

Tesi doctoral presentada per En/Na

Idoia GIMFERRER MIGUEL

amb el títol

**"Estudio de las asociaciones moleculares
y la función del receptor linfocitario CD6"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

MEDICINA I CIRURGIA

Barcelona, 17 de desembre del 2004.

Facultat de Medicina
Departament de Biologia Cel.lular i
Anatomia Patològica



UNIVERSITAT DE BARCELONA



AGRADECIMIENTOS

Casi he perdido la cuenta de los años que llevo trabajando en este proyecto, y por fin mi tesis parece que tiene los días contados. No son pocos los que han compartido mis días entre pipetas, tubos y ensayos fallidos... Sería pues injusto no empezar agradeciéndoles haber estado allí, enseñándome casi todo.

En primer lugar quiero dar las gracias a mi director de tesis, el Dr Francisco Lozano, por creer en mi cuando sólo era una residente de 1^{er} año, por todos sus valiosos consejos y por saber contagiarme su entusiasmo durante todo este tiempo.

A una gran familia, la Super Familia de los Scavenger, empezando por los CD5, Javier, con el que tuve la suerte de coincidir por un corto periodo de tiempo, Pep, por su paciencia ante mis constantes preguntas, y Rafa, compañero dentro y fuera del laboratorio. A las CD6, Montse y Anna, con quienes comparto los teje manejes de mi molécula preferida. A SP α , M^a Rosa, de gran visión crítica, de la que he aprendido la importancia de los controles. A las S4D, Olga, que nos sorprendió con un nuevo miembro, por su humor punzante y por ser una amiga, y Sandra, mi compañera DIR. A las promotoras, Mònica, con quien compartí mis años de novata, y Virginia, nuestro miembro más reciente. A Belén, que a pesar de no ser un Scavenger, pertenece desde el primer día a esta Super Familia. Y a Lourdes, que fue una sufrida Scavenger, de que la que aprendí que se pueden hacer mil cosas a la vez.

También quiero agradecer al Dr Vives el haberme dado la oportunidad de realizar mi formación como especialista en el Sevei d'Immunologia del Hospital Clínic y ayudarme a conseguir mis objetivos.

A Fiorella, una buena amiga, por recibirme con los brazos abiertos, por esas noches locas. A Dani y Anna, a Eduard y Elena, con quienes he compartido bonitos momentos dentro y fuera del laboratorio.

A Ramón, y a Jordi Milà salvador de células moribundas, y a Xavi, por su escandaloso buen humor. A Guadalupe, coordinadora de los residentes, y a los nuevos "resis", Willy y Marta, que sé que luchan para sacar adelante la residencia. A Jaume Martorell, por permitirme hacer guardias durante la residencia y conseguir que siguiera después. A la genial Teresa, y a su grupo, Núria, Harold y Rodrigo.

A Montse Plana que me enseñó a "proliferar" y a Isabel por preocuparse cuando las cosas no iban bien. A Pepa, por no tener nunca un No y encontrar los reactivos más raros. A Mercé por conseguir que las cosas funcionen.

A Jordi Yagüe, Juancho, Odette, Carles, por echarme un cable siempre que lo he necesitado. A todos mis compañeros de guardias, Susana, Fina, Juanjo, Elias, Maite, Loli, Iuse, Pilar, Dolors, por esas

largas noches. A todas las de la 1-7 que me acogieron como una más. A la Juanita. A todos los que me han acompañado desde que entre, a todos aquellos que han estado a mi lado con una sonrisa o una simple broma para alejar los malos días... ¡Muchas Gracias!.

Por último quiero dedicar este trabajo a mi familia, mi madre y mi padre, a quienes se lo debo todo; a mi hermana y a mi hermano, que me han apoyado siempre. Gracias por estar allí, por compartir mis alegrías en los buenos tiempos y ayudarme a superar los malos.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
I. Introducción.	5
1. Activación de los linfocitos T CD4⁺ naive	7
2. TCR	8
3. Sinapsis inmunitaria	11
3.1. Estructura	11
3.2. Unión TCR/MHC-péptido específico	12
3.3. Formación del señalosoma	14
3.4. Citoesqueleto de actina y microtúbulos	15
3.5. Papel de la co-estimulación	18
3.6. Inhibición de la señalización	20
3.7. Modelos de interacción <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	21
3.8. Tipos de sinapsis	22
4. Balsas lipídicas (<i>Rafts</i>)	24
5. CD5 y CD6 como moléculas co-estimuladoras	27
5.1. Superfamilia de Receptores con dominios Ricos en Cisteinas tipo <i>Scavenger</i>	29
5.2. CD5	30
5.2.1. Descripción y estructura	30
5.2.2. Regulación transcripcional	30
5.2.3. Estructura génica	31
5.2.4. Expresión	31
5.2.5. Función	33
5.2.6. Vía de señalización	34
5.2.7. Ligandos	38
5.3. CD6	39
5.3.1. Descripción y estructura	39
5.3.2. Regulación transcripcional	40
5.3.3. Estructura génica	40
5.3.4. Regulación de la expresión	40
5.3.5. Función	41
5.3.6. Vía de señalización	43
5.3.7. Ligandos	44

II. Hipótesis de trabajo y objetivos	47
III. Materiales y métodos	51
1. Células	53
2. Anticuerpos y reactivos	53
3. Construcciones	54
3.1. Construcciones en el vector de expresión en pH β apr-1-neo para células de mamífero	54
3.2. Construcciones para la expresión de proteínas de fusión glutatión S-transferase (GST) en vectores pGEX	56
3.3. Construcciones para el sistema de doble híbrido	56
3.4. Construcciones en pMT2-HA	57
4. Experimentos de co-inmunoprecipitación a partir de solubilizados con diferentes detergentes	58
4.1 Biotinización de células en superficie	58
4.2 Experimentos de inmunoprecipitación, re-inmunoprecipitación e inmunodeplección	58
5. Transfección en células COS-7	59
6. Ensayos de <i>pull-down</i>	59
7. Análisis por <i>Wester blot</i>	59
8. Formación de casquetes o <i>caps</i> en la superficie de las células T	60
9. Co-modulación de proteínas de superficie	61
10. Medición de FRET (<i>Fuorescence resonance energy transfer</i>)	61
10.1. Bases	61
10.2. Técnica	62
11. Conjugados Células T-Células presentadoras de antígeno (APC)	63
11.1. Bases	63
11.2. Conjugados de Células T-Células Dendríticas	64
11.3. Conjugados de Células J77-Células Raji para la detección de CD5 y CD6 en la sinapsis inmunitaria	65
11.4. Conjugados de Células J77-Células Raji para la detección de proteínas en el cSMAC (<i>central Supramolecular activation cluster</i>)	65
11.5. Ensayos de maduración de la sinapsis inmunitaria	66
12. Ensayos de proliferación	66
13. Expresión de proteínas recombinantes solubles	66
14. Técnica de doble híbrido	67
14.1. Bases	67
14.2. Técnica	68

15. Aislamiento de <i>rafts</i>	69
15.1 Bases	69
15.2 Técnica	69
16. Coalescencia de <i>rafts</i>	70
IV. Resultados	71
1. Estudio de las asociaciones moleculares de CD6 en la superficie de los linfocitos T	73
1.1. Las moléculas accesorias CD5 y CD6 se asocian en la membrana de las células T	75
1.1.1. Los receptores CD5 y CD6 co-precipitan en linfocitos T normales y leucémicos	75
1.1.2. La asociación de CD5 y CD6 es independiente de la co-expresión de otros receptores linfocitarios de superficie y de la región intracelular de CD5	75
1.1.3. Medición de la asociación de CD6 y CD5 por FRET	77
1.1.4. Co-modulación parcial de CD5 y CD6 (<i>co-capping</i> y co-internalización)	78
1.2. El receptor CD6 se asocia físicamente al complejo CD3/TCR	80
1.2.1. Co-precipitación del complejo CD3/TCR y CD6 en lisados de linfocitos T	80
1.2.2. La asociación de CD6 y el complejo CD3/TCR es independiente de CD5	80
1.2.3. CD3/TCR se redistribuye parcialmente a los <i>caps</i> de CD6	82
1.2.4. Análisis por FRET de la asociación de CD6 con CD3/TCR	83
1.3. Asociación de CD6 con CD44 e ICAM-3	84
1.3.1. Estudios de co-immunoprecipitación de CD6 con CD44 e ICAM-3	84
2. Implicación de CD5 y CD6 en la activación de los linfocitos T	85
2.1. Localización de CD5 y CD6 en la sinapsis inmunitaria (SI)	87
2.1.1. Análisis de conjugados de células J77 y células Raji	87
2.1.2. Análisis de conjugados de células T y células dendríticas	87
2.1.3. Estudio de localización de CD5 y CD6 en el cSMAC	88
2.2. Inhibición de la activación de los linfocitos T con formas recombinantes solubles de las proteínas CD5 y CD6 (rsCD5, rsCD6)	90
2.2.1. Ensayos de inhibición de la maduración de la SI	90
2.2.2. Ensayos de inhibición de la proliferación de linfocitos T	92
2.3. Relación de CD5 y CD6 con las balsas lipídicas ricas en colesterol (<i>rafts</i>)	94
2.3.1. Co.localización de CD6 con <i>rafts</i> en linfocitos T	94

