso de generación de exosomas. Con estas premisas se estudió el efecto del inhibidor R59949 sobre la localización intracelular de DGK α .

Está descrito que la DGK α transloca a la membrana plasmática tras estimulación de receptor [Sanjuán et al., 2001], donde lleva a cabo la fosforilación de DAG a ácido fosfatídico (PA). En estos estudios la pérdida de actividad enzimática de la DGK α llevada a cabo por el inhibidor R59949, así como una versión catalíticamente inactiva de la DGK α (DGK α *kinase dead*), evitaban la disociación de la enzima de la membrana plasmática, sugiriendo que la generación de PA por parte de la DGK α juega un papel significativo en la redistribución celular de esta enzima, regulando su disociación de la membrana plasmática. Cuando se trataron células JHM1-2.2 durante 6 horas con el inhibidor R59949, se observó que además del patrón de expresión citosólico, la GFP-DGK α se localiza también en estructuras vesiculares repartidas por el citosol (figura 60). Este patrón indicaría su translocación a estructuras TGN y/o MVBs en condiciones basales de formación de vesículas/MVBs. Como consecuencia de la pérdida de la actividad enzimática de la DGK α llevada a cabo por el R59949, la GFP-DGK α se acumularía en estructuras de membrana y quedaría retenida en estas estructuras durante el tráfico intracelular de proteínas.

JHM1-2.2 + R59949

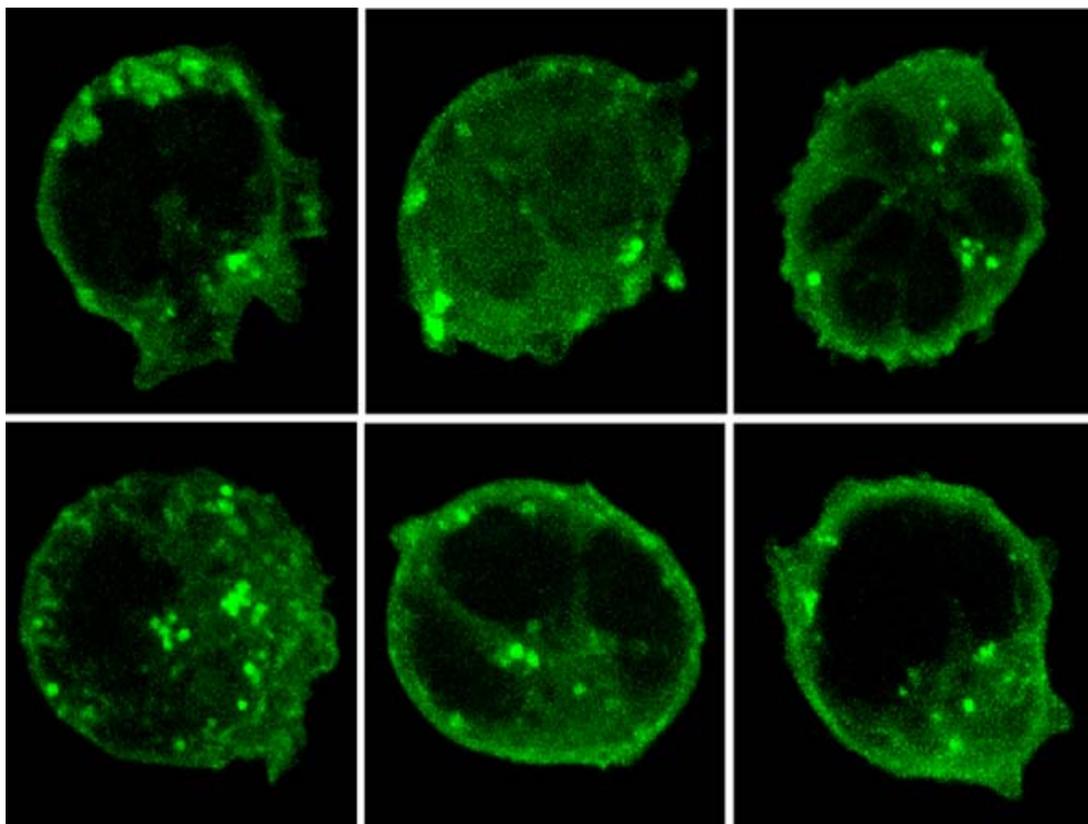


Figura 60. *GFP-DGK α se localiza en estructuras vesiculares. Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con el vector de expresión pEF-GFP-DGK α . 48 h después fueron tratadas con el inhibidor de DGKs R59949 (10 μ M) durante 6 horas. Se tomaron diversas imágenes mediante microscopía confocal de planos sucesivos y se procedió a su proyección en el eje Z.*

La estimulación con CCh durante 6 horas induce la formación de vesículas a nivel del TGN y la formación de MVBs (figuras 36, 37, 38 y 39), así como la translocación de la DGK α a estas estructuras TGN/MVBs (figuras 55, 56 y 57). Con estos resultados, se procedió al análisis del efecto del R59949 sobre la distribución y localización de la GFP-DGK α tras la estimulación con CCh, analizando su localización mediante microscopía confocal en diferentes planos sucesivos de 0.3 μ M de grosor en la misma célula (figura 61). Además de su localización en la membrana plasmática, se puede observar como la GFP-DGK α se encuentra asociada a la región perinuclear con morfología “TGN” (planos 1-5), así como a estructuras vesiculares (planos 6-9) distribuidas desde esta zona hacia el citosol.

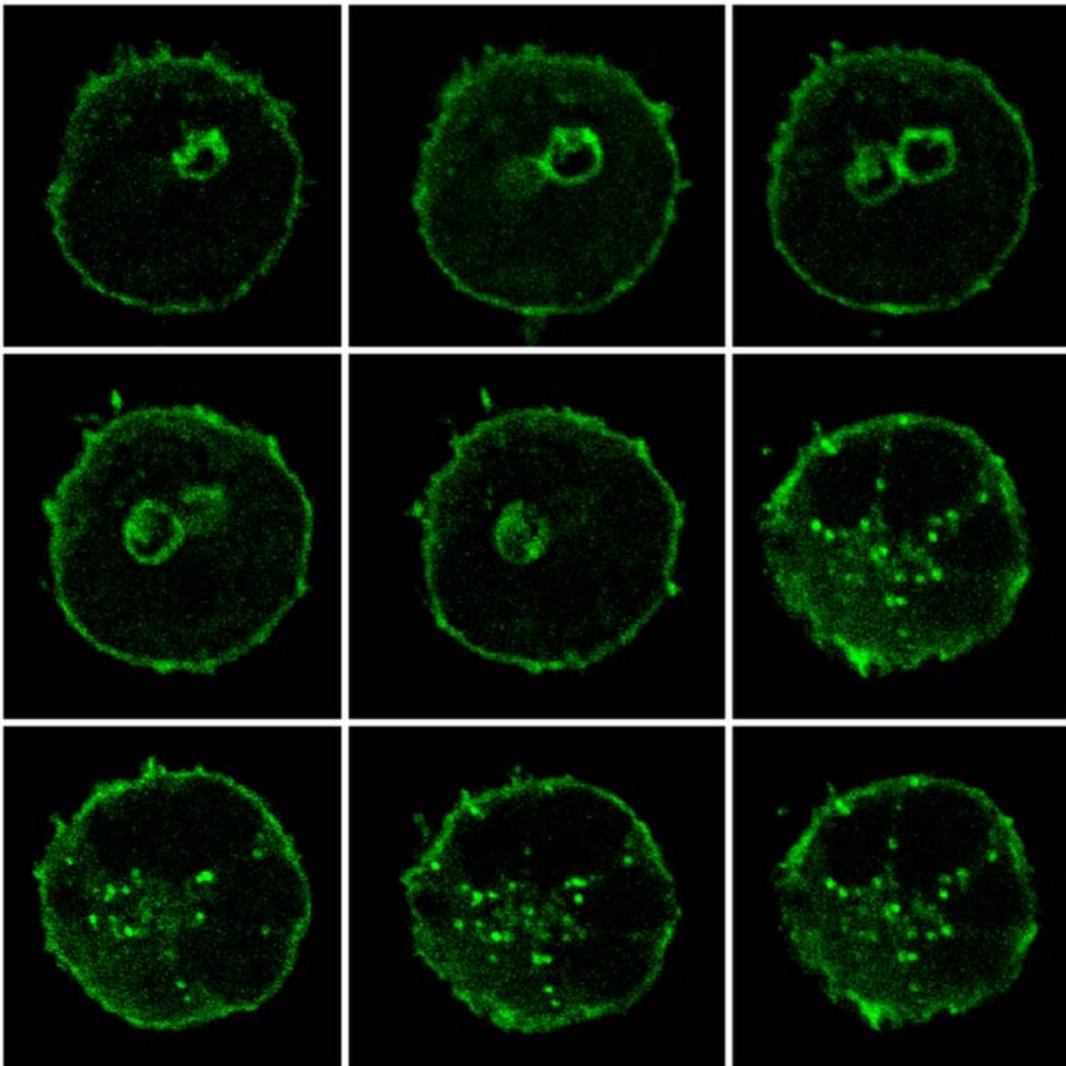


Figura 61. GFP-DGK α se localiza en la zona perinuclear/TGN y estructuras vesiculares tras la estimulación con CCh. Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con el vector de expresión pEF-GFP-DGK α . 48 h después fueron estimuladas con CCh (500 μ M) durante 6 horas en presencia del inhibidor de DGKs R59949 (10 μ M). Se tomaron diversas imágenes mediante microscopía confocal de planos sucesivos de 0.3 μ M de grosor sobre la misma célula.

El hecho de que la disociación de la DGK α de estructuras de membrana depende de su actividad enzimática, nos ha permitido el seguimiento intracelular de la GFP-DGK α a lo largo del tráfico vesicular. Una vez que la GFP-DGK α transloca a la membrana del TGN, donde regularía la formación de vesículas, en presencia de R59949 quedaría retenida en la membrana de estas vesículas y permanecería asociada a éstas a lo largo de todo el proceso de transporte vesicular. Al mismo tiempo, si la DGK α estuviese también implicada en la generación y la formación de MVBs, su translocación a estas estructuras en presencia de R59949 resultaría en la retención de la GFP-DGK α en la membrana de las vesículas. En la figura 62 se representa mediante imágenes de microscopía confocal de diferentes células la localización de la GFP-DGK α tras la estimulación con CCh a lo largo de la ruta exocítica en presencia de R59949. Las fotografías **a** y **b** muestran la localización de en el TGN. De esta región parecen emerger las vesículas recién formadas en el TGN, en las cuales la GFP-DGK α quedaría retenida (**c**, **d**, **e**, y **f**), las cuales van a ir distribuyéndose a lo largo del citosol (**g**, **h**, **e** **i**), e ir dando lugar a endosomas tardíos y/o MVBs de mayor tamaño (**j**, **k** y **l**).

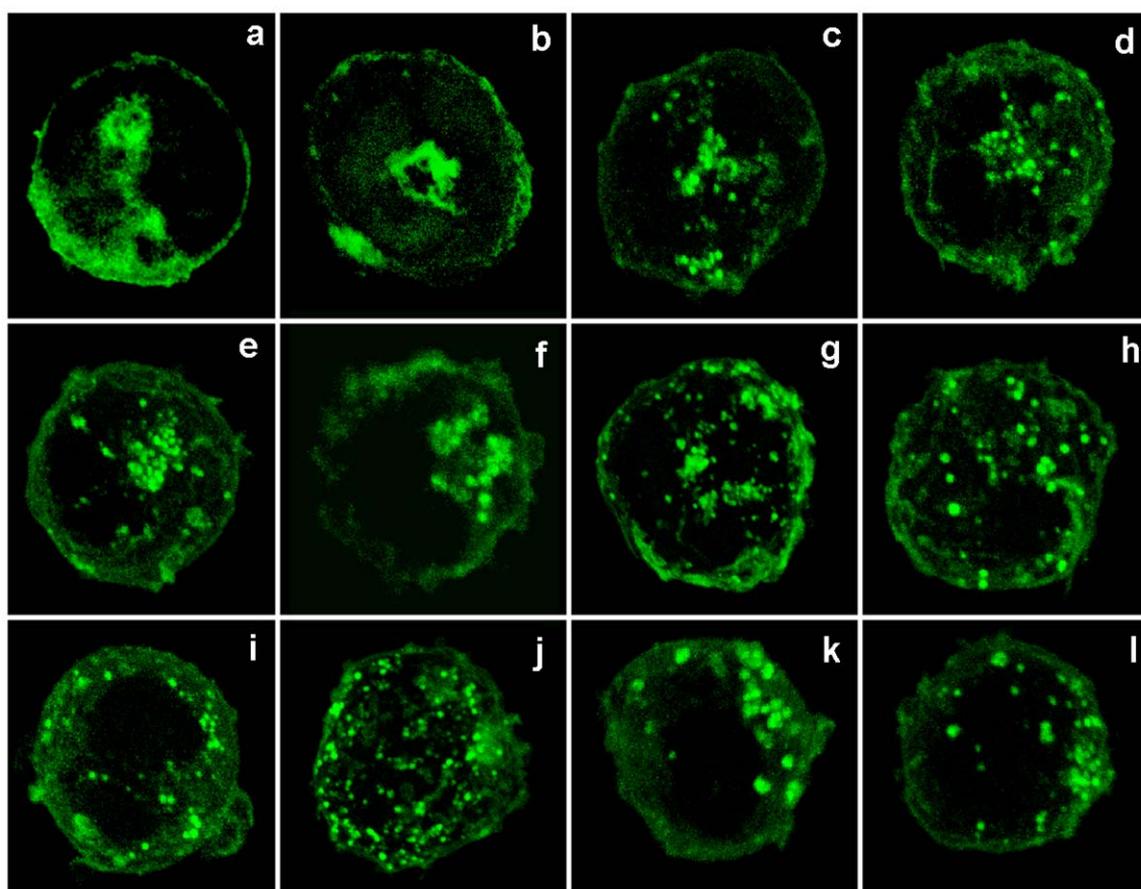


Figura 62. Representación de la localización intracelular de GFP-DGK α en la ruta exocítica tras estimulación con CCh. Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con el vector pEF-GFP-DGK α . 48 h después fueron estimuladas con CCh (500 μ M, 6-8 horas) en presencia del inhibidor de DGKs R59949 (10 μ M). Se tomaron imágenes de planos confocales sucesivos de diferentes células mediante microscopía confocal y se procedió a su proyección en el eje Z.

A la vista de todos los resultados obtenidos tanto por fraccionamiento subcelular como por microscopia confocal no podemos excluir que la DGK α experimente además de la translocación a la membrana de las vesículas emergentes del TGN, translocación a los endosomas tardíos procedentes de estas vesículas, así como a la membrana de los cuerpos multivesiculares, pudiendo estar implicada en la formación, transformación y modificación de estas estructuras vesiculares.

4.27 El R59949 potencia la localización de la construcción GFP-DGK α en el interior de cuerpos multivesiculares tras la estimulación con CCh.

Diversas proteínas de membrana, quinasas de lípidos y lípidos específicos (como el LBPA) son reclutados y dirigidos de forma selectiva a la membrana de endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares, donde van a dirigir o están implicados en el proceso de vesicularización interna que sufre la membrana del endosoma tardío para dar lugar al cuerpo multivesicular propiamente dicho [Denzer et al., 2000].

Para analizar la posible implicación de la DGK α en este proceso de formación del MVB, se utilizó el inhibidor de DGKs R59949 con dos finalidades: en primer lugar, el aumento en la formación de vesículas/cuerpos multivesiculares (MVBs) CD63⁺/lamp-1⁺/LBPA⁺ llevado a cabo por el tratamiento con este inhibidor tras la estimulación con CCh (figuras 36, 37, 42, 43, y 44); y en segundo lugar, explotar su función como inhibidor de la actividad catalítica de DGK, y evitar la disociación de la DGK α de las estructuras de membrana. Para ello, se estudió el efecto del R59949 sobre la localización de la GFP-DGK α tras estimulación con CCh en células JHM1-2.2 mediante microscopía confocal y marcaje con CD63 como marcador de endosomas tardíos/MVBs (figura 63A). Se puede observar como la GFP-DGK α se acumula en vesículas emergentes de la región perinuclear/TGN (flechas), co-localizando con el marcador CD63 en diferentes planos sucesivos de la célula (planos superiores, marcaje amarillo en la distribución perinuclear circular). En los siguientes planos focales se va observando también co-localización con estructuras vesiculares CD63⁺ (planos inferiores) que se encuentran distribuidas desde la zona perinuclear y a lo largo del citoplasma (flechas). También se pueden observar vesículas con marcaje doble para GFP-DGK α y CD63 en la periferia de la célula. En la figura 63B (página 127) se muestra la proyección en el eje Z de los diferentes planos focales obtenidos, en las cuales se observa en conjunto la distribución de la GFP-DGK α y de CD63.