2.3.2. Presencia de CD5 y CD6 en <i>rafts</i>	95
2.3.3. CD6 induce coalescencia de <i>rafts</i>	96
3. Asociaciones moleculares mediadas por la región citoplasmática de CD6	99
3.1. Obtención y análisis de las construcciones de CD6 para los ensayos de doble híbrido	101
3.2. Análisis de la librería murina por ensayos de doble-híbrido	102
3.3. Interacción de la región C-terminal de CD6 con la fosfatasa PP2A	102
3.4. El receptor linfocitario CD6 interacciona con la proteína adaptadora syntenin-1, una proteína con dominios PDZ	104
3.4.1. Interacción específica de syntenin-1 con la región C-terminal de CD6	104
3.4.2. Análisis de la zona de unión entre CD6 y syntenin-1	104
3.4.3. Experimentos de co-transfección en células COS-7	106
3.4.4. Co-IP de CD6 y syntenin-1 en linfocitos humanos	107
3.4.5. Co-localización de CD6 y syntenin-1 en linfocitos humanos	108
3.4.6. Localización de syntenin-1 en el cSMAC	109
V. Discusión	111
1. Asociaciones moleculares de CD6 en la superficie de los linfocitos T	113
1.1. Asociación de CD6 con CD5	113
1.2. Asociación de CD6 con el complejo CD3/TCR	115
1.3. Asociación de CD6 con otros receptores linfocitarios como CD44 y ICAM-3	116
2. Implicación de CD5 y CD6 en los procesos de activación de los linfocitos T	117
2.1. Implicación de CD6 y ALCAM en los procesos de activación de los linfocitos T	117
2.2. Implicación de CD5 y su ligando en los procesos de activación de los linfocitos T	119
2.3. rsCD5 y rsCD6 como proteínas inmunomoduladoras	121
2.3. Relación de CD5 y CD6 con los microdominios lipídicos <i>rafts</i>	121
3. Asociaciones moleculares mediadas por la región citoplasmática de CD6	122
3.1. Interacción de la región citoplasmática de CD6 con PP2A-A	122
3.2. Interacción de la región citoplasmática de CD6 con syntenin-1	123
VI. Conclusiones	127
VII. Bibliografía	131

ABREVIATURAS

aa	aminoácido
Ac	anticuerpo
AcMo	Ac monoclonal
ALCAM	<i>activated leukocyte cell adhesion molecule</i>
AD	dominio de activación (<i>activation domain</i>)
AP-1	<i>activating protein-1</i>
APC	célula presentadora de antígeno (<i>antigen presenting cell</i>)
BCR	receptor de células B (<i>B cell receptor</i>)
BD	dominio de unión (<i>binding domain</i>)
BSA	albúmina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	DNA de cadena complementaria (<i>complementary DNA</i>)
C	dominio constante
CaMIIδ	<i>Serine/threonine kinase Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase IIδ</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD2AP	<i>CD2 adaptor protein</i>
CKII	<i>casein kinase II</i>
CM	cultivo mixto
c.p.m.	cuentas por minuto
CST	células estromales de timo
CTL	linfocito T citotóxico (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
CTX	subunidad B de la toxina colérica
Cy3	<i>cyanina 3</i>
DAG	<i>diacylglycerol</i>
DC	célula dendrítica
DC-SING	<i>DC-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DN	doble negativo
DP	doble positivo
Ea	eficiencia aparente de FRET
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
ERM	ezrin-radixin-moesin
FCS	suero fetal bovino (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	isotiocianato de fluoresceína (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>

FT	factor de transcripción
GPI	<i>glycophosphatidil inositol</i>
GARlg	suero de cabra anti Ig de conejo (<i>goat anti-rabbit Ig</i>)
GST	<i>glutathione-S-transferasa</i>
ICAM	<i>interacting cell adhesion molecule</i>
IP	inmunoprecipitación
HLA	antígeno linfocitario de histocompatibilidad (<i>histocompatibility lymphocyte antigen</i>)
-HTL	medio deficitario de histidina (H), treonina (T) y leucina (L)
HRP	peroxidasa de rábano (<i>horsedish peroxidase</i>)
Ig	inmunoglobulinas
INK γ	interferon γ
IL	interleucinas
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine based inhibition motif</i>
JNK	<i>c-jun kinase</i>
kDa	kilo Dalton
LAT	<i>linker of activation of T cell</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function associated</i>
LLC-B	leucemia linfática crónica B
LB	linfocito B
LPS	lipopolisacáridos
LT	linfocito T
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MHC	complejo principal de histocompatibilidad (<i>major histocompatibility complex</i>)
MHC-p	MHC-péptido antigénico
mRNA	RNA mensajero
MT	microtúbulos
MTOC	centro organizador de microtúbulos (<i>microtubule organizing center</i>)
NK-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NK	<i>natural killer</i>
NP-40	nonidet P-40
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBL	linfocitos de sangre periférica (<i>peripheral blood lymphocytes</i>)
PBS	tampón fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	ficoeritrina (<i>phycoerythrin</i>)
PHA	fitohemaglutinina (<i>phytohaemagglutinin</i>)

PK	<i>protein kinase</i>
PLL	poli-L-lisina
ProtA-seph	proteína A sepharose
PDK1	<i>phosphotyrosine dependent protein kinase 1</i>
PH	<i>plextrin homology</i>
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3 kinase</i>
PTK	<i>protein tyrosin kinase</i>
PLC-γ1	<i>phospholipase C-γ1</i>
RAMIg	suero de conejo anti-Ig murina (<i>rabbit anti-mouse Ig</i>)
ROI	región de interés (<i>region of interest</i>)
rpm	revoluciones por minuto
RR	rhodamine Red-X
SAv	Streptavidin
SD	desviación estándar
SEA/B/E	enterotoxina A/B/E de <i>staphylococcus</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
SH3	<i>Src homology 3</i>
SHP-1	<i>SH2 containing tyrosine phosphatase 1</i>
SI	sinapsis inmunitaria
SLP-76	<i>SH2 containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
Ser	serina
SP	positivo único (<i>single positive</i>)
SF	superfamilia
SRCR	receptor con dominios rico en cisteínas tipo <i>Scavenger (Scavenger receptor cystein rich)</i>
SMAC	complejo supramolecular de activación (<i>supramolecular activation cluster</i>)
cSMAC	SMAC central
pSMAC	SMAC periférico
TA	temperatura ambiente
TBS	tampón tris salino (<i>tris buffered saline</i>)
TC	tricolor
TCR	receptor de las células T (<i>T cell receptor</i>)
TH	tampón de homogeneización de <i>rafts</i> lipídicos
-TL	medio deficitario de treonina (T) y leucina (L)
TT	toxina toxoide
Tyr	tirosinas
Thr	treoninas
V	dominio variable
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
ZAP-70	<i>Zeta chain associated protein 70</i>

I. INTRODUCCIÓN

1. ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD4⁺ NAIVE

Un linfocito T (LT) en reposo o *naive* es activado cuando reconoce el antígeno peptídico para el que es específico. Dicho antígeno está unido a una molécula del Sistema principal de Histocompatibilidad (MHC, *Major histocompatibility complex*) en la superficie de la célula presentadora de antígeno (APC), que suele ser una célula dendrítica. El reconocimiento del complejo MHC-péptido antigénico (MHC-p) específico lo realiza el linfocito a través del llamado TCR o receptor de las células T. Esta molécula tiene una estructura altamente relacionada con la de los anticuerpos (Ac) (1) y está íntimamente relacionado con el co-receptor CD4 (2). La señal de unión del TCR con el complejo MHC-p es transmitida al interior de la célula por el complejo CD3 y amplificada por la unión del co-receptor CD4 al MHC de clase II (3). Esto es lo que se considera la 1ª Señal. Pero debido a que la afinidad de un TCR individual por su complejo MHC-p específico es relativamente baja, solo puede lograrse una unión entre ambas células suficientemente estable como para activar al linfocito T *naive* mediante la interacción de pares complementarios de moléculas denominadas acesorias. Estas parejas están formadas por moléculas expresadas en la superficie del LT, ej. CD28, que a través de su unión a sus contra-receptores expresados en la superficie de la APC, ej. B7, proporcionan la denominada 2ª señal (4, 5) (**Fig. I.1.**). Otras parejas de receptores accesorios son: *Lymphocyte Function Associated-1(LFA-1)/Interacting Cell Adhesion Molecule-1(ICAM-1)*, *CD2/LFA-3*, etc. Entonces se produce la unión de ambas células que se prolonga durante horas, formando una estructura denominada sinapsis inmunitaria. El resultado es la proliferación de los LT (expansión clonal) diferenciándose a células efectoras que activarán macrófagos (respuesta Th1) o estimularán la producción de anticuerpos por las células B (respuesta Th2). Si se bloquea la 2ª señal, dejando la 1ª, se produce una falta total de estimulación del linfocito ante una nueva presentación del antígeno, fenómeno llamado anergia.

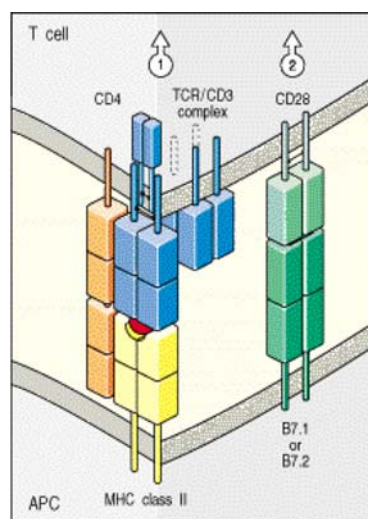


Figura I.1. La activación de las células T CD4⁺ naive requiere dos señales independientes. La unión del complejo MHC-p específico por el receptor TCR y el co-receptor CD4 transmiten la señal a la célula T de que ha encontrado un antígeno (señal 1). La activación de las células T *naive* requiere de una segunda señal, la señal co-estimuladora, que ha de ser proporcionada por la misma APC. *Figura tomada de Janeway et al. 1997, Immuno Biology, 3th edition, chapter 7.*

La producción de los LT efectores no se inicia en el lugar donde el patógeno primero establece un foco de infección, sino que ocurre en los tejidos linfoides periféricos, como los ganglios linfáticos, a los cuales los patógenos o sus productos son transportados por la linfa o las DC (**Fig. I.2.**). Una vez un LT *naïve* ha completado su diferenciación a células efectoras abandonan estos órganos y pasan a la circulación sanguínea para llegar al lugar de infección (6). En su camino las células son guiadas por los cambios en el tipo de moléculas de adhesión que se produce en la pared de los vasos del lugar de infección y por factores quimiotácticos locales. Por su parte, el patrón de receptores expresados por los linfocitos efectoras también ha variado respecto al de las células *naïve*, aumentando los niveles de moléculas de adhesión como LFA-1 y CD2, facilitando su unión a las células diana.

Existe otro tipo de linfocitos que expresan el co-receptor CD8, en lugar del CD4. Estos linfocitos son activados y se diferencian a células efectoras de forma similar a los CD4⁺ pero reconocen péptidos específicos unidos a moléculas MHC de clase I. Cuando se han convertido en LT efectores se unen a las células diana (ej. cualquier célula infectada por virus) y producen la destrucción directa de éstas, por ello también se denominan citotóxicos (7, 8).

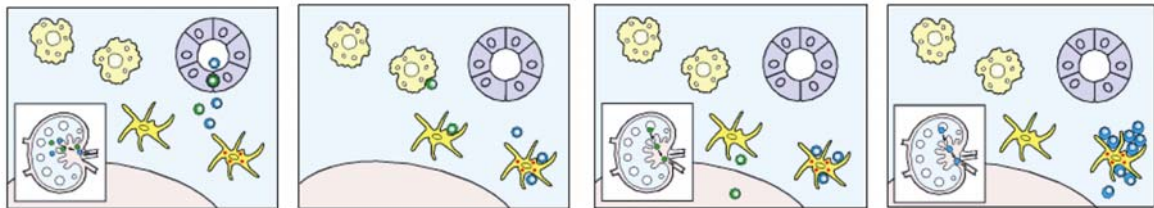


Figura I.2. Las células T *naïve* encuentran el antígeno específico durante su circulación por los órganos linfoides periféricos. Las células T *naïve* circulan por los órganos linfoides periféricos, como los ganglios linfáticos mostrados aquí, entrando a través de las vénulas endoteliales al córtex del ganglio donde encuentran muchas APC (células dendríticas y macrófagos). Las células T que no encuentran su antígeno específico (verdes) dejan los ganglios a través de los vasos linfáticos volviendo de forma eventual a la circulación. Las células T que encuentran el antígeno (azul) presentado por la APC son activados y proliferan y se diferencian a células efectoras. Una vez todo el proceso se ha completado estas células armadas efectoras también dejan el ganglio linfático hacia la circulación. *Figura tomada de Janeway et al., 1997, Immuno Biology, 3th edition, chapter 7.*

2. TCR

El TCR es un complejo multimérico compuesto por una cadena α y una cadena β . Existe una población minoritaria de células denominada $\gamma\delta$ en la que el TCR está compuesto por una cadena γ y una cadena δ . Estas cadenas pertenecen a la superfamilia (SF) de las inmunoglobulinas (Ig) y tienen un dominio amino-terminal variable (V), encargado de reconocer el [complejo](#) MHC-p, y una dominio carboxi-terminal constante (C). Las [cadenas](#) $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ están unidas de forma no covalente con las cadenas del CD3 γ , δ y ϵ y la cadena ζ , que tienen capacidad de transducir señales al interior de la célula (3, 9) (**Fig. I.3.**).

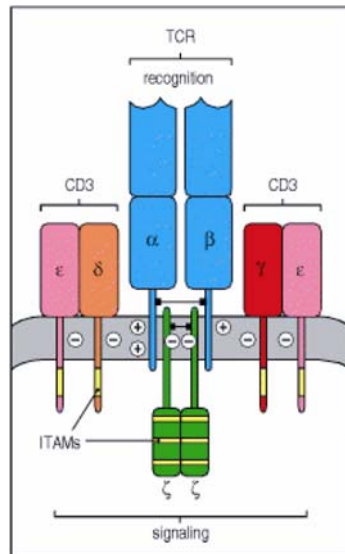


Figura I.3. Estructura del receptor de las células T (TCR). El TCR es un heterodímero formado por una cadena α y una cadena β , que reconoce y se une al complejo MHC-p, pero que no tiene capacidad de señalizar hacia el interior de la célula. Para ello el TCR está unido a otras cadenas, el complejo CD3 (formado por dos cadenas ϵ , una cadena δ y una cadena γ) y el homodímero formado por dos cadenas ζ . Cada cadena del complejo CD3 tiene un ITAM y cada cadena ζ tiene tres ITAM. La región transmembrana de cada cadena tiene una carga neta positiva (+) o negativa (-) de forma que la carga final del complejo TCR completo está compensada. *Figura tomada de Janeway et al., 1997, Immunology, 3th edition, chapter 4.*

Es conocido que tirosincinasas (PTKs, *Protein Tyrosin kinases*) de la familia de Src, Syk y Tec se asocian a CD3, la cadena ζ y el co-receptor CD4. La PTK Lck de la familia de las Src está asociada al receptor CD4 (al CD8 en las células T citotóxicas) y probablemente tras la activación del TCR es la cinasa responsable de la fosforilación de las tirosinas del motivo ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) presentes de forma única en las cadenas γ , δ y ϵ del CD3 y de forma triple en la cadena ζ del TCR (**Fig. I.4.**). Una vez los ITAM están fosforilados se les puede unir la cinasa ZAP-70 (*zeta Chain associated protein 70*), de la familia de las Syk, a través de sus dominios SH2 (*Src homology 2*). La cinasa así unida se convierte entonces en activa tras ser fosforilada por Lck y Fyn (otra PTK de la familia Src), y se inicia una cascada de fosforilación de diferentes sustratos entre los que se encuentran SLP-76 (*SH2 containing leukocyte protein of 76 kDa*) y LAT (*Linker for Activation of T cell*) (10). La fosforilación de LAT, una proteína integral de membrana asociada a los lípidos de los *rafts*, crea sitios de unión para proteínas con dominios SH2. Proteínas como PLC- γ 1 (*phospholipase C- γ 1*), Grb2, Grap y Gads se unen a LAT fosforilada (11). SLP-76 también es reclutado a todo este complejo por su unión al dominio SH3 de Gads (12). A su vez a SLP-76 se puede unir otra serie de proteínas como PLC- γ 1 (13), Vav (14), Nck, Itk (15). Así en la activación de PLC- γ 1 hay una implicación de LAT y SLP-76. La PLC- γ 1 inicia una cascada que lleva al aumento de calcio intracelular y la producción de DAG (*diacylglycerol*), la cual a su vez se une a proteínas señalizadoras implicadas en la activación del linfocito como miembros de la familia de PKC (*protein Kinase C*), PKD, y la vía del Ras (9). Otra importante vía activada por la unión del TCR es la vía de PI3K (*Phosphatidylinositol 3 kinase*). Los productos de esta vía se unen a dominios PH (*plestrin homology*) e inducen re-localización de proteínas definiendo áreas en la membrana donde la activación puede ocurrir. También activan miembros de la familia de las

PKB, implicados en el ciclo celular y la supervivencia de la célula, y PDK1 (*phosphoinositide dependent protein kinase*), implicada en el control del crecimiento celular (9).

Como se concluye de esta secuencia, las proteínas adaptadoras son elementos básicos en el proceso de activación celular. Estas proteínas tienen dominios modulares que les permiten mediar interacciones tanto proteína-proteína como lípidos-proteína. Aunque ellas no tienen actividad enzimática intrínseca, son responsables de colocar las moléculas efectoras cerca de sus dianas. Como estas asociaciones fueron inicialmente descritas en estudios de co-inmunoprecipitación, poco se conoce sobre el inicio, maduración, dinámica y estequiometría de estos complejos. Lo que sí se conoce es que son importantes para transmitir la información desde la membrana de las células T hasta el núcleo y producir el cambio en la transcripción de los genes que permiten a la célula realizar sus funciones efectoras (16).

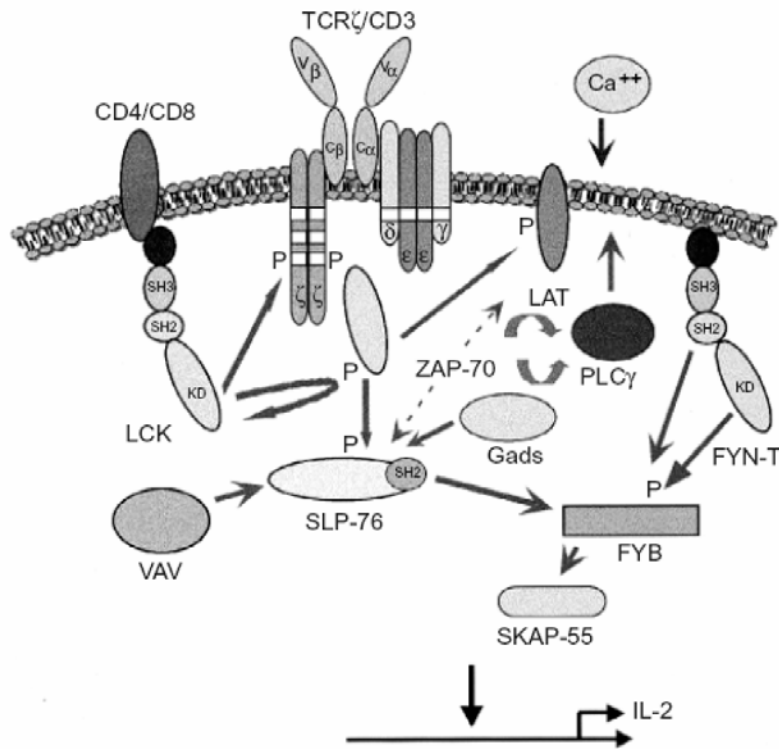


Figura 1.4: Esquema de las vías de señalización durante la activación de la célula. *Kennedy et al., 1999, Cell Calcium., 26:227-35.*

Por tanto la activación de las células T por las APC resulta en la rápida activación de cascadas de señalización intracelular que llevan a una variedad de respuestas biológicas como la proliferación celular, la diferenciación, la anergia e incluso la muerte celular. El mecanismo exacto por el que se produce una respuesta celular y no otra todavía está en estudio. Trabajos recientes sugieren que la redundancia en los dominios ITAMs junto a la variación en sus patrones de fosforilación puedan resultar en la diferente amplificación de las señales y por tanto en diferentes respuestas celulares. Estos dominios denominados ITAMs poseen dos tirosinas

(Tyr) susceptibles de ser fosforiladas las cuales están separadas por 9-11 aa (YXX(L/I))X₆₋₈YXX(L/I)). En las células en reposo la cadena ζ del TCR se encuentra no fosforilada, con un peso de 16 kDa, o mono fosforilada, pesando entonces 21 kDa. Tras la activación de la célula aparece una tercera especie de 23 kDa, que está doblemente fosforilada, manteniéndose la de 21 kDa y desapareciendo la de 16 kDa (17). Se ha sugerido que existe una jerarquía de fosforilación de las Tyr dando un patrón que depende de la naturaleza del ligando del TCR, ya que agonistas parciales inducen una fosforilación sustancialmente diferente de los agonistas fuertes (18).