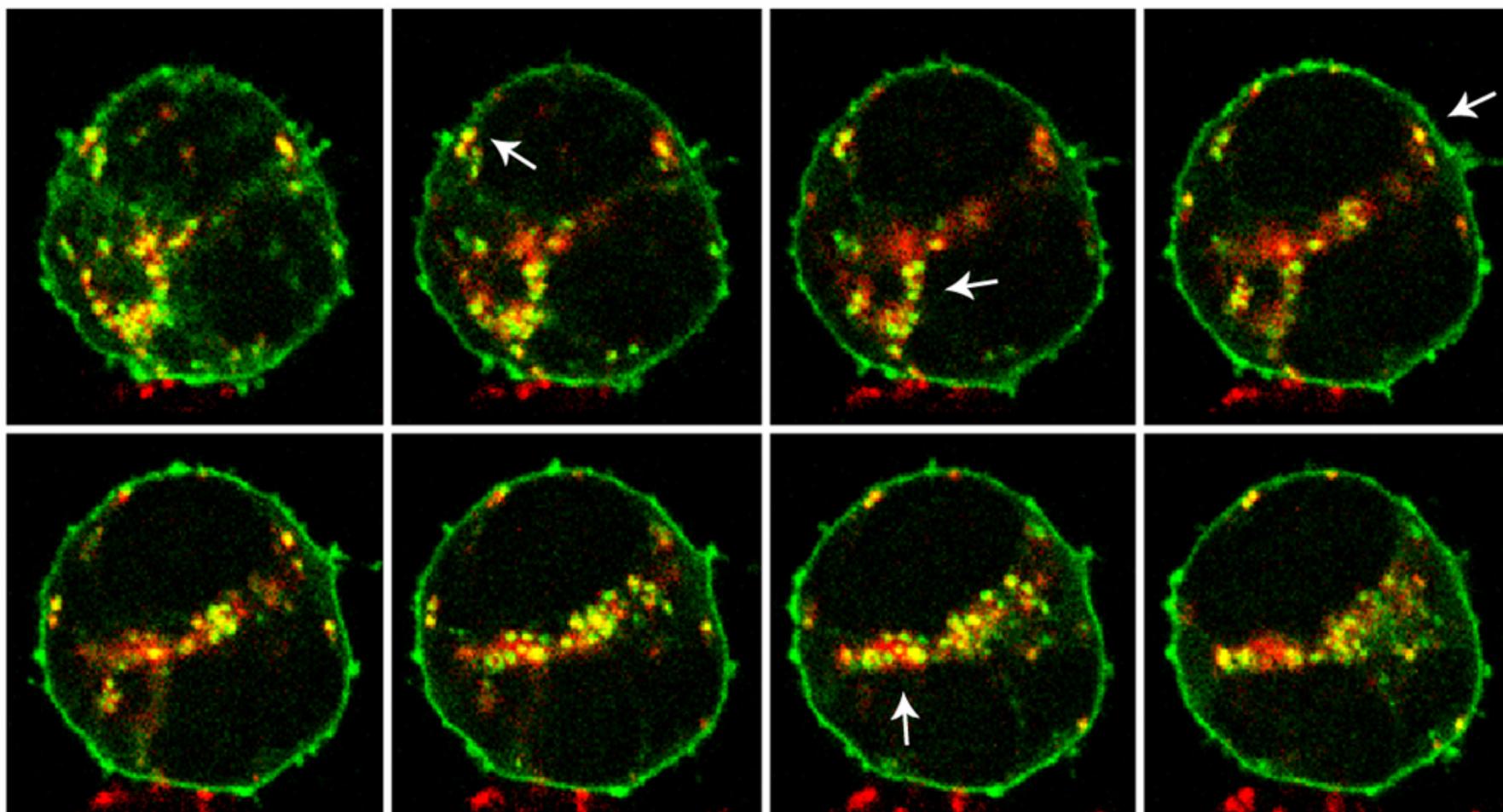


Figura 63. *GFP-DGK α es retenida en estructuras CD63⁺ en presencia del inhibidor R59949.* Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con el vector de expresión pEF-GFP-DGK α . 48 h después fueron estimuladas con CCh (500 μ M, 8 horas) en presencia de R59949 (10 μ M) y se realizó un marcaje intracelular utilizando Ab anti-CD63 y posterior anticuerpo secundario conjugado con Cy5 (rojo). Se tomaron imágenes de microscopía de secciones confocales de 0.3 μ M de grosor, mostrándose la mezcla de los canales de fluorescencia verde (GFP-DGK α) y roja (CD63), apareciendo en amarillo el solapamiento de ambas señales (verde + rojo).

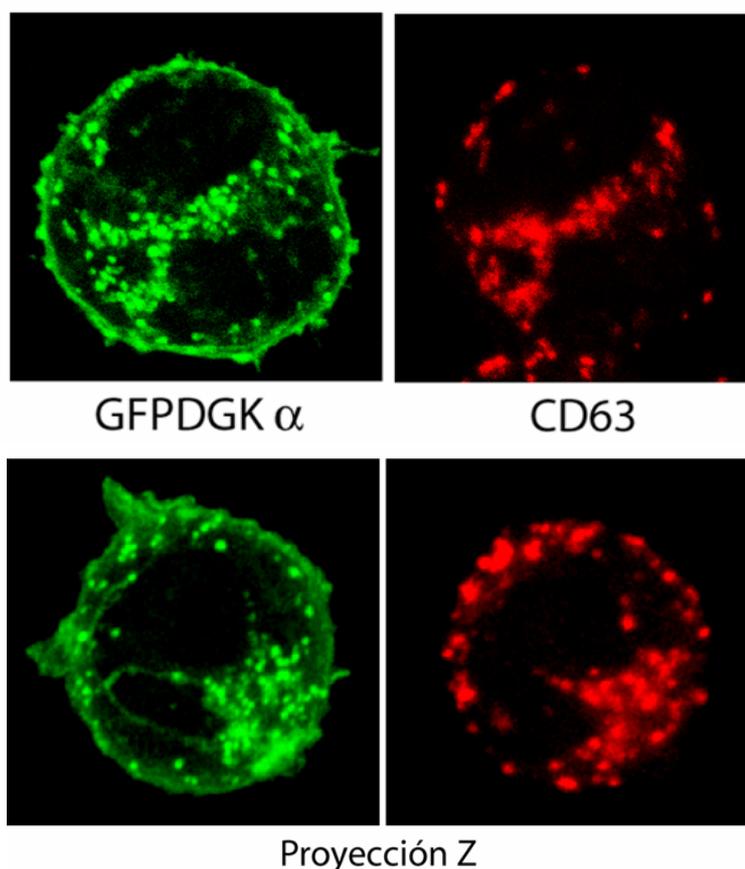


Figura 63B. *GFP-DGK α es retenida en estructuras CD63⁺ en presencia del inhibidor R59949. Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con el vector de expresión pEF-GFP-DGK α . 48 h después fueron estimuladas con CCh (500 μ M, 8 horas) en presencia de R59949 (10 μ M) y se realizó un marcaje intracelular utilizando Ab anti-CD63 y posterior anticuerpo secundario conjugado con Cy5 (rojo). Se tomaron imágenes de microscopía de secciones confocales sucesivas de 0.3 μ M de grosor cada una y se procedió a su proyección en el eje Z.*

La DGK α , además de participar en la formación de vesículas a nivel de la translocación de la PKD al TGN (apartados 4.22, 4.23), también podría estar implicada en la formación de MVBs. Si esto es así, su translocación a estas estructuras en presencia de R59949 resultaría en la retención de la GFP-DGK α en la membrana del MVB, y en su posterior internalización durante el proceso de vesicularización interna que da lugar a la formación de microvesículas dentro del MVB. Como consecuencia, la DGK α se debería encontrar acumulada dentro de los MVBs. En las figuras 64 y 65, se puede observar como en diferentes planos sucesivos la GFP-DGK α co-localiza con CD63 en la región perinuclear, y también en la zona cercana a la membrana plasmática. Además, la GFP-DGK α también se encuentra co-localizando con CD63 en el interior de estructuras CD63⁺ (marcaje amarillo en el centro del marcaje CD63⁺ en rojo).

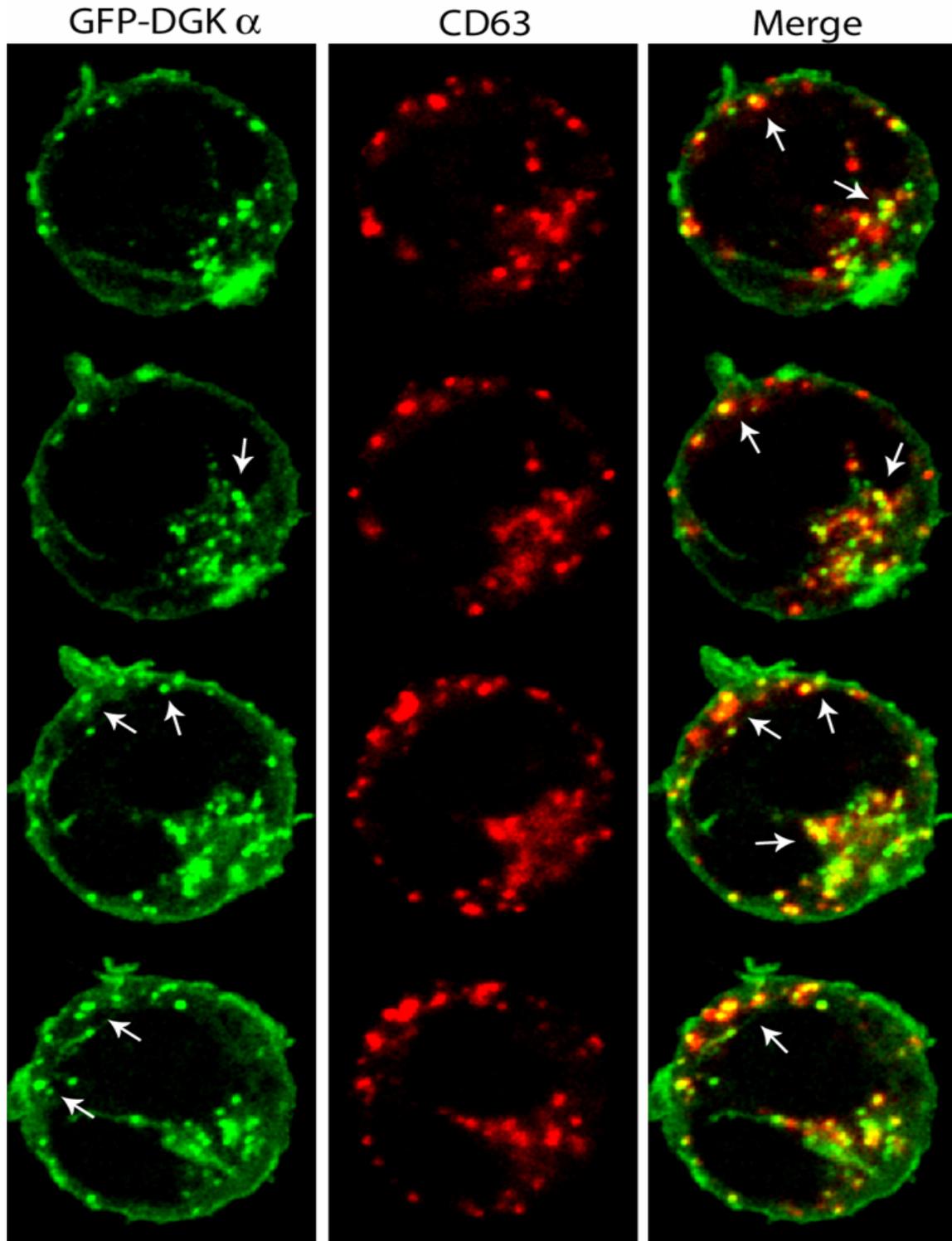


Figura 64. *GFP-DGK α es retenida en presencia de R59949 en estructuras CD63⁺. Células JHM1-2.2 fueron tratadas como se indica en la figura 62. Se realizó un marcaje intracelular utilizando Ab anti-CD63 y anticuerpo secundario conjugado con Cy5 (rojo). Se tomaron imágenes de microscopía de secciones confocales de 0.3 μ M, mostrándose la mezcla de los canales de fluorescencia verde (GFP-DGK α) y roja (CD63), apareciendo en amarillo el solapamiento de ambas señales (verde + rojo).*

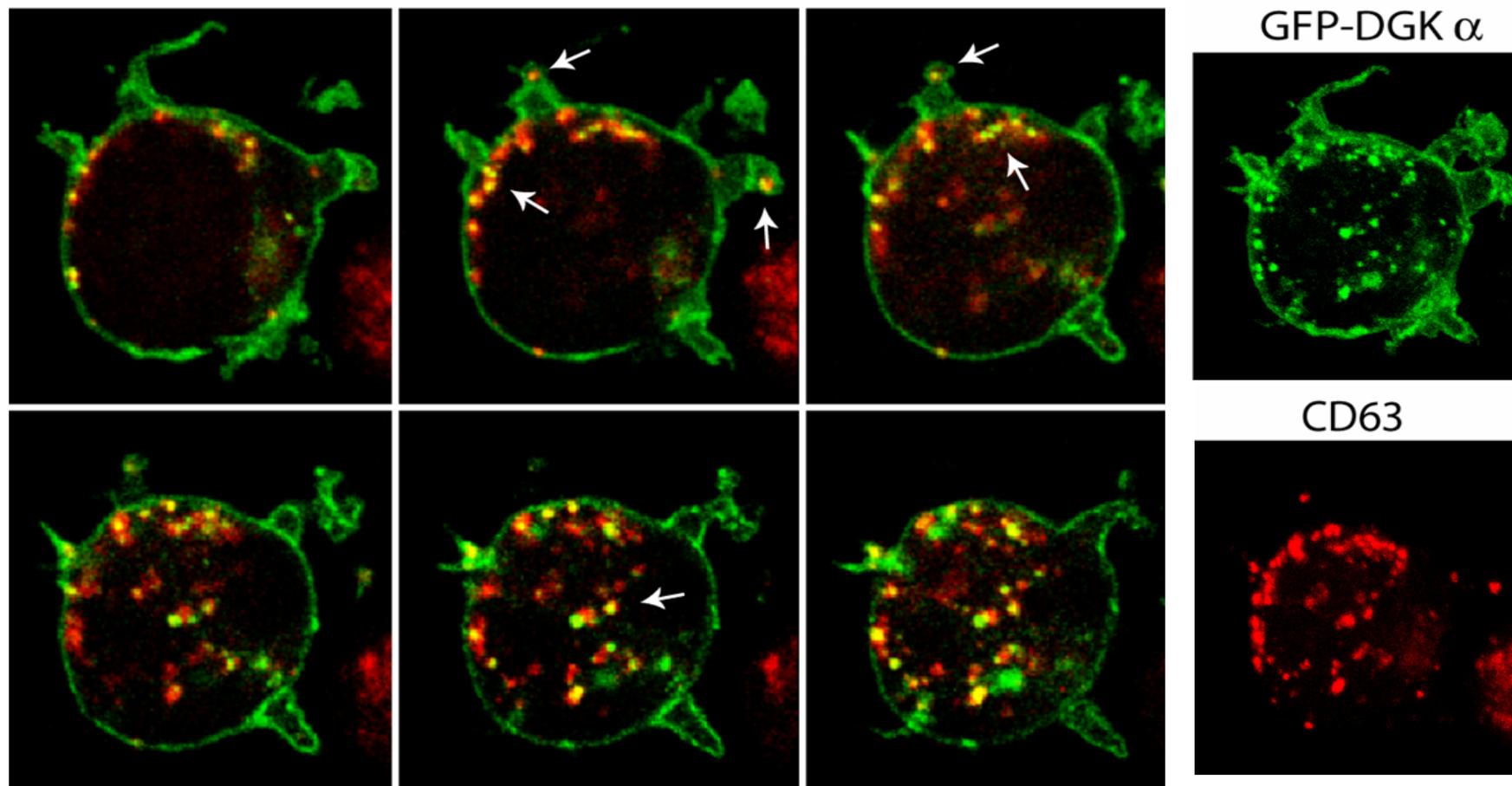


Figura 65. *GFP-DGK α es retenida en presencia del inhibidor R59949 en el interior de estructuras CD63⁺. Células JHM1-2.2 fueron tratadas como se indica en la figura 62. Se realizó un marcaje intracelular utilizando Ab anti-CD63 y posterior anticuerpo secundario conjugado con Cy5 (rojo). Se tomaron imágenes de microscopía de secciones confocales de 0.3 μ M, mostrándose la mezcla de los canales de fluorescencia verde (GFP-DGK α) y roja (CD63), apareciendo en amarillo el solapamiento de ambas señales (verde + rojo). En la parte derecha se muestra la proyección en el eje Z de las imágenes de los diferentes planos adquiridos para cada fluorescencia (verde y roja).*

Como se ha comentado, la estimulación con CCh induce formación de los cuerpos multivesiculares (6-8 horas de estimulación), los cuales van a ser dirigidos a la superficie celular donde se van fusionar con la membrana plasmática, produciéndose la liberación de las microvesículas o exosomas al exterior celular [Monleon et al., 2001]. En células T se ha observado que tras estimulación con PHA la morfología de las células cambia y se produce la emisión de pseudópodos con acumulación de cuerpos multivesiculares que contienen FasL, detectándose la liberación al exterior de exosomas con FasL en las zonas de contacto del MVB con la membrana plasmática [Monleon et al., 2001]. En la figura 65 se pueden observar la emisión de estos pseudópodos tras la estimulación con CCh, así como acumulación de diversos MVBs CD63⁺ en el citoplasma así como en la proximidad de la membrana plasmática. Para visualizar en más detalle estas estructuras se realizó un aumento digital de las imágenes de confocal obtenidas en la figura 64 (figura 66A) y 65 (figura 66B). Se observó claramente la acumulación de MVBs CD63⁺ tanto en los pseudópodos como en la proximidad de la membrana plasmática, detectándose en el interior de estos MVBs la GFP-DGK α (puntos amarillos, flechas blancas).