En resumen, la activación de las células T se ha de ver como un proceso que a través del contacto con otra célula, perturba el sutil equilibrio de fosforilación-defosforilación preexistente y que lleva a la activación de cinasas de tirosinas presentes en el citosol, las cuales a su vez activan otras proteínas (9).

3. SINAPSIS INMUNITARIA.

3.1. Estructura

Varios estudios basados en la imagen han establecido que cuando una célula T reconoce el MHC-p específico en la APC, ambas sufren una reorganización de las moléculas de su membrana en una estructura llamada Complejo supramolecular de activación (SMAC, *Supra Molecular Activation Cluster*) y la zona de contacto entre las dos células se denomina entonces sinapsis inmunitaria (SI) (19, 20).

El primer contacto entre el TCR y el complejo MHC-p específico se produce en la zona más periférica de la SI y, a medida que la SI va madurando, se va trasladando al centro. Así a los 30-45 minutos la SI ya es madura y se pueden diferenciar dos zonas: una zona central (c) o cSMAC, enriquecida en el complejo CD3/TCR y otras moléculas señalizadoras, como CD28 y Lck, y una zona periférica (p) o pSMAC, que contiene moléculas más implicadas en la adhesión como LFA-1 y talín (**Fig. 1.5.**) (19). Los componentes de la APC también están integrados en esta estructura, así en el cSMAC se localiza el complejo MHC-p y en el pSMAC ICAM-1. Modelos matemáticos han permitido predecir las dimensiones de la SI, y han determinado que el cSMAC mide unos 15nm de ancho, que corresponde al espacio que ocupa la unión del TCR al MHC-péptido, y por tanto solamente se pueden incluir aquí aquellas parejas ligando/receptor que no superen estas dimensiones. Por otro lado, el pSMAC mediría 42 nm, como la interacción ICAM1/ LFA1 (21, 22).

El hecho que la señalización mediada por la movilización de calcio (23) y la activación de proteínas cinasas (24) preceda a la segregación del SMAC, permite diferenciar dos fases en la formación de la SI, una fase de corta duración y alta fluidez denominada inmadura, seguida de una segunda fase caracterizada por la formación del cSMAC y pSMAC denominada madura.

La exacta función de la SI en la activación de las células T no está aún bien comprendida y probablemente depende del contexto fisiológico en que ésta se forme. A pesar de no ser necesaria para las señales iniciales del TCR sí ha demostrado ser importante para la inducción de la proliferación de las células T, producción de citocinas, selección negativa de los timocitos y liberación de gránulos líticos (25).

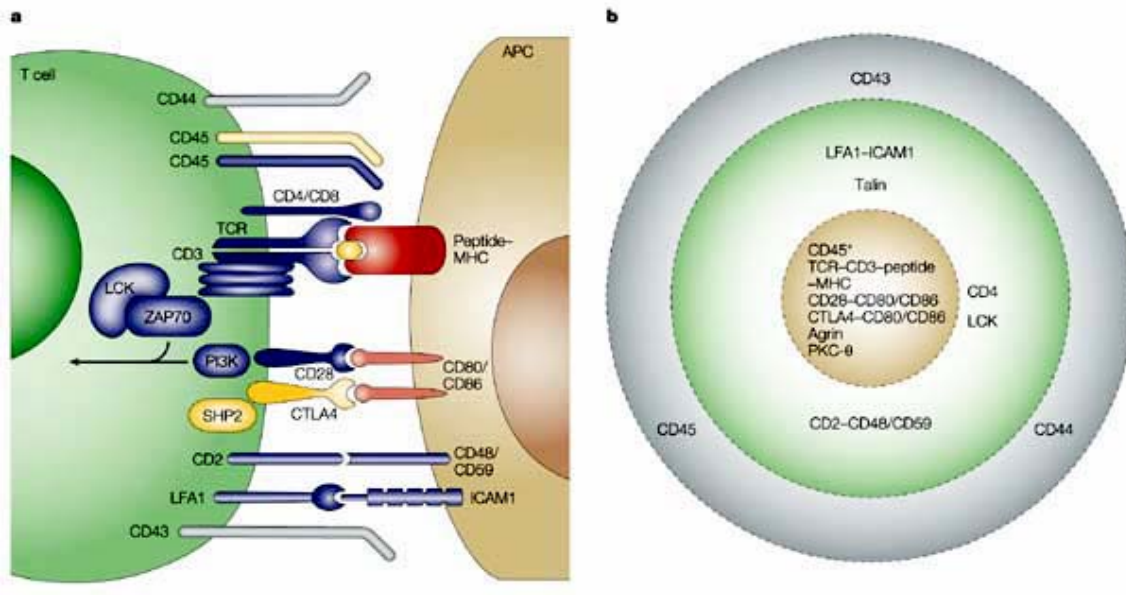


Figura I.5. Esquema de una SI madura. A, Imagen esquemática mostrando una selección de las parejas receptor/ligando implicadas en el reconocimiento de las células T. El complejo MHC-p específico se muestra en rojo, las moléculas activadoras y co-estimuladoras se muestran en azul, las moléculas inhibitoras en amarillo, y las moléculas que no contribuyen a la señalización en gris. La flecha indica las señales que llevarán a la activación de la célula. **B,** Imagen que muestra la característica morfología en "ojo de buey" de la organización molecular del SMAC, el cSMAC en amarillo, el anillo del pSMAC en verde y la región distal (dSMAC) en gris. También se muestran las parejas moleculares que están enriquecidas en cada región: CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*); ICAM1; LFA1; PI3K; SHP2, (*SRC homology 2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2*); TCR; ZAP70, * CD45 entra en el cSMAC en fases tempranas. Huppa et al., 2003, *Nature Reviews immunology*, 12: 973-83.

3.2. Unión TCR/MHC-peptido específico

El TCR interacciona con el MHC-p específico con una muy alta especificidad pero sorprendentemente con una afinidad muy baja, a pesar de ello hay estudios que demuestran que las células T pueden ser muy sensibles a la presencia del antígeno. Así se han visto respuestas de movilización de calcio a tan sólo 1 complejo MHC-p agonista. También se ha visto la formación de una SI con tan sólo 10 complejos MHC-p agonistas, aunque para ello es necesaria la presencia de CD4, ya que en su ausencia se requiere una cantidad significativamente mayor de complejos (26). Por el contrario, en un trabajo anterior se habían estimado que eran necesarios unos 100 contactos para la correcta activación de las células T (27). Una explicación a estas diferencias puede ser la diferente sensibilidad de las técnicas

utilizadas. Otro trabajo demuestra que la presencia de altas dosis de ligandos de muy baja afinidad (como p.e. péptidos propios) es capaz de sinergiar con bajas concentraciones de péptidos agonistas y estimular la activación de las células T (28).

Una vez los TCR son activados, son internalizados de forma que hay un constante recambio de los TCR de la superficie, lo que permite que la célula reciba un estímulo continuo (29). Aunque existen pocos trabajos sobre las bases moleculares del proceso de activación e internalización del TCR, se han descrito dos posibles modelos. Unos trabajos describen que un MHC-p específico puede unir diferentes TCRs, produciendo su activación, entonces los TCRs activados son internalizados y otros libres ocupan esos lugares (30) (modelo secuencial) (**Fig. I.6B.**). Otros trabajos describen que un TCR que ha unido un MHC-p específico provoca el reclutamiento de otros TCRs, que son de esta manera activados. En este modelo la internalización del TCR afecta tanto a los TCRs que han unido el MHC-p como no, sugiriendo una asociación entre los diferentes TCRs en la superficie de la célula (31) (modelo en paralelo) (**Fig. I.6A.**). En ambos caso los TCRs internalizados son degradados en las vesículas lisosomales (32).

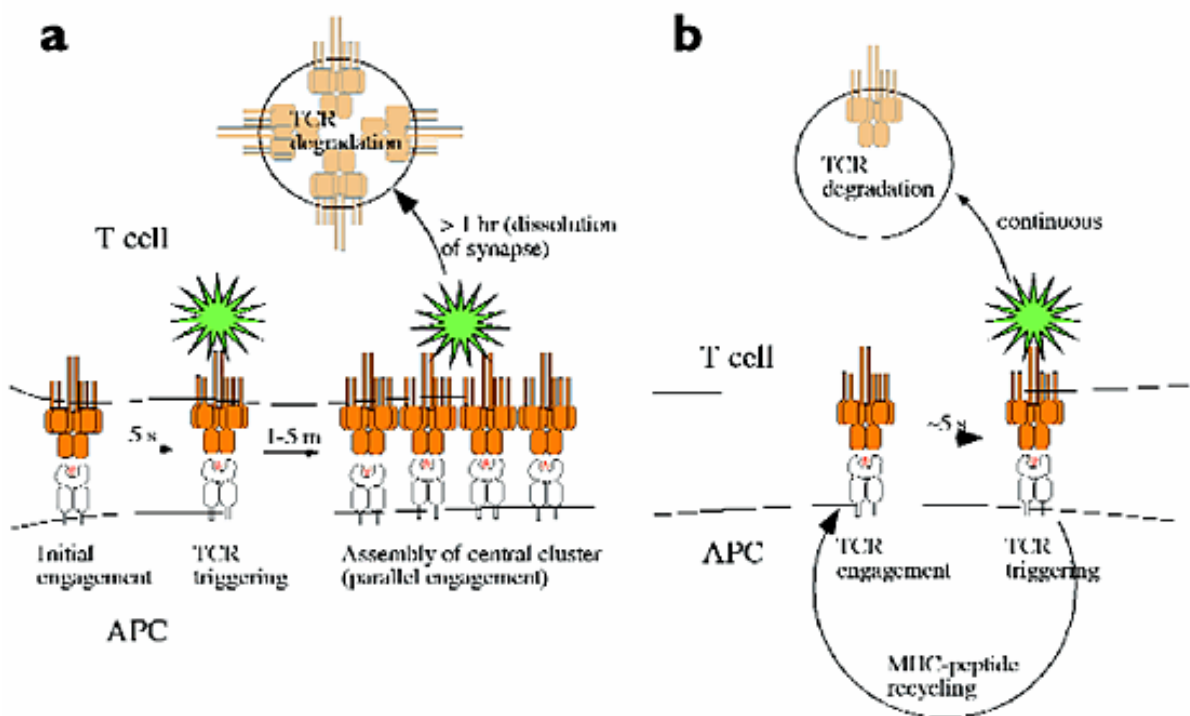


Figura I 6. Modelos de internalización del TCR. A, Modelo de activación en paralelo. Trabajos sobre la internalización del TCR sugieren que múltiples TCRs son ocupados a diferentes tiempos por cada complejo MHC-p. En este modelo los TCRs activados se sitúan en una zona central y otros TCRs son activados en paralelo al ser incorporados a estas estructuras organizadas (*cluster*). El *cluster* de TCRs es degradado en bloque cuando la célula T y la APC se separan (33). **B,** Modelo en serie. Se produce una rápida dispersión de TCRs activados sin la incorporación a *clusters*. Así los complejos MHC-p pueden unir otros TCR produciéndose una activación de los diferentes TCRs de forma seriada. La estrella simboliza el estímulo. *Dustin et al., 2000, Nature Immunology, 1:23-29.*

Por otro lado es controvertida la importancia de la duración del contacto entre la célula T y la APC. Un trabajo reciente sugiere que la señalización a través del TCR debe ser necesaria sólo en los estadios tempranos de la activación de la célula T *naive* y que un contacto de unas 2 horas es suficiente para activar la célula T (24). Apoyando esta hipótesis está el hecho de que las células T internalizan hasta un 90% de los TCR de superficie en los primeros 30-60 min de contacto (34, 35). Pero la descripción de que a pesar de la rápida internalización del TCR todavía se detectan señales dependientes de su actividad hasta 10 h después de la formación del contacto celular, sugiere que la señalización constante a través del TCR es importante hasta etapas avanzadas de la formación de la SI. Incluso se ha observado que el bloqueo de la interacción del TCR con su ligando, incluso horas después de iniciado el contacto, produce la rápida disolución de la SI y pérdida de su efecto potencial (36). También se ha descrito que contactos prolongados tienen un efecto acumulativo sobre la capacidad proliferativa de la célula T (29), y que la duración de los contactos, en presencia de las citocinas adecuadas, modulan la polarización de la célula a respuesta Th1 (contactos cortos) o Th2 (contactos largos) (37). En conjunto estos datos indican que es necesaria una constante estimulación antigénica para mantener la integridad de la SI y la completa activación de la célula T.

3.3. Formación del señalosoma

Cuando la célula T naive reconoce un MHC-p específico en la APC se produce la activación de la célula, lo cual se traduce en el inicio de la cascada de señalización del TCR (ver apartado 2. TCR) a la vez que las moléculas se van organizando formando la estructura llamada SMAC. Por lo tanto a lo largo de este proceso el TCR, que se encuentra acumulado preferentemente en la zona periférica del contacto donde también se detecta la fosforilación de Lck y ZAP-70, se va desplazando hacia el centro. Esto sugiere que la transducción de señales se inicia en las pequeñas zonas periféricas y ricas en TCRs antes de la formación de la SI madura (24). Datos posteriores (38) han demostrado que la activación de Lck requiere la estimulación tanto de CD4, responsable de su atracción a la SI, como de CD28, pues mantiene la fosforilación de Lck. Más estudios sobre la regulación de la localización y activación de Lck demuestran, por técnicas de FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*), que tanto CD4 como Lck son reclutadas al cSMAC junto al TCR a tiempos tempranos (39). Pero en la SI madura, la mayor parte del CD4 es relegado a la periferia (23) y parte del Lck también se localiza con él en el pSMAC (40). Esto sugiere que parte de las moléculas de Lck están asociadas a CD4, incluso antes de iniciarse la señalización, y lo siguen fuera del cSMAC. Lck fosforila ZAP-70 convirtiéndola en activa. Ésta a su vez fosforila otras moléculas como LAT y SLP-76, necesarias para la óptima activación de la célula. Se ha demostrado que ZAP-70 es importante no sólo para la fosforilación de LAT, sino también para su reclutamiento a la SI. Por el contrario

no está implicada en el reclutamiento de CD2 o la exclusión de CD45 o CD43 (41). Está bien establecido que la generación de DAG es responsable de la translocación a la membrana y la activación de miembros de la familia de las PKC, tanto clásicos como nuevos (42, 43). Los linfocitos T expresan muchos de estos miembros, pero sólo la isoforma PKC θ es selectivamente reclutada a la SI (44). El análisis del ratón *knock-out* mostró la importancia de esta proteína en la activación de AP-1 (*activating protein-1*), NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) e interleucina (IL) -2 en las células T (45). Se ha demostrado que ZAP-70 y la producción de DAG vía PLC- γ 1 son responsables del reclutamiento de PKC θ a la SI (41, 46) y que la presencia del co-receptor CD28 es también importante para su localización en el cSMAC (47). Además de las moléculas ya mencionadas también se ha observado el acúmulo de LAT, Grb2, Gads, SLP-76 y Cbl (48, 49). Todas ellas, a excepción de SLP-76, sufren una rápida redistribución en minutos que sugiere que no participan de las funciones del cSMAC. Aunque el acúmulo de moléculas señalizadoras al lugar de unión del TCR está bien establecido, el mecanismo por el que este fenómeno regula la redistribución de las moléculas que formarán la SI madura no está todavía bien caracterizado. La fosfatasa CD45 es reclutada de forma muy temprana y breve en el cSMAC y posteriormente es segregada a una zona que queda rodeando al pSMAC denominada SMAC distal (dSMAC). Se ha descrito que CD45 podría mantener la sensibilidad del TCR al mediar la defosforilación de Lck, su forma activa. El reclutamiento de CD45 al cSMAC podría servir para producir una defosforilación inicial de todas las proteínas reclutadas, que pueden llegar allí en diferentes estados de fosforilación, y así prevenir activaciones inespecíficas por un exceso de proteínas señalizadoras activadas. En esta dirección se ha descrito una defosforilación de ZAP-70 y CD3 que se correlaciona con la dinámica de CD45 y produciría una inhibición de la señalización (49).

3.4. Citoesqueleto de actina y microtúbulos

Está ampliamente aceptado que el citoesqueleto de actina está implicado en la formación de la SI. Esto se basa en estudios en los que la presencia de inhibidores del citoesqueleto, como citocalasina D, impiden la formación de la SI (50, 51) o el hecho que mutaciones en proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto de actina como Vav, WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) o Cdc42 causen patrones aberrantes de SI (52-54). De hecho la activación de la célula T por el contacto con la APC, se acompaña por una reorganización dinámica de los filamentos de actina corticales (55-57). Durante la fase de *scanning*, en la que la célula T rueda por la superficie de la APC, la pérdida del contacto se produce por la pérdida de la fuerza de unión mediada por las moléculas co-estimuladoras. Así la célula T busca señales de peligro en la célula APC, como un aumento de expresión del ligando de CD28 (B7.1 y B7.2), y si no los encuentra rápidamente pierde el contacto para ir a buscar otra APC. Por el contrario cuando se detectan estas señales de peligro el contacto se hace estable y se producen cambios en el

citoesqueleto que son inducidos por moléculas co-estimuladoras y no por el TCR, pues se dan incluso en ausencia de reconocimiento antigénico (58-60) (Fig. I.7.).

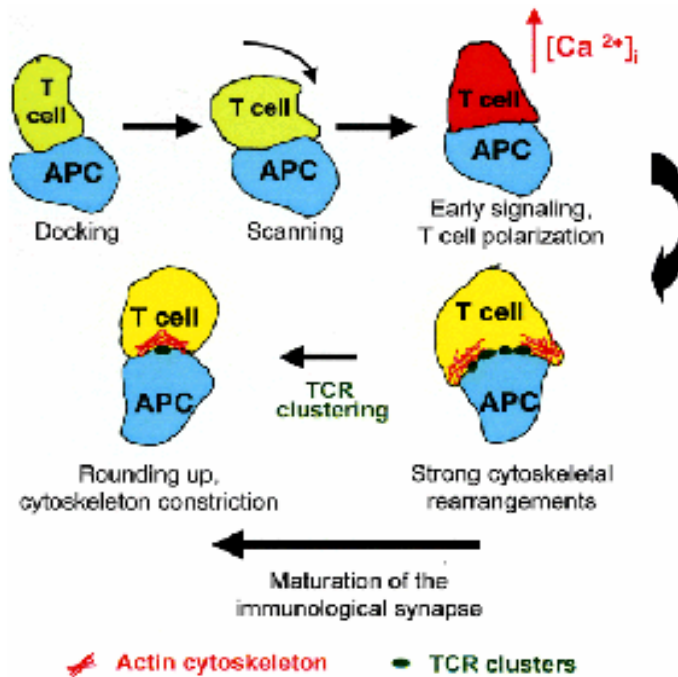


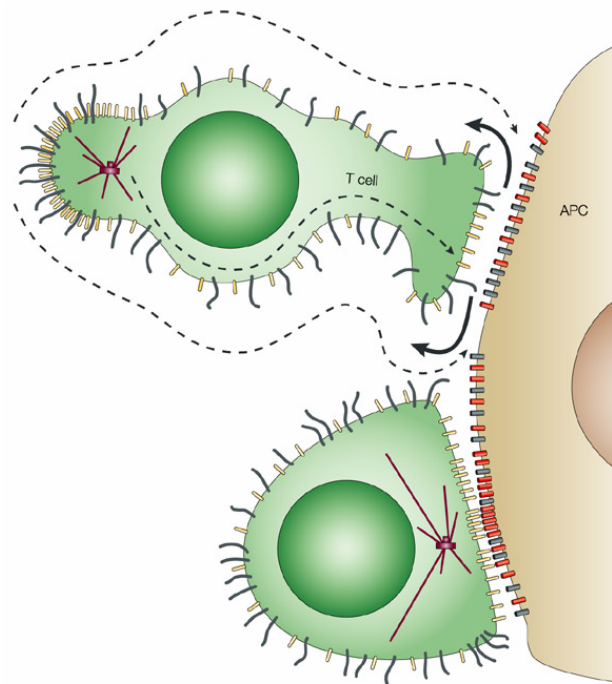
Figura I.7. Etapa temprana del contacto entre la célula T y la APC. Cambios morfológicos y reorganización del citoesqueleto de actina. La célula T entra en contacto con la APC y busca en su superficie señales de peligro. Cuando un complejo MHC-p específico es encontrado se para o reduce el movimiento y envía las señales tempranas como es la movilización de calcio. Esto es seguido por importantes cambios morfológicos, los cuales dependen del citoesqueleto de actina. En este punto se produce una activa polimerización del citoesqueleto de actina produciéndose un aumento de la zona de contacto entre la célula T y la APC. Finalmente la célula T se redondea y la zona de contacto se reduce. Esto coincide con la segregación y de las moléculas que formarán el SMAC en la SI madura. *Das et al., 2002, Immunol. Rev., 189:123-335.*