Figura 66A. *GFP-DGK α es retenida en estructuras CD63⁺ en presencia del inhibidor R59949 localizadas en pseudópodos y en contacto con la membrana plasmática. Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con el vector de expresión pEF-GFP-DGK α . 48 h después fueron estimuladas con CCh (500 μ M, 8 horas) en presencia de R59949 (10 μ M) y se realizó un marcaje intracelular utilizando Ab anti-CD63 y posterior anticuerpo secundario conjugado con Cy5 (rojo). Se tomaron imágenes de microscopía de secciones confocales de 0.3 μ M de grosor, mostrándose la mezcla de los canales de fluorescencia verde (GFP-DGK α) y roja (CD63), apareciendo en amarillo el solapamiento de ambas señales (verde + rojo). En la parte superior se muestra una ampliación digital de la región correspondiente a los pseudópodos emitidos por las células tras la estimulación con CCh.*

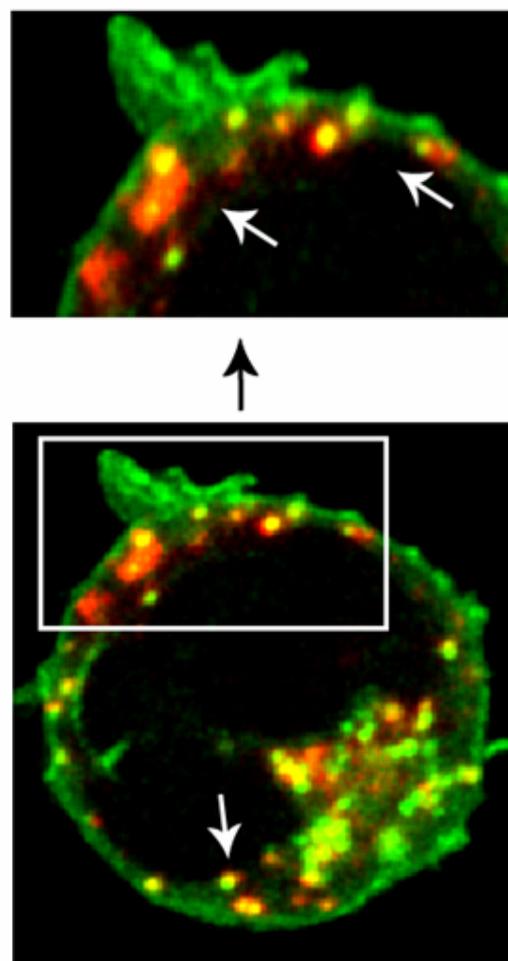
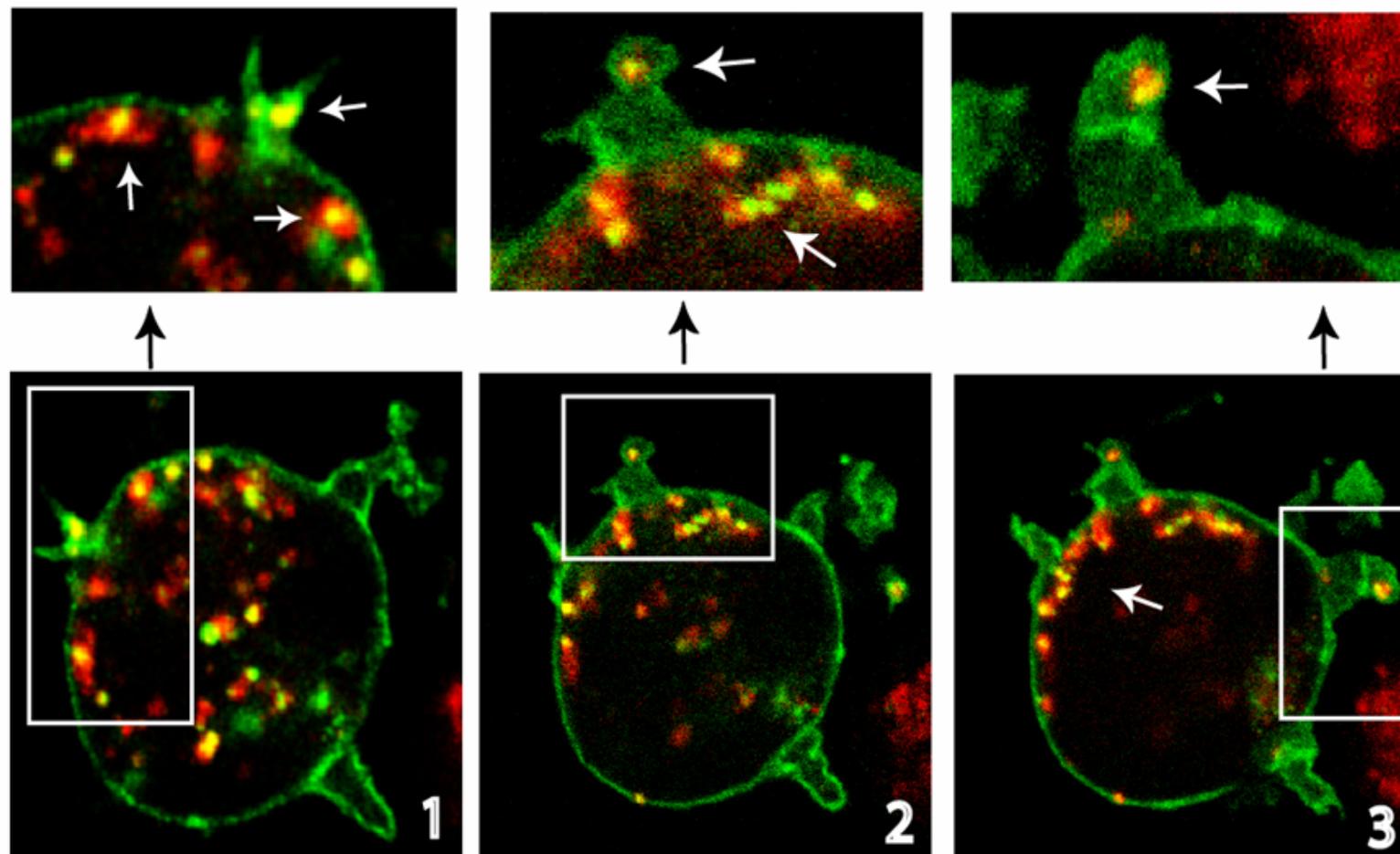
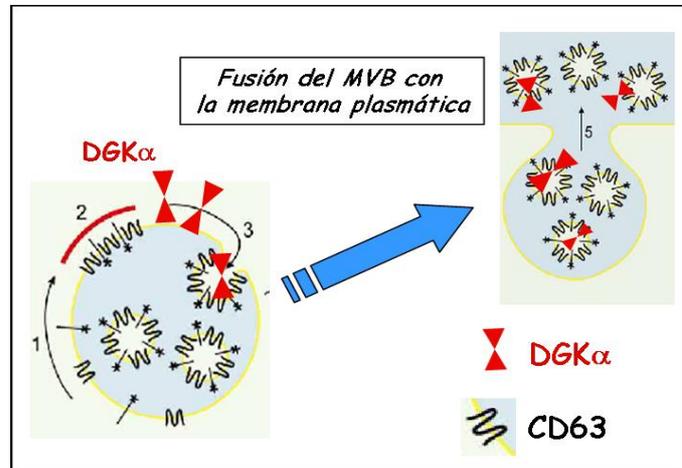


Figura 66B. *GFP-DGK α es retenida en estructuras CD63⁺ en presencia del inhibidor R59949 localizadas en pseudópodos y en contacto con la membrana plasmática. Células JHM1-2.2 fueron tratadas como se indica en la figura 66A. Se muestra la mezcla de los canales de fluorescencia verde (GFP-DGK α) y roja (CD63), apareciendo en amarillo el solapamiento de ambas señales (verde + rojo) correspondiente a la célula representada en la figura 65.*



Por lo tanto si la DGK α transloca a la membrana del cuerpo multivesicular (MVB) y está implicada en el proceso de formación de exosomas que tiene lugar en el interior del MVB (esquema), debería también estar presente y ser detectada en la membrana de los exosomas secretados al exterior celular tras la estimulación.

Esquema representativo del proceso de vesicularización interna que tiene lugar en la membrana del endosoma tardío para dar lugar al cuerpo multivesicular.



Para apoyar esta hipótesis, la presencia de la DGK α endógena en los exosomas secretados fue analizada mediante WB en la fracción de exosomas obtenida de los sobrenadantes de cultivo de células JHM1-2.2 sin estimular (control) o estimuladas con CCh (figura 67A); o blastos T humanos estimulados con α -CD3 o PHA (figura 67B), durante 10 horas. Como se puede observar la DGK α fue detectada en los exosomas secretados por ambos tipos celulares.

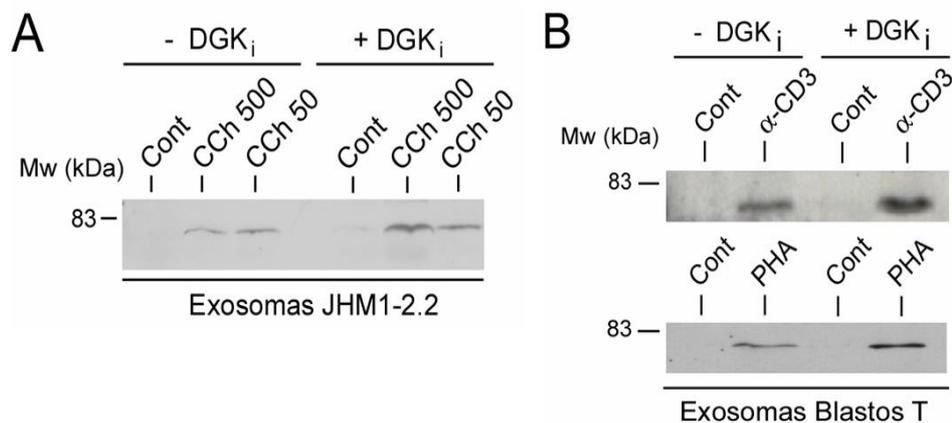


Figura 67. La inhibición farmacológica de DGK α aumenta la presencia de DGK α en los exosomas secretados. (A) 2×10^7 células JHM1-2.2 fueron estimuladas con CCh (500, 50 μ M) durante 10 horas en presencia o ausencia de R59949 (10 μ M). Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos y sometidos a ultracentrifugación. Se analizó la presencia de DGK α en los pellets ultracentrifugados mediante WB. (B) 2×10^7 blastos T CD4⁺ fueron estimuladas con anti-CD3 pegado a plástico (0.5 μ g/ml) o con PHAm (pulso de 5 minutos con 50 μ g/ml) durante 10 horas en presencia o ausencia de R59949 (10 μ M).

El tratamiento de las células con R59949 potenciaba la secreción de exosomas al medio extracelular tras la estimulación con CCh. La presencia de la DGK α en los exosomas secretados también mostró mayores niveles como cabría esperar al secretarse mayor número de exosomas (figura 67). En cambio, al analizar el incremento relativo en los niveles de DGK α presentes en los exosomas secretados frente al incremento en CD63 y FasL, se observó un incremento mucho mayor para la DGK α (figura 68). Este hecho indicaba que el R59949 está aumentando la proporción de la DGK α asociada a estos exosomas.

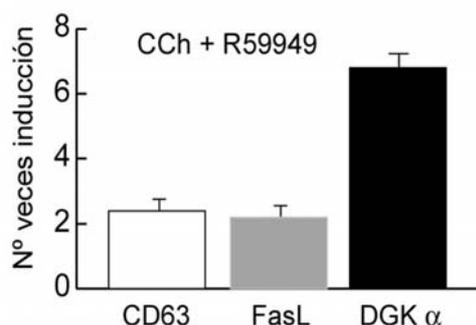


Figura 68. La inhibición farmacológica de la DGK α aumenta la proporción de DGK α asociada a exosomas. Análisis por densitometría del incremento en los niveles de CD63, FasL y DGK α detectados por WB en la fracción de exosomas secretados por células JHM1-2.2 tras estimulación con CCh (500 μ M, 10 horas) en presencia de R59949 (10 μ M).

La DGK α también fue detectada en los exosomas secretados tras el tratamiento con el análogo de DAG DOG (figura 69A). Este hecho demuestra que el mantenimiento de los niveles de DAG, obtenido por la inhibición de DGK con el R59949, o bien por la adición de DOG exógeno, es un regulador importante de la asociación de DGK α a la membrana de los exosomas. La construcción GFP-DGK α expresada en células JHM1-2.2 también fue detectada junto con la DGK α endógena en los exosomas secretados (figura 69B), sugiriendo que tanto la DGK α endógena como la GFP-DGK α se comportan de forma similar, translocando a la membrana del MVB y posteriormente localizándose en la membrana de los exosomas.

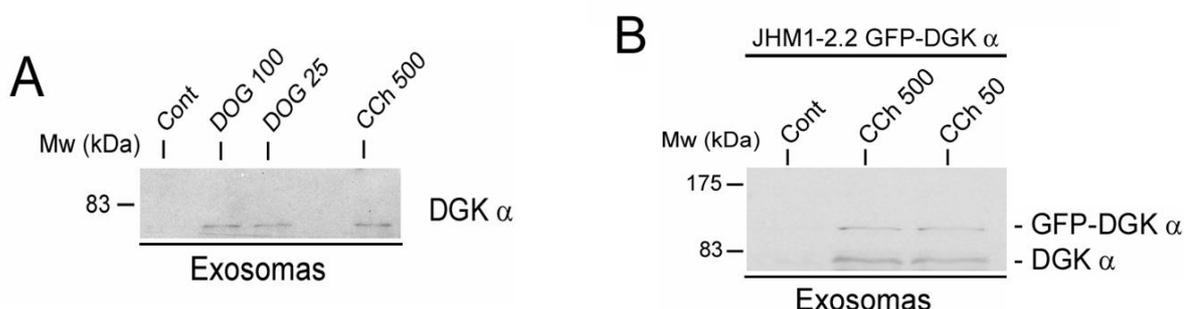


Figura 69. DGK α y GFP-DGK α fueron detectadas en los exosomas secretados. (A) 2×10^7 células JHM1-2.2 fueron tratadas con DOG (100 y 25 μ g/ml) o con CCh (500 μ M) durante 10 horas. Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos y se analizó la presencia de DGK α en los pellets ultracentrifugados mediante WB. (B) Células JHM1-2.2 fueron transfectadas con pEGFP-DGK α . 2×10^7 células fueron estimuladas con CCh (500, 50 μ M, 10 h). Los sobrenadantes de cultivo fueron recogidos y se analizó la presencia de DGK α en los pellets ultracentrifugados mediante WB.

5. Discusión.

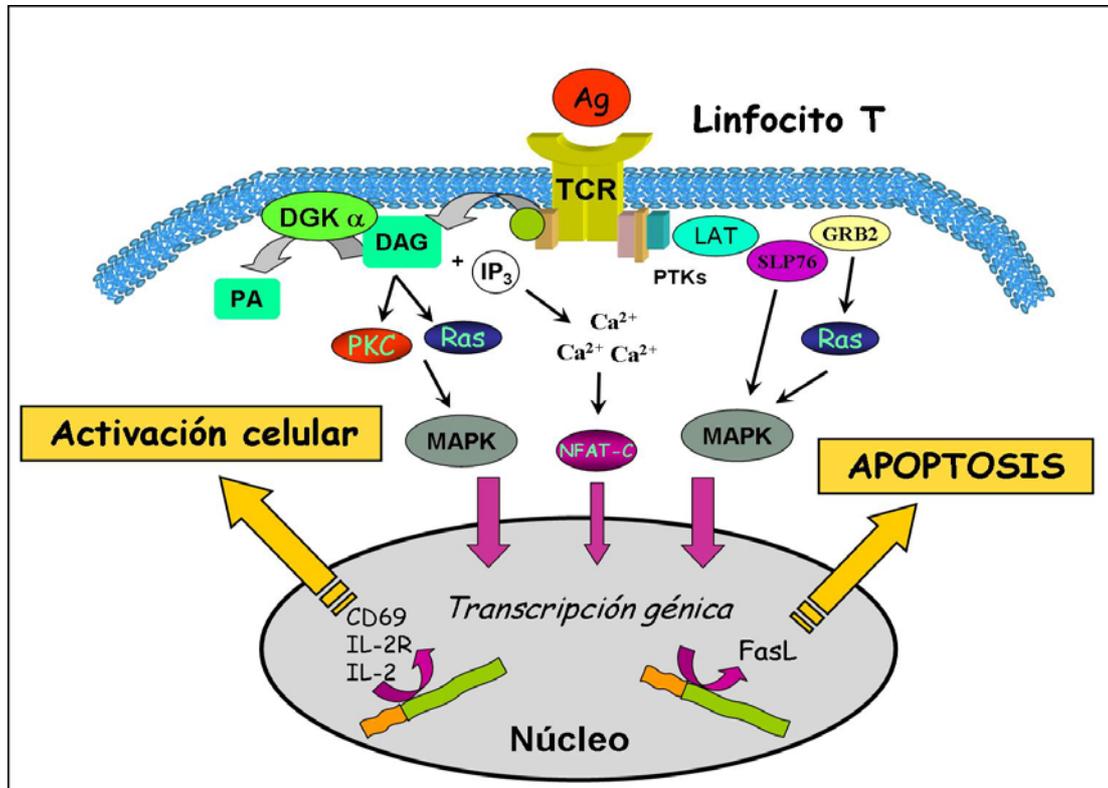
“La experiencia no consiste en el número de cosas que se han visto, sino en el número de cosas que se han reflexionado.”

5.1 DGK α , activación celular y muerte celular inducida por activación (AICD) tras estimulación de receptor.

La estimulación del receptor de células T (TCR) induce una rápida activación de proteínas tirosin quinasas [Finco, 1998; Kane et al., 2000;] y la activación del recambio de fosfolípidos de inositol, que a su vez da lugar a la generación de segundos mensajeros, como el DAG [Cantrell et al., 1996] y el aumento del calcio intracelular. Estas cascadas de señalización mediada por el TCR controlan tanto la activación del linfocito T, como la muerte celular inducida por activación o AICD, presentando vías de señalización intracelulares que son comunes a ambos procesos; por ejemplo, el aumento de calcio intracelular y la vía Ras/MAP2K están implicadas en el control transcripcional del gen de la IL-2 [Rayter et al., 1992], y también están implicadas en la regulación transcripcional del gen de FasL [Latinis et al., 1997]. Estudios diversos con mutantes de TCR defectivos en la inducción de apoptosis, pero que presentan respuestas normales de activación, han revelado que diferencias pequeñas en las vías de señalización intracelular y/o un balance sutil de señales positivas y negativas que regulan cada una de las vías de señalización derivadas de la estimulación del TCR, podrían explicar como el TCR regula de manera diferencial ambas respuestas biológicas [Sahuquillo et al., 1998; Teixeira et al., 1999; Teixeira et al., 2002].

Las diacilglicerol quinasas (DGKs) constituyen uno de los reguladores negativos que controlan la señalización mediada por la vía DAG/Ras/ERK [Ebinu et al., 2000; Topham et al., 2001; Zhong et al., 2002]. Tras la estimulación del linfocito T la DGK de tipo I DGK α transloca a la membrana plasmática tanto en cultivos celulares *in vitro* como en modelos *in vivo* [Sanjuán et al., 2001; Sanjuán et al., 2003]. En esta localización, la DGK α actúa como modulador negativo de los niveles de DAG generados tras estimulación, y está implicada en la atenuación de las respuestas celulares que dan lugar a la **activación del linfocito T** [Sanjuán et al., 2001; Jones et al., 2002; Sanjuán et al., 2003]. Con estos antecedentes se estudió el control de las señales intracelulares reguladas por el DAG implicadas en muerte, y el papel de la DGK α en la **muerte celular inducida por activación (AICD)** en linfocitos T. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la sobre-expresión de la DGK α inhibe la muerte celular por AICD mediada por FasL en linfocitos T, mientras que la inhibición farmacológica de la DGK α potencia la muerte celular a través del sistema Fas/FasL. Como se ha descrito, la actividad de la DGK α está implicada en la regulación negativa de la vía Ras/MAP2K y de las respuestas de activación del linfocito T mediadas por Ras. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que regulando la ruta del DAG mediante la sobre-expresión de DGK α , su inhibición farmacológica, así como mediante la expresión de construcciones constitutivamente activas o catalíticamente inactivas de DGK α , no se afecta el control transcripcional del gen para FasL, proceso controlado por la vía Ras/MAP2K [Latinis et al., 1997]. En cambio esta ruta sí regula de forma negativa la transcripción del gen para el marcador de activación celular CD69. La ruta de la DGK α tampoco ejerció ningún efecto a nivel traduccional sobre los niveles intracelulares de FasL, pero sí afectó la expresión en membrana

plasmática de CD69. De estos resultados se puede inferir que el DAG generado a nivel de membrana plasmática juega un papel importante en el control de la vía Ras/MAP2K durante las respuestas de activación del linfocito T, mientras que otras señales inducidas tras la estimulación de receptor distintas de DAG, como la activación de proteínas tirosin quinasas (PTKs), proteínas adaptadoras como LAT/Grb2/Sos, SLP-76, y/o el aumento de calcio intracelular [Jordan et al., 2003], contribuirían a la activación de la vía Ras/MAP2K implicada en el control de la expresión génica de FasL. Estos resultados sugieren la existencia de un punto de divergencia entre las señales que regulan la transcripción de genes implicados en activación/proliferación y muerte celular por apoptosis tras la estimulación de receptor, sugiriendo que la vía DAG/PKC/Ras/MAPK estaría implicada en la regulación de las señales de activación en el linfocito T, pero no en la vía de inducción de apoptosis a través de la regulación transcripcional de FasL durante la AICD (ver esquema). El hecho de que la ruta Ras y MAP2KK (MEK-1) se encuentra implicada en las señales que conducen a la selección positiva durante el desarrollo de los timocitos (proceso de activación), pero es irrelevante en el proceso de muerte celular por AICD durante la selección negativa de los timocitos [Alberola-Ila et al., 1995; Alberola-Ila et al., 1996], confirmarían la existencia de este punto de divergencia entre las señales que conllevan activación/proliferación y AICD. Por el contrario la inhibición de la quinasa JNK/p38 en la ruta de las MAPKs reduce el proceso de selección negativa en timocitos, pero no el proceso de selección positiva, indicando que alteraciones en la señalización intracelular de células T puede inducir respuestas biológicas bien diferentes [Gong et al., 2001].



S

Señalización intracelular tras estimulación del TCR en linfocitos T.

5.2 Inducción de apoptosis por mFasL presente en exosomas.

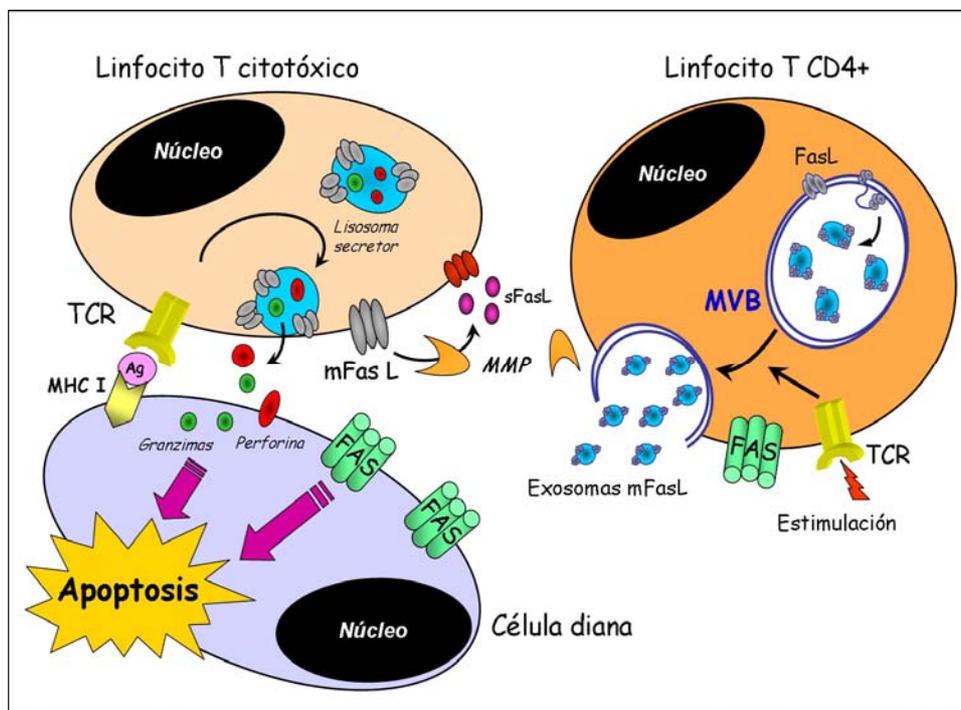
En linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTLs) y células NK, el mFasL se encuentra pre-formado y almacenado intracelularmente en la membrana externa de lisosomas secretores o gránulos líticos citoplasmáticos que tienen estructura de endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares (MVB) [Nagata et al., 1997; Bossi et al, 1999]. Tras la activación del CTL durante la formación de la sinapsis inmune, estos lisosomas secretores son dirigidos a la superficie celular, donde se van a fusionar con la membrana plasmática. Como consecuencia de este proceso tiene lugar la re-localización de FasL en la superficie celular, y la liberación al medio extracelular de proteínas solubles como perforina, granzimas A y B e hidrolasas ácidas como la catepsina D [Bossi et al., 1999].

Además de este mecanismo de expresión de mFasL en la superficie celular, las células T Jurkat y linfoblastos T humanos primarios liberan al medio extracelular mFasL pre-formado localizado en la membrana de exosomas. Durante el proceso de vesicularización interna que tiene lugar para la formación del cuerpo multivesicular (MVB), FasL es dirigido de la membrana externa del endosoma tardío hacia las membranas internas del MVB, lo que va a dar lugar a las microvesículas o exosomas almacenadas en el interior de éste. De esta manera, mFasL se localiza en la membrana de estos exosomas [Monleon et al., 2001]. Tras la estimulación del linfocito T, la fusión del MVB con la membrana plasmática induce la secreción de estos exosomas que contienen mFasL pre-formado al exterior celular [Martínez-Lorenzo et al., 1999; Monleon et al., 2001].

La interacción entre Fas/FasL juegan un papel importante en la inducción de AICD en los linfocitos T activados maduros dentro del sistema inmune. La estimulación del TCR en blastos T o del HM1R en células JHM1-2.2 induce la síntesis *de novo* de FasL, lo cual nos llevó a estudiar el papel de este FasL sintetizado *de novo* en la AICD de linfocitos T. Se observó que tras la estimulación de estos receptores en células T se induce la síntesis *de novo* de FasL, el cual es también almacenado y localizado en el interior de cuerpos multivesiculares. La fusión del MVB con la membrana plasmática induce la liberación al medio extracelular de los exosomas contenidos en el interior del MVB. Estos exosomas secretados contienen mFasL en su forma no procesada y citotóxica (**mFasL de 40 kDa**). Cuando la fracción de exosomas secretados es presentada a células diana que expresan el receptor Fas, es capaz de inducir muerte celular por apoptosis mediada por FasL. La inhibición de la síntesis *de novo* de FasL con CsA en células JHM1-2.2 y linfoblastos T inhibió la capacidad de estos exosomas secretados de inducir apoptosis, indicando que la presencia de FasL sintetizado *de novo* en los exosomas secretados es necesaria para la inducción de AICD mediada por estos exosomas.

5.3 Especificidad de los exosomas que contienen mFasL.

La multimerización o entrecruzamiento de los receptores de muerte inducida por sus ligandos específicos, y en particular de Fas, han sido descritos como eventos cruciales durante la inducción de apoptosis [Golstein, 2000; Siegel et al., 2000^b]. Al igual que el mFasL expresado en la membrana plasmática, la presencia de mFasL sintetizado *de novo* en la membrana de los exosomas secretados garantiza su potencial citotóxico, al retener la capacidad de multimerización y una alta eficiencia de entrecruzamiento de Fas (“*cross-linking*”) [Jodo et al., 2001]. El FasL expresado en la membrana plasmática es proteolizado rápidamente por metaloproteinasas de la matriz extracelular, dando lugar a un fragmento soluble inactivo (sFasL). Este proceso está implicado en la regulación negativa de la capacidad inductora de apoptosis de mFasL [Kayagaki et al., 1995]. La forma de FasL detectada en los exosomas secretados corresponde a la forma asociada a membrana sin procesar de FasL (**mFasL de 40 kDa**), y por tanto citotóxica. Sin embargo, no se detectó la forma de membrana proteolizada (14 kDa). Este hecho implicaría que, tras la fusión del MVB con la membrana plasmática, se formaría un microentorno extracelular en el cual las metaloproteinasas de la matriz extracelular no tendrían acceso al FasL presente en la membrana de los exosomas secretados (esquema), de modo que éste no se proteolizaría y por tanto mantendría todo su potencial citotóxico. Por otro lado, en comparación con la liberación de proteínas solubles al medio extracelular, los exosomas con FasL tienen una movilidad menor, y por tanto permitirían el mantenimiento de una concentración local de FasL alta, a la vez que se limitaría la acción pro-apoptótica de FasL sobre las células vecinas.



Expresión de mFasL en células T.