Recientemente se ha descrito que la interacción de ICAM-3 con LFA-1 se produce en la fase más temprana del contacto, de una forma independiente de antígeno, y esto aporta la fuerza de adhesión necesaria para el *scanning* (61). Este contacto es seguido por la unión de CD2 con LFA-3, permitiendo la aproximación de las membranas celulares necesaria para la interacción del TCR con el MHC-p (62). Además las señales enviadas por esta interacción producen un cambio en la afinidad de LFA-1 por su ligando que hace que la unión entre las dos células sea más fuerte (63). Por tanto las señales antigénico independientes mediadas por estas moléculas promueven señales a través de TCR permitiendo los cambios en el citoesqueleto de actina que estabilizan el contacto entre la célula T y la APC. Las señales antigénico dependientes promovidas por el TCR ocurren en una primera fase con niveles bajos de movilización de calcio, y no se conocen muy bien. Seguidamente se produce un gran aumento del calcio intracelular y la célula para su *scanning* y se inicia la organización de las moléculas de superficie que llevará a la formación de una SI madura con su característica estructura de cSMAC y pSMAC (60) (Fig. I.5.). Existe un conjunto de moléculas que unen el citoesqueleto de actina a

las proteínas de membrana. La primera identificada fue Talina, la cual se vio que se localizaba en la zona pSMAC (64). Otra molécula fue CD2AP (*CD2 Adaptor protein*), que une CD2 con el citoesqueleto (65). Las proteínas ERM (ezrin-radixin-moesin) también se han identificado unidas a proteínas de membrana como CD43, CD44, ICAM-2 (66), ICAM-1 (67), ICAM-3 (68). Todas estas proteínas son importantes en las primeras fases del contacto de la célula T con la APC (69, 70). Recientemente se ha descrito que las proteínas ERM son rápidamente inactivadas por desfosforilación, post activación del TCR (1 minuto) a través de la vía Vav1-Rac1. Esto permite la relajación del citoesqueleto de actina subcortical permitiendo así que la célula sea más flexible y se adapte mejor a la superficie de la APC (71).

Tradicionalmente se ha considerado que los microfilamentos de actina son los componentes del citoesqueleto más importantes en la regulación de la organización de la membrana plasmática durante la adhesión y señalización de la célula T (51). Actualmente existen datos que apuntan a que la organización de los receptores es un proceso complejo y dinámico en el que otros componentes del citoesqueleto pueden ser importantes. Uno de estos componentes son los microtúbulos (MT). Se ha observado que uno de los cambios que se dan en el citoesqueleto en las etapas tempranas del contacto de la célula T con la APC es la reorientación del MTOC (*microtubule organizing center*) hacia la zona de contacto entre las dos células (**Fig. I.8.**). El papel de esta reorientación está todavía en estudio. Se ha descrito que la orientación del MTOC, junto a la reorientación del aparato de Golgi, es necesaria para la secreción de IL hacia la APC, sin afectar a las células vecinas (72, 73). Esta secreción tan focalizada es sobretodo muy importante para la función de las células T citotóxicas sobre la célula diana. Pero también se ha descrito que parece ser dispensable para la señalización hacia el núcleo y la activación de la transcripción de IL-2 (74). Por el contrario se ha visto que la reorganización del citoesqueleto de MT contribuye a la maduración de la SI (23, 50) y que es necesario que esté intacto para la estabilización de la SI (75).

Por otro lado se ha descrito que tanto ZAP-70 como SLP-76 son necesarias para que se produzca esta reorientación del MTOC y que ésta es independiente de la movilización de calcio. Esto indica que las señales inducidas por el TCR, implicadas en los procesos de transcripción, son diferentes de las señales implicadas en la reorientación del MTOC (76). Es conocido que una porción de los MT están acetilados y esto se ha relacionado con una implicación en la estabilización de estructuras intracelulares (77). Un trabajo reciente muestra que en la SI se acumulan MT acetilados y describe que tras la activación del TCR se produce una primera fase de desacetilación de los MT que es seguida por una fase más tardía de acetilación (78). El enzima HDAC6 (*histone deacetylase 6*), con actividad deacetilasa sobre los MT y las histonas (79), también se localiza en la SI. La sobreexpresión de HDAC6 inhibe la translocación del MTOC así como la estructura normal de la SI, indicando que el balance entre la acetilación/desacetilación de los MT es necesario, no solo para la polarización del MTOC sino también para una correcta distribución espacial de CD3 y LFA-1 en la SI. Estos datos sugieren que la construcción de una red de MT está implicada en el reclutamiento de otras proteínas señalizadoras a la SI (78).



Nature Reviews | Immunology

Figura I.8. Etapa temprana del contacto entre la célula T y la APC. Reorientación del MTOC. Cuando el TCR reconoce el complejo MHC-p específico la célula para su migración y el MTOC se reorienta desde el urópodo hacia la SI. Las moléculas de TCR (amarillo) son reclutadas en el interior de la SI y otras moléculas como CD43 son excluidas. Complejos MHC-p estimulados (rojo) y no estimulados (gris) están presentes en la SI como se indica. *Huppa et al., 2003, Nature Reviews immunology, 12: 973-83.*

En conjunto todos estos datos sitúan al citoesqueleto de actina más implicado en el primer contacto entre las células y la organización del citoesqueleto de MT (MTOC), que está precedida por la señalización de TCR (fosforilación y aumento de calcio), más implicado en la consolidación del contacto (80).

3.5. Papel de la co-estimulación

Las moléculas co-estimuladoras se ha demostrado que son importantes para la formación, maduración y estabilización de la SI y por tanto para la activación de la célula T (28, 50, 81, 82). Estas moléculas se organizan en la zona de contacto entre la célula T y la APC, formando una SI, y esta organización es necesaria para que las señales que recibe la célula T a través del TCR se prolonguen en el tiempo lo suficiente para conseguir su activación (20).

La co-estimulación inicia un transporte direccional activo de proteínas y dominios lipídicos denominados *rafts* (ver apartado 4. Balsas lipídicas) a la zona de contacto entre las dos células (50). Este transporte requiere de la participación del citoesqueleto y se correlaciona con un

aumento y mantenimiento de la señalización. Un criterio importante de selección de qué elementos son transportados a la SI, es el tamaño. Así en la zona central encontraríamos moléculas como CD2 que interacciona con su ligando (CD58) generando un espacio de 15 nm, que es el tamaño también creado por la interacción TCR-MHC-p. En la zona periférica quedarían moléculas más grandes como las integrinas y sus ligandos, de la superfamilia de las Ig (SF-Ig) (83, 84) (**Fig. I.9**).

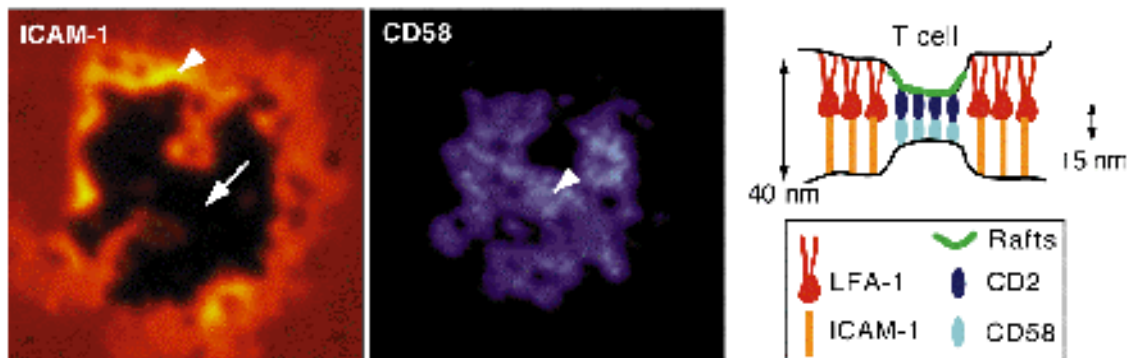


Figura I.9. Estructura de la SI. Izquierda, El patrón de unión de CD2 y CD58 en un contacto entre una célula T con una membrana artificial que contiene CD58 (azul) e ICAM-1 (rojo) (65). La cabeza de flechas indican la zona de unión de los respectivos ligandos. Las flechas normales indican la zona de exclusión de la interacción de ICAM-1 por ser de dimensiones mayores a los 15 nm que mide la interacción de CD2 y CD58. Derecha, Esquema de la posición de las moléculas en la SI y su dimensión de entre 40 y 15 nm. El complejo CD3/TCR y los rafts se localizan en la zona central de 15 nm (19). *Dustin, et al., 1999, Science, 283:649-650.*

Muchas moléculas han sido descritas como co-estimuladoras, pero CD28 es la más característica. La ligación de CD28, ya sea por su ligando B7 (CD80, CD86) o por Ac, puede potenciar fuertemente la respuesta del TCR. Se ha descrito que CD28 es un activador específico de JNK (*c-jun kinase*) y del factor de transcripción NF- κ B, pero para ello su activación individual no es suficiente y requiere de la activación del TCR (84). CD28 también tiene capacidad de reclutar PI3K, el dominio PH de Itk y también de activar Lck. Estas actividades bioquímicas son compartidas por el TCR, y de aquí el concepto de que CD28 potencia y prolonga la activación inducida por el TCR.