La especificidad de los exosomas secretados sobre células diana específicas es uno de los puntos clave en la inducción de AICD para mantener la homeostasis del sistema inmune. En el caso de la secreción de gránulos líticos/lisosomas secretores por parte de los linfocitos T citotóxicos (CTLs), el proceso de degranulación o liberación de estos gránulos citotóxicos y su contenido está controlada por el entrecruzamiento del TCR en condiciones de activación clonal. En segundo lugar, este proceso de secreción es polarizado, de modo que mFasL y el sistema perforina/granzimas son dirigidos a la superficie celular sólo en la zona de la sinapsis inmune entre el CTL y la célula diana [Stinchcombe et al., 1999; Clark et al., 2003]. En el caso de la secreción al medio extracelular de exosomas con mFasL, la especificidad clonal sobre las células diana durante el proceso de AICD podría ser explicada por el hecho de que únicamente aquellas células que han sido previamente activadas a través del TCR son sensibles a la apoptosis por mFasL [Green et al., 2003; Bosque et al., 2005]. Además de esta especificidad, los exosomas secretados por células T presentan en su membrana el complejo TCR/CD3, proteínas del MHC de clase I y II, tetraspaninas como CD63, así como varias moléculas de adhesión como CD2 y CD18 [Peters et al., 1990; Blanchard et al., 2002]. Los exosomas también contienen combinaciones de ligandos, moléculas co-estimuladoras y proteínas accesorias que no están presentes en la superficie celular [Thery et al., 2002], y que podrían interactuar con diferentes receptores simultáneamente, de forma que se controlaría su difusión y se mantendría su acción sobre las células diana. Un ejemplo es la proteína de la familia de las tetraspaninas CD63, presente en los exosomas secretados por células T. CD63 es capaz de formar complejos con moléculas del MHC de clase I y II, integrinas, los co-receptores CD4 y CD8 así como con otras tetraspaninas [Angelisova et al., 1994; Imai et al., 1995; Rubinstein et al., 1996;]. CD63 juega un papel importante en la presentación antigénica, activación del linfocito T y procesos de adhesión [Denzer et al., 2000]. La interacción múltiple entre diferentes proteínas y la formación de grandes complejos proteicos por parte de estas proteínas presentes en los exosomas podrían facilitar interacciones específicas [Thery et al., 2002] y por tanto, podrían jugar un papel importante en la direccionalización de estos exosomas con mFasL a células diana específicas, evitando la muerte inespecífica de células adyacentes.

5.4 Papel de los exosomas en el sistema inmune.

La generación de exosomas o microvesículas con una actividad funcional ha sido descrita en diferentes tipos celulares: plaquetas, eritrocitos, monocitos, células dendríticas, células B, células presentadoras de antígeno, linfocitos T, células NK [Robinson et al., 1992; Bevers et al., 1992; Yano et al., 1994]. En estos tipos celulares, la secreción de estos exosomas está regulada por estímulos específicos: las plaquetas generan microvesículas cuando son activadas con trombina, colágeno o ionóforos de calcio, los eritrocitos tras estimulación con ionóforos de calcio; y los monocitos tras estimulación con endotoxina [revisado en Stinchcombe et al., 1999; Stoorvogel et al., 2002; Wubbolts et al., 2003]. Recientemente se ha descrito la liberación al

medio extracelular de exosomas que contienen el receptor para el factor de necrosis tumoral TNFR1 en su forma no procesada por parte de células vasculares endoteliales humanas [Hawari et al., 2004]. En este estudio se sugiere que esta liberación representaría un mecanismo alternativo de liberación al medio extracelular de receptores de citoquinas en una forma soluble. Los linfocitos T citotóxicos (CTLs) liberan gránulos citolíticos almacenados en el interior celular dentro de estructuras pre-lisosomales de tipo multivesicular o lisosomas secretores [Peters et al., 1991]. Como se ha comentado anteriormente, la activación antigénica del CTL induce la secreción de estos gránulos líticos que contienen perforina y granzimas, las cuales poseen actividad citolítica. Tras estimulación del TCR, los linfoblastos T y células Jurkat producen exosomas que contienen TCR, CD3, CD2 y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I y II (MHC) [Blanchard et al., 2002], moléculas que participarían en el envío de forma específica de estos exosomas hacia células diana. Estas microvesículas o exosomas también contienen moléculas capaces de inducir apoptosis, como FasL y APO2L [Martínez-Lorenzo et al. 1999; el presente trabajo]. Todos estos datos sugieren que la liberación de proteínas bio-activas contenidas en exosomas representaría una vía de comunicación entre células. En concreto, la secreción de exosomas/microvesículas que contienen TCR, CD3, moléculas de adhesión y moléculas pro-apoptóticas contribuiría a la muerte celular autocrina y paracrina durante los procesos de muerte celular inducida por activación (AICD) de linfocitos T, pudiendo constituir un mecanismo generalizado en la regulación y función del sistema inmune [Lenardo et al., 1999; They et al., 2002].

5.5 Exosomas que contienen FasL y el escape inmune de las células tumorales.

Se ha descrito que numerosas células tumorales expresan de manera constitutiva FasL [Walter et al., 1997]. Distintos tipos de células tumorales derivadas de melanomas, carcinoma colo-rectal, y líneas celulares derivadas de cáncer de ovario secretan de manera constitutiva al exterior celular exosomas/microvesículas bio-activas que contienen mFasL, y estos exosomas son capaces de inducir apoptosis mediada por la interacción Fas/FasL [Andreola, 2002; Martínez-Lorenzo, 2004; Abrahams, 2003; Huber et al., 2005]. Este fenómeno no es algo exclusivo de las células en cultivo; las ascitis procedentes de pacientes con cáncer de ovarios, así como el plasma de pacientes con cáncer colo-rectal y carcinoma oral contienen grandes cantidades de microvesículas que contienen mFasL [Abrahams, 2003 #147; Huber et al., 2005; Kim and Whiteside, 2005]. Tales microvesículas pudieran constituir un mecanismo de defensa que protegería al tumor de los linfocitos T y/o células inmunocompetentes que pudieran ejercer una actividad antitumoral, facilitando así el denominado “contra-ataque o escape del tumor” al control del sistema inmune [Restifo et al., 2000].

5.6 DAG, DGK α y la dinámica del tráfico vesicular intracelular.

Algunos lípidos son reguladores esenciales del tráfico intracelular de proteínas, tanto a nivel de la ruta secretora/exocítica como de la ruta endocítica, aunque se conoce poco sobre su papel específico en estos procesos así como los mecanismos que regulan la formación, dinámica y secreción de los exosomas contenidos en los cuerpos multivesiculares (MVBs). El tráfico vesicular de tipo secretor en células eucariotas implica la formación de vesículas a partir de membranas de la parte *trans* del aparato de Golgi (TGN). La maduración de estas vesículas da lugar a endosomas de tipo tardío y posteriormente a la formación de cuerpos multivesiculares. Dentro de estos procesos, los lípidos y fosfoinositoles han sido implicados en el reclutamiento de proteínas adaptadoras y efectoras [Martín et al., 2001]. Existen evidencias que sugieren la implicación en estos procesos de enzimas que modifican los fosfolípidos [Roth et al., 1999], así como de lípidos cuyos niveles están modulados por la actividad DGK, como el DAG, el ácido fosfatídico (PA) y el ácido liso(bis)fosfatídico (LBPA) [Topham et al., 1999; Lebrand et al., 2002; Kobayashi et al., 2002]. En concreto, el ácido lisofosfatídico está implicado en la formación de microvesículas de tipo sináptico [Schmidt et al., 1999] así como en la vesicularización del aparato de Golgi [Weigert et al., 1999].

La eficiencia en la formación de vesículas a partir del TGN depende de una manera crítica de los niveles de DAG en el aparato de Golgi [Roth et al., 1999; Baron et al., 2002; Litvak et al., 2005]. En levaduras, la proteína Sec14p es un regulador negativo de la vía CDP-colina implicada en la biosíntesis de fosfatidilcolina (PC), vía que consume grandes cantidades de DAG. La vía CDP-colina está implicada en la biogénesis de vesículas secretoras derivadas del aparato de Golgi. Sec14p está implicada en el mantenimiento de los niveles basales de DAG; cuando Sec14p es defectiva el DAG es consumido y se da una sobre-producción de fosfatidilcolina (PC), dando lugar al bloqueo del transporte vesicular desde el aparato de Golgi [Kearns et al., 1997]. En este caso el incremento en los niveles de DAG en el aparato de Golgi es capaz de recuperar el defecto en Sec14p [Kearns et al., 1998], mientras que la expresión de una DGK bacteriana (que disminuiría los niveles de DAG), antagoniza la recuperación inducida por el incremento en los niveles de DAG. Por lo tanto, en levaduras el mantenimiento de ciertos niveles de DAG en el aparato de Golgi está implicado en la producción de vesículas secretoras. En mamíferos, la inhibición farmacológica de la producción de DAG da como resultado el bloqueo del transporte de proteínas desde el TGN a la superficie celular [Baron and Malhotra, 2002]. Nir-2 es una proteína esencial en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional del aparato de Golgi, que está implicada en el mantenimiento de los niveles de DAG en el aparato de Golgi. La eliminación de Nir-2 mediante experimentos de ARN de interferencia causó una reducción en los niveles de DAG en el aparato de Golgi y una inhibición del transporte de proteínas desde el TGN a la membrana plasmática. Estos hechos sugieren un papel altamente conservado del DAG durante el proceso de formación de vesículas secretoras desde el TGN y su posterior secreción.

En esta tesis se ha demostrado como la expresión de la DGK α inhibe la secreción de exosomas que contienen mFasL, inducida tras la estimulación de receptor. Como consecuencia, se inhibe la muerte celular paracrina mediada por estos exosomas. A su vez, la inhibición farmacológica de la DGK α , que induce un aumento en los niveles de DAG, potencia la secreción de estos exosomas con mFasL citotóxico y aumenta la muerte celular mediada por éstos. El tratamiento de células JHM1-2.2 con DOG, análogo permeable de DAG, induce también secreción de exosomas, además de potenciar la secreción mediada por la estimulación del receptor HM1R con CCh, lo cual confirmaría el papel del DAG durante la secreción de exosomas en células T.

Los niveles de DAG mantenidos en las membranas del aparato de Golgi resultan cruciales en el proceso de formación de vesículas secretoras desde el TGN [Roth et al., 1999; Sprong et al., 2001], a través del reclutamiento de la proteína quinasa D (PKD) al TGN [Liljedahl et al., 2001; Baron et al., 2002]. En el presente trabajo se ha demostrado por vez primera que la DGK α se encuentra asociada a estructuras TGN/MVBs en linfocitos T. La distribución intracelular de DGK α analizada mediante fraccionamientos subcelulares y gradientes de densidad, así como por microscopía confocal, revelan que una fracción de la DGK α se encuentra asociada a estructuras CD63⁺ y TGN46⁺. Concretamente la DGK α se encuentra asociada a estructuras subcelulares correspondientes al TGN, pero no así a la parte *cis o media* del aparato de Golgi.

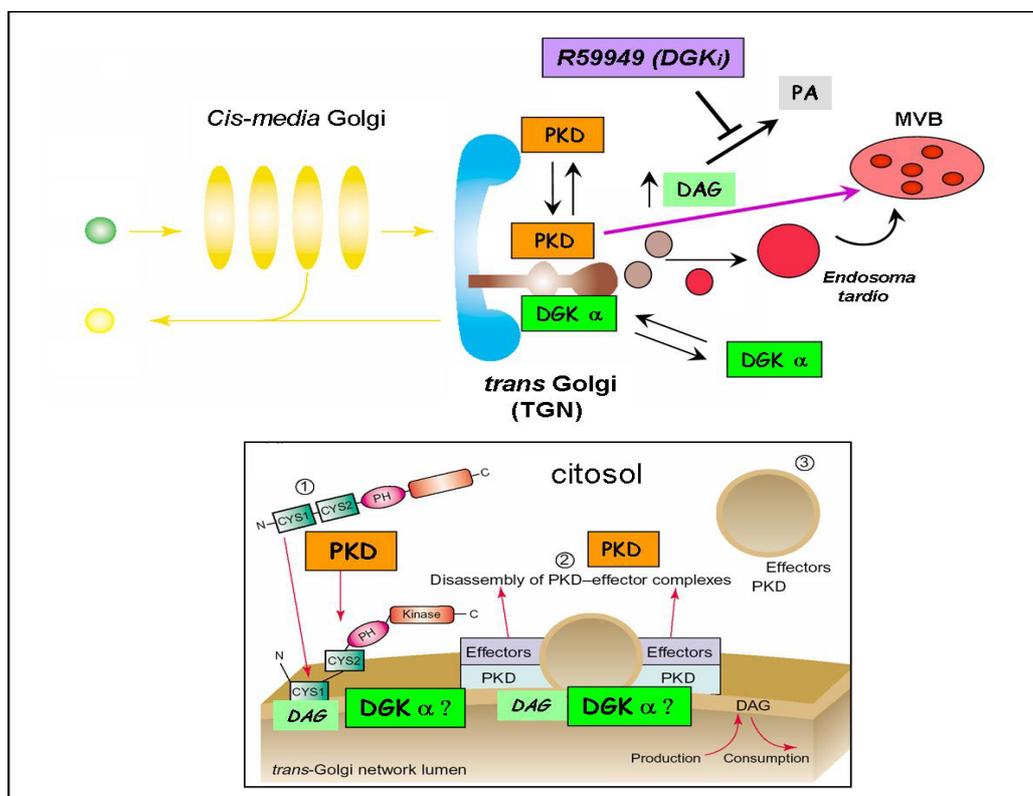
Se ha observado, además, que la estimulación de receptor de antígeno (TCR) en linfocitos T (JHM1-2.2 y linfoblastos T), induce la síntesis *de novo* de FasL, la formación de vesículas a nivel del TGN y finalmente la formación de cuerpos multivesiculares (MVBs) donde van a ser almacenados los exosomas con mFasL. Durante este proceso, la DGK α aumenta sus niveles en el TGN y en estructuras subcelulares CD63⁺, lo que nos sugirió que la DGK α podría estar regulando la secreción de exosomas que contienen FasL a nivel de la formación de las vesículas emergentes del Golgi. Por lo tanto la DGK α podría ser un posible regulador negativo de los niveles de DAG en el TGN, que actuaría inhibiendo la generación de vesículas emergentes del TGN, y la posterior formación de los cuerpos multivesiculares.

5.7 DAG, DGK α y la proteína quinasa D (PKD) en el TGN.

La proteína quinasa D (PKD) proporciona una base molecular mediante la cual el DAG y la DGK α podrían regular la formación de vesículas. La interacción del DAG con el dominio C1a de la PKD induce el reclutamiento de la PKD al TGN. En esta localización, la PKD está implicada en la formación de vesículas emergentes a partir del TGN [Baron et al., 2002], proceso de formación que depende de la actividad de la PKD [Liljedahl et al., 2001; Van Lint et al., 2002], aunque no está claro como la PKD regula dicho proceso, ni los efectores corriente abajo de la PKD. La reducción en los niveles de DAG inhibe el reclutamiento de la PKD al TGN, bloqueándose el proceso de formación de vesículas y el transporte de proteínas desde el

TGN a la superficie celular [Liljedahl et al., 2001; Baron et al., 2002]. En este sentido la DGK α es un posible candidato a la hora de modular el efecto del DAG/PKD durante la formación de vesículas a partir del TGN (ver esquema). En este trabajo se ha demostrado como en células sin estimular la DGK α se encuentra asociada intracelularmente a estructuras perinucleares/TGN donde también se localiza la PKD. La estimulación con CCh induce una translocación de la DGK α a estas estructuras, observándose también translocación de la PKD a la región próxima donde tiene lugar la formación de vesículas secretoras. El aumento en los niveles de DAG mediante la inhibición farmacológica de la DGK α tuvo como consecuencia una translocación mayor de la PKD a estas regiones.

Durante el proceso de formación de MVBs observado tras estimulación de receptor, el marcaje con el marcador de MVBs CD63 y con el marcador de exosomas LBPA mostró una gran acumulación intracelular de estructuras vesiculares CD63⁺ y LBPA⁺ en presencia del inhibidor de DGKs R59949. El análisis de la distribución del TGN mediante marcaje con TGN38 y TGN46 mostró una localización perinuclear del TGN tanto en células JHM1-2.2 como en células Hela. En presencia de R59949, estos marcadores mostraron un marcaje más pronunciado y extendido, indicando un cambio morfológico en el TGN, probablemente debido a una mayor producción de vesículas desde el TGN como consecuencia del tratamiento con el inhibidor de DGKs.



Implicación de la PKD y de la DGK α durante el proceso de formación de vesículas que tiene lugar a nivel del TGN (esquema modificado de Liljedahl et al., 2001)

Todos estos resultados sugieren que el tratamiento con R59949 induce una mayor translocación de PKD al TGN, y como consecuencia, una mayor producción de vesículas desde el TGN, lo que resulta en la alteración de la dinámica de formación de vesículas que darán lugar a endosomas tardíos/MVBs. El efecto del R59949 aumentando la localización de la PKD, confirmaría la implicación de los niveles de DAG regulados por la DGK α en la translocación de la PKD al TGN en células JHM1-2.2 y, por tanto la posible implicación del DAG y la DGK α durante el proceso de formación de vesículas en el TGN llevada a cabo por la PKD. En este sentido se precisarían más experimentos para establecer la PKD como un efector corriente abajo de la DGK α .