No todas las moléculas consideradas co-estimuladoras han demostrado ser importantes para la formación de la SI. Así la participación de CD28 no está clara. En contra están los trabajos de Dustin y colegas (20, 85) en los que la introducción de CD80 en una bicapa lipídica plana no afectaba la formación de la SI. Por el contrario, Wülfing y Davis (50) hallaron que Ac monoclonal (AcMo) anti-CD80 y anti-CD86 o anti-ICAM-1 impedían la reorganización característica de las moléculas en un SMAC (28) y reducían el número de contactos de células T-APC que mostraban acúmulo de cadena ζ en el cSMAC (23). Así tanto CD28 como ICAM-1 parecen importantes para la correcta organización de la SI. En este sentido Wetzel y colegas

(82) demostraron que el bloqueo de la co-estimulación a través de LFA-1 o CD28, no solamente alteraba la morfología de la sinapsis y reducía significativamente tanto el área como la cantidad de complejos MHC-p específicos en la SI madura, sino que estas alteraciones se correlacionaban con una disminución de la proliferación de las células T. Todos estos datos indicaban que las diferencias en la SI vistas después de 30 minutos de la interacción célula T y APC son importantes para las respuestas a largo término de las células T a los antígenos.

La pareja LFA-1/ICAM-1, formada por una integrina y una proteína de la familia de las Ig respectivamente, ha demostrado su implicación tanto en procesos de adhesión como de activación de las células T. Así se ha demostrado que a pesar de una alta concentración de complejos TCR/MHC-p específicos no se puede compensar un bloqueo de las señales co-estimuladoras transmitidas por LFA-1/ICAM-1 (87). Basándose en estos datos el bloqueo de la interacción de estas proteínas con péptidos específicos ha sido considerada una buena candidata para el desarrollo de terapias (88).

Por último, existe otra pareja ligando-receptor que ha demostrado estar implicada en los procesos de activación del LT, es la unión de CD2 a CD58. La inhibición de esta interacción marcadamente afecta al reclutamiento de CD2AP (*CD2 adaptor protein*) y la exclusión de CD45 de la SI. En este contexto también se afecta la movilización de calcio, la localización en el cSMAC de PKC θ y la producción de INF γ , sin afectarse la señalización temprana del TCR ni la reorientación del MTOC. Por lo tanto la interacción de CD2 con su ligando es importante para la correcta organización de proteínas accesorias y/o señalizadoras formando el SMAC. Y la organización es necesaria para poder reforzar la cascada de señalización y no parar la activación del TCR (86).

3.6. Inhibición de la señalización

Está bien aceptado que la célula T necesita de una constante estimulación de la vía del TCR para ser activada completamente (89). En experimentos *in vitro* se ha visto que hay dos maneras de conseguir esta estimulación: formando un contacto estable con la APC (19) o estableciendo interacciones transitorias y secuenciales con diferentes APC (90). Estos datos sugieren la existencia de múltiples factores participando en la duración del contacto, como gradientes de citocinas (91), interacción de integrinas con la matriz extracelular (92), o la inmunogenicidad o la densidad de moléculas co-estimuladoras (93, 94). La internalización descrita de los complejos CD3/TCR (30) podría tener importancia en disminuir la señal del TCR en el primer estadio pero parece menos importante en conseguir la finalización del contacto en fases tardías, cuando los niveles de expresión del TCR se han recuperado (25). Un candidato a jugar un papel importante puede ser CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*). CTLA-4 compete con CD28 por su ligando y cuando se une a él inhibe las señales del TCR a través del reclutamiento de SHP2 (*SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2*), el cual

defosforila CD3 (95). CTLA-4 está ausente en las células T *naive*, pero presente en las T activadas ya que su expresión es promovida por el propio CD28.

En los linfocitos T citotóxicos (CTL) se ha demostrado que cuando finalizan un contacto antígeno específico con la célula diana incorporan proteínas de éstas, como MHC de clase I, y también lípidos (96). El acúmulo de estas proteínas y lípidos es reconocido por los otros CTL y por tanto eliminados. Se ha sugerido que ésto podría ser un mecanismo de auto-regulación para parar la respuesta citotóxica (33, 97).

3.7. Modelos de interacción *in vivo* e *in vitro*

El modelo en que una SI ha de ser estable para corresponder a una respuesta T empezó a cambiar por observaciones de interacciones LT-DC en geles de colágeno de 3 dimensiones (90). En estas observaciones las células T específicas parecían realizar series de interacciones transitorias hasta ser activadas. Este modelo se ha llamado “encuentro seriado” y se ha postulado que la frecuencia de los encuentros pueden ser la clave entre tolerancia o inmunidad. Posteriores observaciones en células en suspensión, sin colágeno, pues éste no se considera un buen modelo para este tipo de estudios (98), mostró que interacciones LT-DC prolongadas eran necesarias pero no suficientes para la producción de IL-2 y que LT que realizaban encuentros seriados también eran capaces de proliferar (99). Otros trabajos observaban que los contactos con DC maduras eran más prolongados y se organizaba mejor una SI que con DC inmaduras (más cortos y una SI más desestructurada) (100). Estas observaciones llevaron a hipotetizar que las DC inmaduras podrían inducir tolerancia.

En resumen, *in vitro* se han observado dos modelos diferentes de activación de los LT, el seriado y el continuo, y el punto de unión podría ser las citocinas, pues se ha observado que ciertas citocinas tienen la capacidad de inhibir interacciones estables a favor de la movilidad (101).

Gracias a técnicas modernas, como el cultivo de órganos o microscopio de dos fotones, se pudo demostrar que *in vivo* las DC antígeno específicas realizaban contactos estables con los LT. Estos contactos a pesar de ser transitorios durante las primeras 2-8 h, posteriormente se estabilizaban hasta las 24 h, cuando empezaban a revertir los contactos hasta unas 36 h en que las células se separaban (102-105). Estas técnicas también permitieron observar que en ausencia de interacción antigénica específica las células T se movían rápidamente y de forma errática por la zona T y que las DC realizaban entre 500 y 5000 contactos con LT por hora (105). Por lo tanto, a pesar de que los LT tengan capacidad de ser activados por contactos seriados con DC *in vitro*, las observaciones *in vivo* apuntan a que es más probable que se produzca un “modelo multifásico”, en el que las células T reciban señales de múltiples contactos cortos antes de formar una interacción estable (101, 106).

3.8. Tipos de sinapsis

Una organización supramolecular de proteínas ha sido observada en contactos formados por varios tipos de células inmunitarias, como células T maduras e inmaduras, Natural Killer (NK), linfocitos B (LB) y DC. Los contactos entre los diferentes tipos de células dan un patrón de organización de las proteínas específicas, sensiblemente diferente. El patrón hasta aquí expuesto corresponde al contacto entre un LT CD4⁺ y una APC que puede ser una DC o una B activada. A continuación se van a remarcar algunas de las diferencias entre los diferentes conjugados:

LT CD4⁺ - DC:

Las DC inmaduras capturan el antígeno en la periferia y migran hacia los órganos linfáticos secundarios. Llegan al área de LT ya maduras, o sea con una alta capacidad de presentación del antígeno debido a su alta expresión de MHC de clase II. Las DC son las únicas células capaces de estimular a los linfocitos T *naive*. Es evidente que el alto grado de expresión de moléculas co-estimuladoras y de adhesión, entre ellas la recientemente descrita DC-SIGN (*DC-Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin*) (107), la capacitan para formar estables acumulaciones de moléculas (*clusters*) con los linfocitos. Además se ha descrito que las DC, a diferencia de las otras APC, polarizan de forma activa su citoesqueleto de actina, lo cual debe también favorecer su alta capacidad de activación de los LT (108). Incluso se ha demostrado la formación de SI entre DC y LT en ausencia de antígeno, sugiriéndose que podría ser un mecanismo para mantener el pool de células T *naive* (109, 110), y que estos conjugados independientes de antígeno son sensibles a la presencia de citocinas, como CXCL12 (111).

LT CD4⁺ efectora - LB:

Una vez las células T CD4⁺ *naive* han sido activas por las DC migran hacia las zonas entre las áreas T y B, donde entran en contacto con los LB cargados con el antígeno (112). El reconocimiento específico por parte del LT del MHC-p en la superficie del LB, promueve la supervivencia, proliferación y diferenciación del LB a célula plasmática (113). La formación entonces de una SI estable depende de la unión de diferentes receptores a sus ligandos, lo que aumenta la fuerza de la hasta el momento débil unión del TCR/MHC-p. Un papel importante lo desarrolla el receptor CD4, el cual reconoce una zona no polimórfica en el MHC de clase II, tanto a nivel de señalización (ver apartado 2. TCR) como estrechando la separación entre las dos células (114). A diferencia con las células T *naive*, que necesitan un contacto con la APC de unas 20 horas, las células T activadas responden mucho más rápido (1 hora) (94). Esto se puede deber a la conservación de una organización sináptica preformada preparada para un futuro encuentro con una APC, haciéndolo más eficiente y corto en el tiempo. En concordancia están los datos observados de una mayor concentración de GM1 y *rafts* (ver apartado 4. Balsas lipídicas, *rafts*) en estas células respecto a las *naive* (115). Un trabajo posterior confirmó

que las células T memoria también organizaban una SI de forma rápida y presentaban una mayor proporción de *rafts*, así como la presencia de TCR y CD45 de forma constitutiva en ellos (116).

CTL efector - Célula diana

Los CTL CD8⁺ efectores juegan un papel importante en la eliminación de células tumorales e infectadas por virus. La interacción de un CTL con su célula diana puede dividirse en tres fases; 1) reconocimiento y contacto, 2) interacción del TCR con el MHC de clase I-péptido específico, 3) inducción de apoptosis de la célula diana vía perforina o Fas-L/Fas. El CD8, al igual que el CD4, también reconoce una zona no polimórfica en la molécula MHC, pero de clase I, y tiene un papel tanto co-estimulador como de adhesión (117). Otras moléculas implicadas en la activación de los LT CD4⁺, como CD28, LFA-1, CD2, etc, también están implicadas en la interacción entre los CTL y la célula diana (114), pero juegan un papel menos crucial. Los gránulos líticos son rápidamente focalizados hacia la SI quedando primero muy cerca del MTOC y posteriormente son guiados, probablemente por MT, a una zona especial en el cSMAC carente de TCRs (97). El contacto entre la CTL y la célula diana se da durante un corto periodo de tiempo y a los 5 min del contacto ya se han liberado los gránulos líticos. La muerte de la célula diana se prolonga durante horas pero su irreversible iniciación sólo requiere unos minutos de contacto entre las dos células (25). Las CTL *naive* interactúan con APCs y entonces son activadas e inducidas a proliferar y convertirse en CTL efectoras. Un trabajo reciente ha observado que a diferencia del contacto entre las CTL efectoras/célula diana, en el contacto entre la CTL *naive*/APC no se desarrolla un SMAC. A pesar de no organizarse un SMAC, sí se ha observado acúmulo de moléculas señalizadoras, polarización del MTOC, producción de IL-2, proliferación y diferenciación a CTL efectoras. Ello sugiere que para la activación de las CTL *naive* no se requiere un SMAC y que una de las funciones del SMAC en las CTL sería dirigir la secreción lítica (118).