5.8 DGK α y formación de cuerpos multivesiculares (MVBs).

Diversas proteínas de membrana, quinasas de lípidos y también algunos lípidos específicos son reclutados y dirigidos de forma selectiva a la membrana de los endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares, donde dirigen o están implicados en el proceso de vesicularización interna que sufre la membrana del endosoma tardío para dar lugar al cuerpo multivesicular propiamente dicho [Denzer et al., 2000].

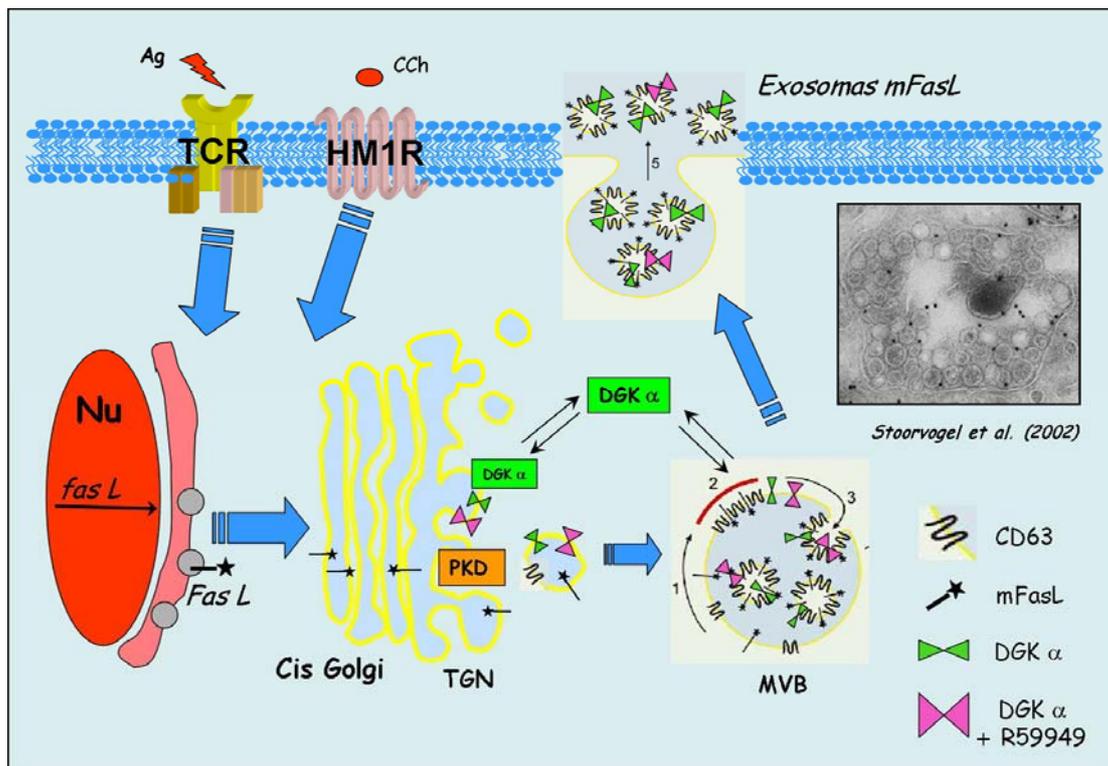
El fraccionamiento subcelular realizado en células JHM1-2.2 y las imágenes de microscopía confocal han revelado que una fracción de la DGK α se encuentra localizada en estructuras CD63⁺/lamp-1⁺ en células sin estimular. La formación de vesículas y cuerpos multivesiculares inducida tras estimulación con CCh aumentó la presencia de la DGK α en estas estructuras. Estos resultados indican que la DGK α podría experimentar translocación a la membrana del TGN y/o las vesículas emergentes del TGN, a la membrana de los endosomas tardíos derivados de estas vesículas, así como a la membrana de los cuerpos multivesiculares (MVBs). En este sentido la localización y actividad de la DGK α en estas estructuras intracelulares constituiría la base molecular que subyace a su actividad en la generación, transformación y/o modificación de estas estructuras vesiculares

La pérdida de actividad enzimática de la DGK α llevada a cabo por el inhibidor R59949 evita la disociación de la enzima de la membrana plasmática [Sanjuán et al., 2001], lo que sugiere que la generación de PA por parte de la DGK α juega un papel significativo en la redistribución celular de esta enzima, al regular su disociación de estructuras de membrana. Tomamos ventaja de este hecho para el seguimiento intracelular de la DGK α a lo largo del tráfico vesicular exocítico. Una vez la DGK α ha translocado a la región perinuclear/TGN, donde parece regular la formación de vesículas emergentes mediada por la PKD, el tratamiento con R59949 tiene como efecto que la DGK α quedase retenida en estas vesículas y transportara asociada a éstas a lo largo del transporte vesicular. El efecto del R59949 sobre la localización de la DGK α tras estimulación con CCh ha revelado que la DGK α se acumula en vesículas

emergentes de la región perinuclear/TGN, co-localizando con el marcador CD63. También se ha observado co-localización de DGK α con estructuras vesiculares CD63⁺ que se encuentran distribuidas en la zona perinuclear/TGN y a lo largo del citoplasma.

Por otro lado, y de manera no excluyente a la anterior hipótesis, la DGK α podría estar implicada en la generación y formación de cuerpos multivesiculares (MVBs). La translocación de la DGK α a la membrana limitante de estas estructuras en presencia de R59949 resultaría en su retención en la membrana del MVB. Tanto en el citosol como en zonas cercanas a la membrana plasmática se observó co-localización de DGK α con cuerpos multivesiculares. El efecto del R59949 evitando la disociación de la DGK α de la membrana del MVB daría lugar a su internalización durante el proceso de vesicularización interna que da lugar a la formación de microvesículas o exosomas dentro del MVB. En diversas zonas del citoplasma, y en especial en las proximidades de la membrana plasmática se detectó co-localización de DGK α en el interior de cuerpos multivesiculares CD63⁺. Si la DGK α transloca a la membrana del cuerpo multivesicular (MVB) y está implicada en el proceso de formación de exosomas que tiene lugar en el interior del MVB, debería estar presente y ser detectada en los exosomas secretados al exterior celular tras la inducción de su secreción. El análisis mediante WB de la presencia de DGK α en los exosomas secretados al medio extracelular mostró que tanto la DGK α endógena, como la construcción GFP-DGK α expresada en células JHM1-2.2, se encuentran presentes en los exosomas secretados tras la estimulación de células JHM1-2.2 y de cultivos primarios de linfoblastos T. El incremento relativo en los niveles de DGK α presentes en los exosomas secretados en presencia del inhibidor R59949, fue mucho mayor que el incremento relativo observado en la cantidad de exosomas secretados (CD63, FasL), lo que podría sugerir que, el R59949 evitando la disociación de la DGK α asociada a la membrana del cuerpo multivesicular durante el proceso de formación de los exosomas, quedaría retenida en la membrana de los exosomas que se están formando.

La presencia de la DGK α en los exosomas secretados, y el hecho de que el inhibidor R59949 incrementa los niveles de DGK α en estos exosomas podría tener dos explicaciones. En primer lugar, tras la estimulación de receptor en presencia de R59949 la DGK α transloca desde el citosol a las membranas del TGN implicadas en la formación de vesículas emergentes, y como se ha comentado anteriormente quedaría retenida en estas membranas durante los siguientes pasos de la dinámica del tráfico vesicular, de modo que también se encontraría localizada en la membrana del MVB y posteriormente en las membranas internas del MVB que van a dar lugar a los exosomas. La segunda explicación posible, la cual no excluye a la primera, implicaría la translocación de la DGK α desde el citosol directamente a la membrana del MVB, donde podría estar regulando de forma negativa los procesos de invaginación interna de la membrana del MVB y/o los procesos de fisión que van a dar lugar a la formación de los exosomas.



Los resultados presentados apoyan la función de la diacilglicerol quinasa alfa (DGK α) en la regulación del tráfico de vesículas secretoras, y en la posterior secreción al medio extracelular de exosomas/microvesículas con FasL en linfocitos T. Esta regulación se ejercería a nivel de la formación de vesículas secretoras mediada por la PKD en la parte *trans* del aparato de Golgi y/o durante la generación y formación de cuerpos multivesiculares.

En el presente trabajo se han estudiado algunos de los mecanismos que tienen lugar durante los procesos de activación e inducción de muerte celular inducida por activación tras estimulación de receptor de antígeno en linfocitos T. Mientras que la localización de la Diacilglicerol quinasa alfa (DGK α) en la membrana plasmática está implicada en la atenuación de las respuestas de activación mediadas por el DAG tras estimulación de receptor, la localización de esta enzima en otras estructuras intracelulares, como el TGN/MVBs, está implicada en la regulación de un proceso biológico bien diferente, como es la secreción al medio extracelular de exosomas con potencial citotóxico. No se conocen en detalle los mecanismos y efectores intracelulares que regulan la dinámica del tráfico vesicular, la formación de endosomas tardíos y los cuerpos multivesiculares, así como la secreción de exosomas/microvesículas. Los resultados obtenidos aportan nuevos datos sobre la implicación de la DGK α en los mecanismos intracelulares que participan en la formación y secreción de vesículas y exosomas, así como de su función inductora de muerte celular en el sistema inmune.

6. Conclusiones.

*Cuando todo el mundo piensa lo mismo,
nadie piensa demasiado...*

1. La actividad de la isoforma alfa de la diacilglicerol quinasa alfa (DGK α) regula la **muerte celular inducida por activación** (AICD) mediada por estimulación de receptor en linfocitos T: la expresión de la DGK α inhibe la muerte celular mediada por el sistema Fas/FasL, mientras que la inhibición farmacológica de la DGK α potencia la muerte celular a través de este sistema.

2. La regulación de los niveles de DAG generados tras estimulación de receptor (y, por consiguiente, de la vía de señalización DAG/PKC/Ras/MAPK) mediante la expresión de DGK α o su inhibición farmacológica, así como mediante la expresión de construcciones constitutivamente activas o catalíticamente inactivas de DGK α no afecta el control transcripcional del gen de FasL, control transcripcional regulado por la vía Ras/MAP2K. Los niveles intracelulares basales de FasL, así como la síntesis *de novo* de FasL inducida tras estimulación de receptor, tampoco se vieron afectados por la modulación en la actividad de DGK α .

3. La regulación de la vía de señalización DAG/PKC/Ras/MAPK por parte de la DGK α , vía que está implicada en las respuestas de activación celular en el linfocito T, controla de forma negativa la transcripción del gen para el marcador de activación celular CD69 y la expresión en membrana plasmática de CD69. La expresión de construcciones constitutivamente activas o catalíticamente inactivas de DGK α , las cuales actuando a nivel de membrana plasmática están implicadas en la atenuación de las respuestas que dan lugar a la activación del linfocito T, no afectan la muerte celular inducida por activación mediada por FasL.

4. De estos resultados se puede inferir la existencia de un punto de divergencia entre las señales mediadas por la generación de DAG a nivel de membrana plasmática tras la estimulación de receptor, las cuales conllevan la transcripción de genes implicados en activación/proliferación y muerte celular por apoptosis, sugiriendo que la vía DAG/PKC/Ras/MAPK estaría implicada en la regulación de las señales de activación en el linfocito T, pero no en la vía de inducción de apoptosis a través de la regulación a nivel transcripcional o traduccional de FasL durante la AICD.

5. La estimulación del TCR en blastos T o del receptor HM1R en células JHM1-2.2 induce síntesis *de novo* de FasL, el cual es almacenado y localizado en el interior de cuerpos multivesiculares (MVBs). La fusión del MVB con la membrana plasmática induce la liberación al medio extracelular de exosomas contenidos en el interior del MVB. Estos exosomas secretados contienen FasL en su forma no procesada (**mFasL de 40 kDa**) y son capaces de inducir apoptosis paracrina mediada por la interacción Fas/FasL.

6. La expresión de la DGK α inhibe la secreción de exosomas con mFasL inducida tras la estimulación de receptor, inhibiendo la muerte celular paracrina mediada por estos exosomas. La inhibición farmacológica de la DGK α potencia la secreción de estos exosomas con mFasL citotóxico y aumenta la muerte celular por apoptosis mediada por éstos.

7. La DGK α se encuentra asociada a estructuras subcelulares TGN en linfocitos T. En esta localización la DGK α podría actuar como un regulador negativo de los niveles de DAG en el TGN, regulando de forma negativa la generación de vesículas emergentes del TGN y/o la posterior formación de cuerpos multivesiculares (MVBs).

8. La inhibición farmacológica de la DGK α induce una mayor translocación de la proteína quinasa D (PKD) al TGN, una mayor producción de vesículas desde el TGN, alteración de la dinámica de formación de vesículas/endosomas tardíos/MVBs y localización de DGK α en estructuras de tipo MVBs. Estos hechos sugieren la posible implicación del DAG y la DGK α durante el proceso de formación de vesículas llevada a cabo por la PKD en la parte *trans* del aparato de Golgi y/o durante la generación y formación de cuerpos multivesiculares.

7. Bibliografía.

Abraham RT, Karnitz LM, Secrist JP, Leibson PJ. (1992). Signal transduction through the T-cell antigen receptor. *Trends Biochem Sci.* Oct;17(10):434-8.

Abrahams, V. M., Straszewski, S. L., Kamsteeg, M., Hanczaruk, B., Schwartz, P. E., Rutherford, T. J., and Mor, G. (2003). Epithelial ovarian cancer cells secrete functional Fas ligand. *Cancer Res* 63, 5573-5581.

Abraham, R. T., and Weiss, A. (2004). Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol* 4, 301-308.

Alberola-Ila, J., Forbush, K. A., Seger, R., Krebs, E. G., and Perlmutter, R. M. (1995). Selective requirement for MAP kinase activation in thymocyte differentiation. *Nature* 373, 620-623.

Alberola-Ila, J., Hogquist, K. A., Swan, K. A., Bevan, M. J., and Perlmutter, R. M. (1996). Positive and negative selection invoke distinct signaling pathways. *J Exp Med* 184, 9-18.

Albert, M.L., Pearce, S. F., Francisco L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L. y Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphabeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 188, 1359.

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87, 171.

Ameisen, J.C. (1996). The origin of programmed cell death. *Science*, 272. 1278.

Ameisen JC. (2002). On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.* Apr;9(4):367-93.

Andreola, G., Rivoltini, L., Castelli, C., Huber, V., Perego, P., Deho, P., Squarcina, P., Accornero, P., Lozupone, F., Lugini, L., Stringaro, A., Molinari, A., Arancia, G., Gentile, M., Parmiani, G., and Fais, S. (2002). Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 195, 1303-1316.

Anel, A., Buferne, M., Boyer, C., Schmitt-Verhulst, A. M., and Golstein, P. (1994). T cell receptor-induced Fas ligand expression in cytotoxic T lymphocyte clones is blocked by protein tyrosine kinase inhibitors and cyclosporin A. *Eur.J.Immunol.* 24, 2469-2476.

Angelisova P, Hilgert I, and Horejsi V. (1994). Association of four antigens of the tetraspans family (CD37, CD53, TAPA-1, and R/C33) with MHC class II glycoproteins. *Immunogenetics* 39:249-256.

- Arvan P, Castle D. (1998).** Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem J.* Jun 15;332 (Pt 3):593-610.
- Ashkenazi, A (2002).** "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." *Nat Rev Cancer* 2(6): 420-30.
- Ashwell, J. D., Longo, D. L., and Bridges, S. H. (1987).** T-cell tumor elimination as result of T-cell receptor-mediated activation. *Science* 237, 61-64.
- Banting G, Ponnambalam S.(1997).** TGN38 and its orthologues: roles in post-TGN vesicle formation and maintenance of TGN morphology. *Biochim Biophys Acta.* Mar 1;1355(3):209-17.
- Baumann S, Krueger A, Kirchhoff S, Krammer PH.(2002).** Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr Mol Med.* May;2(3):257-72.
- Baumler CB, Bohler T, Herr I, Benner A, Krammer PH, Debatin KM. (1996).** Activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in T cells from human immunodeficiency virus type-1-infected children. *Blood.* Sep 1;88(5):1741-6.
- Baron, C. L., and Malhotra, V. (2002).** Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science* 295, 325-328.
- Bertrand R, Solary E, O'Connor P, Kohn KW, Pommier Y. (1994).** Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res.* 1994 Apr;211(2):314-21.
- Bevers EM, Wiedmer T, Comfurius P, Shattil SJ, Weiss HJ, Zwaal RF, Sims PJ. (1992).** Defective Ca(2+)-induced microvesiculation and deficient expression of procoagulant activity in erythrocytes from a patient with a bleeding disorder: a study of the red blood cells of Scott syndrome. *Blood.* Jan 15;79(2):380-8.
- 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.
- Blott, E. J., Bossi, G., Clark, R., Zvelebil, M., and Griffiths, G. M. (2001).** Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* 114, 2405-2416.
- Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. (1995).** A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem.* Apr 7;270(14):7795-8.

- Bonfoco E, Stuart PM, Brunner T, Lin T, Griffith TS, Gao Y, Nakajima H, Henkart PA, Ferguson TA, Green DR. (1998).** Inducible nonlymphoid expression of Fas ligand is responsible for superantigen-induced peripheral deletion of T cells. *Immunity*. Nov;9(5):711-20.
- Bossi, G., and Griffiths, G. M. (1999).** Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med* 5, 90-96.
- Bosque A, Pardo J, Martinez-Lorenzo MJ, Iturralde M, Marzo I, Pineiro A, Alava MA, Naval J, Anel A. (2005).** Down-regulation of normal human T cell blast activation: roles of APO2L/TRAIL, FasL, and c-FLIP, Bim, or Bcl-x isoform expression. *J Leukoc Biol*. Apr;77(4):568-78. Epub 2005 Jan 14.
- Brown, J., Jardetzky, T., Saper, M.A., Samraoui, B. Bjorkman, P.J. and Wiley, D.C. (1988).** A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature*, 332, 845.
- Brunner T, Kasibhatla S, Pinkoski MJ, Frutschi C, Yoo NJ, Echeverri F, Mahboubi A., Green DR. (2000).** Expression of Fas ligand in activated T cells is regulated by c-Myc. *J Biol Chem*. Mar 31;275(13):9767-72.
- Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferez C, Franklin S, Ghayur T, Li P, et al. (1995).** Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*. 1995 Sep 29;269(5232):1885-8.
- Cantrell, D. (1996).** T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 14, 259-274.
- Cebrian M, Miguel Redondo J, Lopez-Rivas A, Rodriguez-Tarduchy G, De Landazuri MO, Sanchez-Madrid F. (1989).** Expression and function of AIM, an activation inducer molecule of human lymphocytes, is dependent on the activation of protein kinase C. *Eur J Immunol*. May;19(5):809-15.
- Clark, R., and Griffiths, G. M. (2003)** Lytic granules, secretory lysosomes and disease. *Curr Opin Immunol* 15, 516-521.
- Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T., and Terhorst, C. (1988).** The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 629-662.
- Chen, J.J., Y. Sun, and G.J. Nabel. (1998).** Regulation of the proinflammatory effects of Fas ligand (CD95L). *Science*. 282:1714–1717.

- Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. (1997).** Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*. Dec 12;278(5345):1966-8.
- Chien YH, Jores R, Crowley MP. (1996).** Recognition by gamma/delta T cells. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:511-32.
- Cohen PL, Eisenberg RA. (1991).** Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:243-69.
- Debatin KM, Fahrig-Faissner A, Enenkel-Stoodt S, Kreuz W, Benner A, Krammer PH. (1994).** High expression of APO-1 (CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood*. May 15;83(10):3101-3.
- De Maria R, Testi R. (1998).** Fas-FasL interactions: a common pathogenetic mechanism in organ-specific autoimmunity. *Immunol Today*. Mar;19(3):121-5.
- 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.
- Desai, D. M., Newton, M. E., Kadlecsek, T., and Weiss, A. (1990).** Stimulation of the phosphatidylinositol pathway can induce T cell activation. *Nature* 348, 66-69.
- Dhein, J., H., W., Baumler, C., Debatin, K.-M., and Krammer, P. (1995).** Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD 95). *Nature* 373, 438-441.
- Ebinu, J. O., Stang, S. L., Teixeira, C., Bottorff, D. A., Hooton, J., Blumberg, P. M., Barry, M., Bleakley, R. C., Ostergaard, H. L., and Stone, J. C. (2000).** RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras. *Blood* 95, 3199-3203.
- Ekert PG, Silke J, Vaux DL. (1999).** Caspase inhibitors. *Cell Death Differ*. 1999 Nov;6(11):1081-6.
- Ellis, H.M. and Hortvitz, H.R. (1986).** Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. Elegans*. *Cell*, 44, 817.
- Ellis, R. E., Yuan, J., and Horvitz, H. R. (1991).** Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 663-698.
- Earnshaw, WC, Martins, LM and Kaufmann, SH (1999).** "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." *Annu Rev Biochem* 68: 383-424.

- Ebinu, J. O., Bottorff, D. A., Chan, E. Y., Stang, S. L., Dunn, R. J., and Stone, J. C. (1998).** RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280, 1082-1086.
- Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., and Geuze, H. J. (1998).** Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 273, 20121-20127.
- Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. (1999).** Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun.* Dec 29;266(3):699-717.
- Faris, M., Kokot, N., Latinis, K., Kasibhatla, S., Green, D. R., Koretzky, L., and Nel, A. (1998).** The c-Jun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in Jurkat cells by up-regulating Fas ligand expression. *J. Immunol.* 160, 134-144.
- Feldmann M. (2001).** Pathogenesis of arthritis: recent research progress. *Nat Immunol.* Sep;2(9):771-3.
- Feske, S., Giltzane, J., Dolmetsch, R., Staudt, L. M., and Rao, A. (2001).** Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2, 316-324.
- Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E., and Weiss, A. (1998).** LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 9, 617-626.
- Finkel, T. H., Marrack, P., Kappler, J. W., Kubo, R. T., and Cambier, J. C. (1989).** Alpha beta T cell receptor and CD3 transduce different signals in immature T cells. Implications for selection and tolerance. *J Immunol* 142, 3006-3012
- Fisher, G. H., Rosenberg, F. J., Straus, S. E., Dale, J. K., Middleton, L. A., Lin, A. Y., Strober, W., Lenardo, M. J., and Puck, J. M. (1995).** Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81, 935-946.
- Flores I., Jones, D.R., Ciprés, A., Diaz-Flores, E., Sanjuan M.A. and Mérida I. (1999).** Diacylglycerol kinase inhibition prevents IL-2-induced G1 to S transition through a phosphatidylinositol-3 kinase-independent mechanism. *J.Immunol.* 163:708-714.
- Friesen, C., Herr, I., Krammer, P. H., and Debatin, K.-M. (1996).** Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nature Medicine* 2, 574-577.

- Gay D, Maddon P, Sekaly R, Talle MA, Godfrey M, Long E, Goldstein G, Chess L, Axel R, Kappler J, et al. (1987).** Functional interaction between human T-cell protein CD4 and the major histocompatibility complex HLA-DR antigen. *Nature*. Aug 13-19;328(6131):626-9.
- Glücksman, A. (1951).** Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* **26**, 59-86.
- Golstein, P. (1998).** Cell death in us and others [editorial]. *Science* 281, 1283.
- Golstein P. (2000).** FasL binds preassembled Fas. *Science* 288:2328.
- Gong, Q., Cheng, A. M., Akk, A. M., Alberola-Ila, J., Gong, G., Pawson, T., and Chan, A. C. (2001).** Disruption of T cell signaling networks and development by Grb2 haploid insufficiency. *Nat Immunol* 2, 29-36.
- Green, D. R., Droin, N., and Pinkoski, M. (2003).** Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 193, 70-81.
- Griffith, T. S., Brunner, T., Fletcher, S. M., Green, D. R., and Ferguson, T. A. (1995).** Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270, 1189-1192.
- Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. (1999).** Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fasdeath. *J Biol Chem* Jan 8;274(2):1156-63.
- Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. (1996).** Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*. Nov 22;274(5291):1363-6.
- Haks MC, Oosterwegel MA, Blom B, Spits HM, Kruisbeek AM. (1999).** Cell-fate decisions in early T cell development: regulation by cytokine receptors and the pre-TCR. *Semin Immunol*. Feb;11(1):23-37.
- Hawari FI, Rouhani FN, Cui X, Yu ZX, Buckley C, Kaler M, Levine SJ. (2004).** Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: a mechanism for generation of soluble cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 3;101(5):1297-302. Epub Jan 26.
- Hengartner MO, Horvitz HR. (1994).** Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev*. Aug;4(4):581-6.

Henkart PA, Millard PJ, Reynolds CW, Henkart MP. (1984). Cytolytic activity of purified cytoplasmic granules from cytotoxic rat large granular lymphocyte tumors. *J Exp Med.* 1984 Jul 1;160(1):75-93.

Hickinson DM, Lucocq JM, Towler MC, Clough S, James J, James SR, Downes CP, Ponnambalam S. (1997). Association of a phosphatidylinositol-specific 3-kinase with a human trans-Golgi network resident protein. *Curr Biol.* Dec 1;7(12):987-90.

Hoffman, WH, Biade, S, Zilfou, JT, Chen, J and Murphy, M (2002). "Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53." *J Biol Chem* 277(5): 3247-57.

Hofmann K, Bucher P, Tschopp J. (1997). The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci.* 1997 May;22(5):155-6.

Hohlbaum, A. H., Moe S., and Marshak-Rothstein A.. (2000). Opposing effects of transmembrane and soluble Fas-ligand on inflammation and tumor cell survival. *J. Exp. Med.* 191:1209-14.

Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P, Zaccheddu A, Colone M, Arancia G, Gentile M, Seregni E, Valenti R, Ballabio G, Belli F, Leo E, Parmiani G, Rivoltini L. (2005). Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology.* Jun;128(7):1796-804.

Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, Yoshie O. (1995). Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82. *J Immunol* 155:1229-1239.

Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* Jul 10;388(6638):123, 125-6.

Izquierdo M. and Cantrell D.A. (1992). " T-cell activation". *Trends in Cell Biology* 2, 268-271.

Izquierdo M., Leever S.J, Marshall C. J. and Cantrell D. (1993). "p21ras couples the T cell antigen receptor to extracellular signal regulated kinase 2 in T lymphocytes". *J. Exp. Med.* 178, 1199-1208.

Izquierdo, M. Woodrow. M., Cantrell D. A. (1995). Regulation and function of p21ras in T lymphocytes. *Cancer Surveys* 22, 75-83.

Izquierdo, M., Ruiz-Ruiz, M. C., and López-Rivas, A. (1996). Stimulation of the PtdIns turnover is a key event for Fas-dependent, activation-induced apoptosis in human T lymphocytes. *J. Immunol.* 157, 21-28.

Itoh N, Nagata S. (1993). A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem.* May 25;268(15):10932-7.

Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-354.

Jambrina, E., Alonso, R., Alcalde, M., Rodríguez, M. C., Serrano, A., Martínez-A., C., García-Sancho, J., and Izquierdo, M. (2003). Calcium influx through receptor-operated channel induces mitochondria-triggered paraptotic cell death. *J. Biol.Chem.* 278, 14134-14145.

Jameson SC, Bevan MJ. (1998). T-cell selection. *Curr Opin Immunol.* Apr;10(2):214-9. *Curr Opin Immunol.* Apr;10(2):214-9.

Jiang Y, Sakane F, Kanoh H, Walsh JP. (2000). Selectivity of the diacylglycerol kinase inhibitor 3-[2-(4-[bis-(4-fluorophenyl)methylene]-1-piperidinyl)ethyl]-2, 3-dihydro-2-thioxo-4(1H)quinazolinone (R59949) among diacylglycerol kinase subtypes. *Biochem Pharmacol.* Apr 1;59(7):763-72.

Jodo, S., Xiao, S., Hohlbaum, A., Strehlow, D., Marshak-Rothstein, A., and Ju, S. T. (2001). Apoptosis-inducing membrane vesicles. A novel agent with unique properties. *J Biol Chem* 276, 39938-39944. Epub 32001 Aug 39923.

Jones, L. A., Chin, L. T., Longo, D. L., and Kruisbeek, A. M. (1990). Peripheral clonal elimination of functional T cells. *Science* 250, 1726-1729

Jones, D. R., Sanjuan, M. A., Stone, J. C., and Merida, I. (2002). Expression of a catalytically inactive form of diacylglycerol kinase alpha induces sustained signaling through RasGRP. *FASEB J* 16, 595-597.

Jordan, M. S., Singer, A. L., Koretzky, G. A., and Philips, M. R. (2003). Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat Immunol* 4, 110-116.

Kabelitz, D., Pohl, T., and Pechhold, K. (1993). Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunol. Today* 14, 338-339

- Kane, L. P., Lin, J., and Weiss, A. (2000).** Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr Opin Immunol* 12, 242-249.
- Kanoh H, Kondoh H, Ono T. (1983).** Diacylglycerol kinase from pig brain. Purification and phospholipids dependencies. *J Biol Chem.* Feb 10;258(3):1767-74.
- Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Mahboubi, A., and Green, D. R. (1998).** DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell* 1, 543-551.
- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottavino, Y., Davidson, N.E. & Poirier, G.G. (1993).** Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **53**, 3976-3985.
- Kaufmann, SH and Earnshaw, WC (2000).** "Induction of apoptosis by cancer chemotherapy." *Exp Cell Res* 256(1): 42-9.
- Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K., and Yagita, H. (1995).** Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med* 182, 1777-1783.
- Kearns, B. G., Alb, J. G., Jr., and Bankaitis, V. (1998).** Phosphatidylinositol transfer proteins: the long and winding road to physiological function. *Trends Cell Biol* 8, 276-282.
- Kearns, B. G., McGee, T. P., Mayinger, P., Gedvilaite, A., Phillips, S. E., Kagiwada, S., and Bankaitis, V. A. (1997).** Essential role for diacylglycerol in protein transport from the yeast Golgi complex. *Nature* 387, 101-105.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972).** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26,239.
- Kim JW, Wieckowski E, Taylor DD, Reichert TE, Watkins S, Whiteside TL. (2005).** Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res.* Feb 1;11(3):1010-20.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. (1995).** Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* Nov 15;14(22):5579-88.
- 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.

- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. (1997).** Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*. Jan;18(1):44-51.
- Krueger A, Fas SC, Baumann S, Krammer PH.(2003).** The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev*. Jun;193:58-69.
- Latinis, K. M., Norian, L. A., Eliason, S. L., and Koretzky, G. A. (1997).** Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *J Biol Chem* 272, 31427-31434.
- Lebrand, C., Corti, M., Goodson, H., Cosson, P., Cavalli, V., Mayran, N., Faure, J., and Gruenberg, J. (2002).** Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *Embo J* 21, 1289-1300.
- Leist, M., and Jaattela, M. (2001).** Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-598.
- Lenardo MJ. (1997).** The molecular regulation of lymphocyte apoptosis. *Semin Immunol*. Feb;9(1):1-5.
- Lenardo, M., Chan, K.M. Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J. and Zheng, L. (1999).** Mature T lymphocyte apoptosis dynamic and unpredictable antigenic environment. *Ann Rev Immunol*. 17, 221-253.
- Letourneur, F., and Klausner, R. D. (1992).** Activation of T cells by a tyrosine kinase activation domain in the Cytoplasmic tail of CD3 epsilon. *Science* 255, 79-82.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997).** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Li-Weber M, Krammer PH. (2003).** Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Semin Immunol*. 2003 Jun;15(3):145-57.
- Liljedahl, M., Maeda, Y., Colanzi, A., Ayala, I., Van Lint, J., and Malhotra, V. (2001).** Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network. *Cell* 104, 409-420.
- Litvak, V., Dahan, N., Ramachandran, S., Sabanay, H., and Lev, S. (2005).** Maintenance of the diacylglycerol level in the Golgi apparatus by the Nir2 protein is critical for Golgi secretory function. *Nat Cell Biol* 7, 225-234. Epub 2005 Feb 2020.
- Lockshin, RA and Williams, CM (1964).** "Programmed cell death. II Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms." *J Insect Physiol* 10: 643-649.

Lockshin, R.A., Osborne, B. & Zakeri, Z. (2000). Cell death in the third millenium. *Cell Death Diff.* 7, 2-7.

Lockshin, RA and Zakeri, Z (2001). "Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(7): 545-50.

Lopez-Cabrera, M., Munoz, E., Blazquez, M. V., Ursa, M. A., Santis, A. G., and Sanchez-Madrid, F. (1995). Transcriptional regulation of the gene encoding the human C-type lectin leukocyte receptor AIM/CD69 and functional characterization of its tumor necrosis factor-alpha-responsive elements. *J Biol Chem* 270, 21545-21551.

Luo, X, Budihardjo, I, Zou, H, Slaughter, C and Wang, X (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* 94(4): 481-90.

Mariani SM, Matiba B, Baumler C, Krammer PH. (1995). Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur J Immunol.* 1995 Aug;25(8):2303-7.

Martin, S.J., Reutelingsperger, C. P. M., McGahon, A. J., Rader, A.J. van Schie, R. C. A.A., LaFace, D.M. and Green, D.R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of initiating stimulus: inhibition by overexpresion of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.*, 182, 1545.

Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ. (1998). Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem.* Feb 20;273(8):4345-9.

Martin, T.F.J. (2001). PI(4,5)P₂ regulation of surface membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13:493.

Martinez-Lorenzo, M. J., Alava, M. A., Anel, A., Pineiro, A., and Naval, J. (1996). Release of preformed Fas ligand in soluble form is the major factor for activation-induced death of Jurkat T cells. *Immunology* 89, 511-517.

Martinez-Lorenzo, M. J., Anel, A., Gamen, S., Monle n, I., Lasierra, P., Larrad, L., Pineiro, A., Alava, M. A., and Naval, J. (1999). Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol* 163, 1274-1281.

Martinez-Lorenzo, M. J., Anel, A., Alava, M. A., Pineiro, A., Naval, J., Lasierra, P., and Larrad, L. (2004). The human melanoma cell line MelJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack. *Exp Cell Res* 295, 315-329.

- Matsui K, Fine A, Zhu B, Marshak-Rothstein A, Ju ST. (1998).** Identification of two NF-kappa B sites in mouse CD95 ligand (Fas ligand) promoter: functional analysis in T cell hybridoma. *J Immunol.* Oct 1;161(7):3469-73.
- Matthews S, Iglesias T, Cantrell D, Rozenfurt E. (1999).** Dynamic re-distribution of protein kinase D (PKD) as revealed by a GFP-PKD fusion protein: dissociation from PKD activation. *FEBS Lett.* Sep 3;457(3):515-21.
- Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. (1997).** FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* May 15;16(10):2794-804.
- Medema JP, Borst J. (1999).** T cell signaling: a decision of life and death. *Hum Immunol.* May;60(5):403-11.
- Mittelstadt PR, Ashwell JD. (1999).** Role of Egr-2 in up-regulation of Fas ligand in normal T cells and aberrant double-negative lpr and gld T cells. *J Biol Chem.* Jan 29;274(5):3222-7.
- Miwa, K., M. Asano, R. Horai, Y. Iwakura, S. Nagata, and T. Suda. (1998).** Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat. Med.* 4:1287-1292. 28. Shimizu, M., A. Fontana, Y.
- Monleon, I., Martinez-Lorenzo, M. J., Monteagudo, L., Lasierra, P., Taules, M., Iturralde, M., Pineiro, A., Larrad, L., Alava, M. A., Naval, J., and Anel, A. (2001).** Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J Immunol* 167, 6736-6744.
- Nagata, S., and Golstein, P. (1995)** The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456.
- Nagata, S., and Suda, T. (1995).** Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunology Today* 16, 39-42.
- Nagata, S. (1997)** Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
- Nagata S. (1999).** Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet.* 1999;33:29-55.
- Naismith, JH and Sprang, SR (1998).** "Modularity in the TNF-receptor family." *Trends Biochem Sci* 23(2): 74-9.
- Norment, A. M., Salter, R. D., Parham, P., Engelhard, V. H., and Littman, D. R. (1988)** Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature* 336, 79-81

Nossal, G. J. (1994) Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76, 229-239

O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. (1996). The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med.* Sep 1;184(3):1075-82.

O'Connell J, Houston A, Bennett MW, O'Sullivan GC, Shanahan F. (2001). Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma. *Nat Med.* Mar;7(3):271-4.

Opferman JT, Ober BT, Ashton-Rickardt PG. (1999). Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science.* Mar 12;283(5408):1745-8.

Peng SL, Robert ME, Hayday AC, Craft J. (1996). A tumor-suppressor function for Fas (CD95) revealed in T cell-deficient mice. *J Exp Med.* 1996 Sep 1;184(3):1149-54.

Perez-Aciego P, Alarcon B, Arnaiz-Villena A, Terhorst C, Timon M, Segurado OG, Regueiro JR. (1991). Expression and function of a variant T cell receptor complex lacking CD3-gamma. *J Exp Med.* Aug 1;174(2):319-26.

Peter ME, Scaffidi C, Medema JP, Kischkel F, Krammer PH. (1999). The death receptors. *Results Probl Cell Differ.*;23:25-63.

Peters, P. J., Geuze, H. J., van der Donk, H. A., and Borst, J. (1990). A new model for lethal hit delivery by cytotoxic T lymphocytes. *Immunol Today* 11, 28-32.

Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J, Slot JW, Geuze HJ. (1991). Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med.* May 1;173(5):1099-109.

Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A. (1998). Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature.* Dec 17;396(6712):699-703.

Ponnambalam, S., Girotti, M., Yaspo, M. L., Owen, C. E., Perry, A. C., Suganuma, T., Nilsson, T., Fried, M., Banting, G., and Warren, G. (1996). Primate homologues of rat TGN38: primary structure, expression and functional implications. *J Cell Sci* 109, 675-685.

Rathmel, J.C. and Thompson, C.B. (1999). The central effectors of cell death in the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* 17, 781.

Rayter, S., Woodrow, M., Lucas, S. C., Cantrell, D., and Downward, J. (1992). p21ras mediates control of IL2 gene promoter function in T cell activation. *EMBO J.* 11, 4549-4556.

Restifo, N. P. (2000). Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nat Med* 6, 493-495.

Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I. A. G., Debatin, K. M., Fischer, A., and de Villartay, J. P. (1995). Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268, 1347-1349.

Robertson MJ, Manley TJ, Pichert G, Cameron C, Cochran KJ, Levine H, Ritz J. (1995). Functional consequences of APO-1/Fas (CD95) antigen expression by normal and neoplastic hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma*. 1995 Mar;17(1-2):51-61.

Robinson RA, Worfolk L, Tracy PB. (1992). Endotoxin enhances the expression of monocyte prothrombinase activity. *Blood*. Jan 15;79(2):406-16.

Roth, M. G. (1999). Lipid regulators of membrane traffic through the Golgi complex. *Trends Cell Biol* 9, 174-179.

Rubinstein E, Le Naour F, Lagaudriere-Gesbert C, Billard M, Conjeaud H, and Boucheix C. (1996). CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol* 26:2657-2665.

Rudel, T., & Bokoch, G.M. (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276, 1571-1574.

Russell, J. H., White, C. L., Loh, D. Y., and Meleedy-Rey, P. (1991). Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 88, 2151-2155.

Russell, J. H., Rush, B., Weaver, C., and Wang, R. (1993). Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen stimulated suicide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4409-4413.

Russell JH. (1995). Activation-induced death of mature T cells in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol*. 1995 Jun;7(3):382-8.

Sahuquillo, A. G., Roumier, A., Teixeira, E., Bragado, R., and Alarcon, B. (1998). T cell receptor (TCR) engagement in apoptosis-defective, but interleukin 2 (IL-2)-producing, T cells results in impaired ZAP70/CD3-zeta association. *J Exp Med* 187, 1179-1192.

Sakane F, Yamada K, Imai S, Kanoh H. (1991). Porcine 80-kDa diacylglycerol kinase is a calcium-binding and calcium/phospholipid-dependent enzyme and undergoes calcium-dependent translocation. *J Biol Chem*. Apr 15;266(11):7096-100.

Sakane, F., and Kanoh, H. (1997). Molecules in focus: diacylglycerol kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1139-1143.

Samejima K, Earnshaw WC. (1998). ICAD/DFF regulator of apoptotic nuclease is nuclear. *Exp Cell Res.* Sep 15;243(2):453-9.

Sanjuan, M. A., Jones, D. R., Izquierdo, M., and Merida, I. (2001). Role of diacylglycerol kinase alpha in the attenuation of receptor signaling. *J Cell Biol* 153, 207-220.

Sanjuan, M. A., Pradet-Balade, B., Jones, D. R., Martinez, A. C., Stone, J. C., Garcia-Sanz, J. A., and Merida, I. (2003). T Cell Activation In Vivo Targets Diacylglycerol Kinase alpha to the Membrane: A Novel Mechanism for Ras Attenuation. *J Immunol* 170, 2877-2883.

Sauter, B., Albert, M. L., Francsico, L., Larson, M., Somersan, S. and Bhardwaj, N. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 191, 423.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687.

Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V., Witke, W., Huttner, W. B., and Soling, H. D. (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* 401, 133-141.

Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J. (1998). Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med.* Apr 20;187(8):1205-13.

Sebzda E, Mariathasan S, Ohteki T, Jones R, Bachmann MF, Ohashi PS. (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol.* 17:829-74.

Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science.* Jun 30;288(5475):2354-7.

Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. (2000). The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol.* Dec;1(6):469-74.

Sperandio, S., de Belle, I., and Bredesen, D. E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14376-14381.

Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*. Jun;12(6):599-609.

Sprong, H., Degroote, S., Claessens, T., van Drunen, J., Oorschot, V., Westerink, B. H., Hirabayashi, Y., Klumperman, J., van der Sluijs, P., and van Meer, G. (2001). Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex. *J Cell Biol* 15, 369-380.

Sprong, H., van der Sluijs, P., and van Meer, G. (2001). How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 504-513.

Steinmann, R. M., Tueley, S., Mellman, I. and Inaba, K. (2000) The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.*, 191, 411.

Stennicke HR, Salvesen GS. (1998). Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta*. Sep 8;1387(1-2):17-31

Stinchcombe, J. C., and Griffiths, G. M. (1999). Regulated secretion from hemopoietic cells. *J Cell Biol* 147, 1-6.

Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. (2002). The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*. May;3(5):321-30.

Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. (1996). Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med*. Dec;2(12):1361-6.

Stuart PM, Griffith TS, Usui N, Pepose J, Yu X, Ferguson TA. (1997). CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J Clin Invest*. Feb 1;99(3):396-402.

Strasser, A., Harris, A. W., Huang, D. C., Krammer, P. H., and Cory, S. (1995). Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *Embo J* 14, 6136-6147.

Strater J, Walczak H, Hasel C, Melzner I, Leithauser F, Moller P. (2001). CD95 ligand (CD95L) immunohistochemistry: a critical study on 12 antibodies. *Cell Death Differ*. 2001 Mar;8(3):273-278.

Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. (1997). Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med.* Dec 15;186(12):2045-50.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. (1995). Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J.* Mar 15;14(6):1129-35.

Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. (1998). Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med.* Jan;4(1):31-6.

Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell.* Sep 10;74(5):845-53.

Teixeiro, E., García-Sahuquillo, A., Alarcón, B., and Bragado, R. (1999). Apoptosis-resistant T cells have a defect in NF- κ B-mediated induction of fas ligand transcription. *Eur. J. Immunol.* 29, 745-754

Teixeiro, E., Fuentes, P., Galocha, B., Alarcon, B., and Bragado, R. (2002). T cell receptor-mediated signal transduction controlled by the beta chain transmembrane domain: apoptosis-deficient cells display unbalanced mitogen-activated protein kinases activities upon T cell receptor engagement. *J Biol Chem* 277, 3993-4002.

Thastrup, O., Cullen, P. J., Drobak, B. K., Hanley, M. R., and Dawson, A. P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular calcium stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum calcium-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2466-2470.

They, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2, 569-579.

Thome M, Germain V, DiSanto JP, Acuto O. (1996). The p56lck SH2 domain mediates recruitment of CD8/p56lck to the activated T cell receptor/CD3/zeta complex. *Eur J Immunol.* 1996 Sep;26(9):2093-2100.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Weidner JR, Aunins J, et al. (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature.* Apr 30;356(6372):768-74.

Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312.

Topham, M. K., and Prescott, S. M. (1999). Mammalian diacylglycerol kinases, a family of lipid kinases with signaling functions. *J Biol Chem* 274, 11447-11450.

Topham, M. K., and Prescott, S. M. (2001). Diacylglycerol kinase zeta regulates Ras activation by a novel mechanism. *J Cell Biol* 152, 1135-1143.

van den Brink MR, Kapeller R, Pratt JC, Chang JH, Burakoff SJ. (1999). The extracellular signal-regulated kinase pathway is required for activation-induced cell death of T cells. *J Biol Chem.* Apr 16;274(16):11178-85.

Van Lint, J., Rykx, A., Maeda, Y., Vantus, T., Sturany, S., Malhotra, V., Vandenhede, J. R., and Seufferlein, T. (2002). Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends Cell Biol* 12, 193-200.

Vassalli P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol.*;10:411-52.

Vaux, D. L., Haecker, G. And Strasser, A. (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*, 76,777.

Vignaux, F. and Golstein, P. (1994). Fas-based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngeneic activated lymphocytes: a regulatory pathway? *Eur. J. Immunol.*, 24, 923.

Vignaux, F., Vivier, E., Malissen, B., Depraetere, V., Nagata, S., and Golstein, P. (1995). TCR/CD3 coupling to Fas-based cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 181, 781-786.

Villalba M, Kasibhatla S, Genestier L, Mahboubi A, Green DR, Altman A. (1999). Protein kinase theta cooperates with calcineurin to induce Fas ligand expression during activation-induced T cell death. *J Immunol.* Dec 1;163(11):5813-9.

Walker, P. R., Saas, P., and Dietrich, P. Y. (1997). Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J Immunol* 158, 4521-4524.

Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, et al. (1994). Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell.* Jul 29;78(2):343-52.

Wang, XW (1999). "Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis." *Anticancer Res* 19(6A): 4759-71.

- Wang, R., Dworak, L. J., and Lacy, M. J. (2001).** A panel immunoblot using co-incubated monoclonal antibodies for identification of melanoma cells. *J Immunol Methods* 249, 167-183.
- Watanabe-Fukunawa, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Nagata, S. (1992).** Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317.
- Weigert R, Silletta MG, Spano S, Turacchio G, Cericola C, Colanzi A, Senatore S, Mancini R, Polishchuk EV, Salmona M, Facchiano F, Burger KN, Mironov A, Luini A, Corda D. (1999).** CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid. *Nature*. Nov 25;402(6760):429-33.
- Weil, M., Jacobson, M.D., Coles, H.S.R., Raff, K.D. & Raff, M.C. (1996).** Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J. Cell Biol.* 133, 1053-1059.
- Weiss, A., Imboden, J., Shoback, D., and Stobo, J. (1984).** Role of T3 surface molecules in human T-cell activation: T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 4169-4173.
- Weiss, A. and Littman, D. R. (1994).** Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 76, 263-274.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, et al. (1995).** Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. Dec;3(6):673-82.
- Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, Slot JW, Geuze HJ, Stoorvogel W. (2003).** Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem*. Mar 28;278(13):10963-72. Epub 2003 Jan 7.
- Xue D, Horvitz HR. (1995).** Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature*. Sep 21;377(6546):248-51.
- Xu XN, Screaton GR, Gotch FM, Dong T, Tan R, Almond N, Walker B, Stebbings R, Kent K, Nagata S, Stott JE, McMichael AJ. (1997).** Evasion of cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses by nef-dependent induction of Fas ligand (CD95L) expression on simian immunodeficiency virus-infected cells. *J Exp Med*. Jul 7;186(1):7-16.
- Yamada K, Sakane F, Kanoh H. (1989).** Immunoquantitation of 80 kDa diacylglycerol kinase in pig and human lymphocytes and several other cells. *FEBS Lett*. Feb 27;244(2):402-6.

Yano Y, Kambayashi J, Shiba E, Sakon M, Oiki E, Fukuda K, Kawasaki T, Mori T. (1994). The role of protein phosphorylation and cytoskeletal reorganization in microparticle formation from the platelet plasma membrane. *Biochem J.* 1994 Apr 1;299 (Pt 1):303-8.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell.* Nov 19;75(4):641-52.

Zhang JH, Zhang Y, Herman B. (2003). Caspases, apoptosis and aging. *Ageing Res Rev.* Oct;2(4):357-66.

Zheng, L., Fisher, G., Miller, R. E., Peschon, J., Lynch, D. H., and Lenardo, M. J. (1995). Induction of apoptosis in mature T cells by tumor necrosis factor. *Nature* 377, 348-351.

Zhong, X. P., Hainey, E. A., Olenchock, B. A., Zhao, H., Topham, M. K., and Koretzky, G. A. (2002). Regulation of T cell receptor-induced activation of the Ras-ERK pathway by diacylglycerol kinase zeta. *J Biol Chem* 277, 31089-31098.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* Aug 8;90(3):405-13.