NK - Célula diana

Las NK están implicadas en la protección temprana contra infecciones e invasión tumoral, antes del desarrollo de la inmunidad adaptativa. La actividad de las NK citotóxicas no está restringida a la presencia de moléculas de MHC y ocurre en ausencia de sensibilización previa (119). El balance final entre las señales positivas o negativas proporcionadas por los receptores de la NK, da la decisión final sobre la lisis de la célula diana (120). Al igual que lo visto para las otras interacciones, la interacción NK-célula diana también depende de la expresión de moléculas co-estimuladoras y de adhesión. Así el hecho que los ratones LFA-1^{-/-} no pueden formar conjugados con las NK ha demostrado que LFA-1 es muy importante en este tipo de interacción (121). Se ha de tener en cuenta que existen diferentes subtipos de NK con diferente patrón de expresión de moléculas de adhesión y esto puede contribuir a las diferentes propiedades funcionales observadas para los diferentes subtipos de células NK (122).

Timocito - Células estromales del tÍmo (CST)

Las dificultades de reproducir *ex vivo* las condiciones necesarias para la supervivencia de los timocitos han dificultado su estudio, incluido el de la organización supramolecular que se da en el contacto entre el timocito con la CST. Un trabajo donde se utiliza un sistema de bicapa lipídica con proteínas MHC e ICAM-1 fluorescentes determinó que los timocitos inmaduros doble positivos (DP) forman una sinapsis descentralizada con múltiples focos de acumulación de MHC con exclusión de ICAM-1. Estos parches proteicos eran móviles y correlacionaban con actividad y señalización continuada (123). Otro trabajo utilizando lóbulos tímicos fetales de ratón y técnicas de imagen, pudo describir que la selección negativa se corresponde con una eficiente formación de los conjugados con un rápido reclutamiento de Lck (124). Ya había sido sugerido que la selección positiva y negativa podían diferir en la duración y fuerza de la interacción entre el timocito y la CST (125). De acuerdo con este modelo la selección negativa sería más fuerte pero más corta y la selección positiva más débil pero más prologada.(124).

4. BALSAS LIPÍDICAS (RAFTS)

En la membrana plasmática de la células existen unos microdominios ricos en esfingolípidos y colesterol denominados *rafts*, aunque también han sido denominados GEMs (dominios de membrana ricos en esfingolípidos), DIGs (dominios ricos en glicolípidos insolubles en detergentes), o DRMs (membranas resistentes a detergentes) (126, 127) (**Fig. I.10.**). Se ha demostrado que los *rafts* están implicados en la señalización de la célula tanto a través del TCR como de otros receptores (receptores de citocinas e interleucinas, etc.) (128). La cara externa de los dominios lipídicos *rafts* está compuesta por colesterol y esfingolípidos, altamente saturados en sus cadenas acetil, y las fuerzas de atracción entre ellos favorecen la formación de una fase líquida ordenada dentro de la membrana. Así en la membrana se pueden diferenciar dos zonas o fases, una ordenada que son los *rafts* y una desordenada que son las zonas denominadas *no-rafts*, formada por esfingolípidos con cadenas acetil insaturadas (129). La co-localización de Lck y LAT con el glicoesfingolípidos GM1, residente en *rafts*, (130) sugería la existencia de *rafts* en la cara interna de la membrana citoplasmática. Ésta es una zona pobre en esfingolípidos pero su alta composición en fosfolípidos de cadena saturada sugiere que es posible la formación de *rafts* (131). Recientemente se ha descrito que el colesterol es el elemento que mantiene unidas las dos caras de los *rafts*, la externa rica en esfingolípidos, y la interna, pobre (132).

La capacidad de los *rafts* lipídicos de segregar receptores proteicos permite crear compartimentos en la membrana plasmática donde se acumulan las diferentes proteínas implicadas en la señalización y de los que se excluye a otras. A pesar de los esfuerzos realizados la composición exacta de los *rafts* aún no ha sido determinada, información que sería esencial para comprender tanto su funcionamiento como su función en la célula (133).

Las proteínas localizadas en los *rafts* pueden ser tanto extracelulares, como intracelulares o de transmembrana. Las proteínas extracelulares residentes en *rafts* están asociadas a glicofosfatidil inositoles (GPI) (134) y las proteínas intracelulares y transmembrana incluidas en los *rafts* están modificadas con unión a ácidos grasos acetilados (135).

Se ha estimado que los *rafts* representan el 40% de la membrana de las células del sistema inmune (136). En las células en reposo los *rafts* aparecen como estructuras submicroscópicas muy dinámicas, que contienen un alto número de lípidos y menos proteínas. Estas estructuras son denominadas *rafts elementales* (127, 137, 138). Tras la activación de las células T, los microdominios lipídicos aumentan de tamaño hasta 100 nm de diámetro, dando estructuras más estables y frecuentemente unidas al citoesqueleto. Estos *rafts* son denominados *rafts agrupados* (*clustered*) (130, 139).

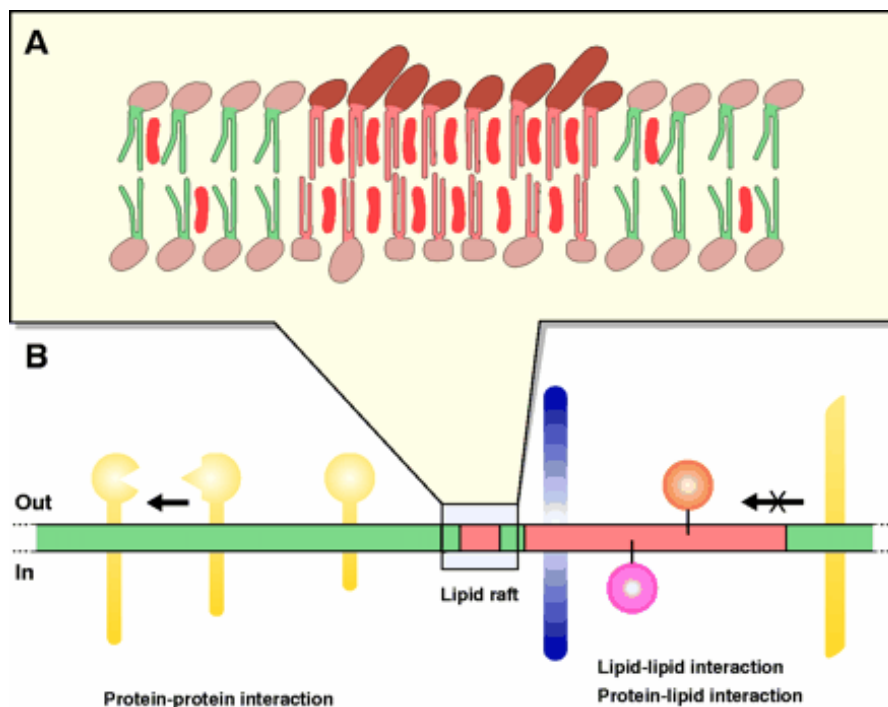


Figura I.10. Modelo de la estructura de los rafts lipídicos y su función en las membranas biológicas. A, Los rafts son microdominios de la membrana formados por altas concentraciones de esfingolípidos (marrón oscuro) y colesterol (rojo) inmersas en un ambiente rico en fosfolípidos (marrón claro). Los glicolípidos y esfingolípidos son restringidos a la cara externa de la bicapa, mientras el colesterol y los fosfolípidos están en las dos caras. Los lípidos de los rafts suelen tener cadenas largas acetiladas y saturadas (rojo) mientras que los lípidos excluidos de los raft tienen cadenas cortas e insaturadas (verde) B, Principios del reclutamiento selectivo de las proteínas en rafts. El reclutamiento de proteínas de membrana en la zona rica en fosfolípidos se produce por interacciones proteína-proteína. Este proceso en rafts se produce por interacciones de los lípidos de los rafts con los dominios transmembrana de las proteínas integrales (interacción lípido-proteína) o con las modificaciones lipídicas de las proteínas (interacción lípido-lípido). El reclutamiento de las proteínas del citosol por interacciones proteína-proteína a través de dominios tipo SH2, SH3 etc. se puede producir tanto en las zonas rafts como no-rafts. Las proteínas excluidas de los rafts se muestran en amarillo, las incluidas en azul (proteínas transmembrana), las proteínas ancladas a GPI en naranja y en rosa proteínas citosólicas acetiladas (como Src, Ras). *Alonso et al, 2001, J. of cell Science, 114: 3957.*

La presencia de *rafts* ha sido descrita como necesaria para una correcta activación de la célula T ya que en experimentos en los que se extrae el colesterol de la célula, básico para la composición de los *rafts*, se produce una inhibición de la movilización de Ca^{2+} (140).

Durante la formación de la SI se produce una redistribución de las proteínas en la célula en la estructura denominada SMAC y una concentración de *rafts* en la zona de contacto entre las dos células (141). Se ha demostrado que el TCR reside en muy baja proporción en *rafts* en células en reposo (142), pero cuando se produce la unión del TCR con el complejo MHC-p para el que es específico se produce un aumento de su presencia en ellos (143). Incluso se ha descrito que en las células T memoria, los TCR están en *rafts* de forma constitutiva (116). Todos estos datos sugieren que un elemento organizador importante del complejo supramolecular de señalización, son los *rafts*. En este sentido se ha demostrado que la activación del co-receptor CD28 induce la co-localización del TCR con los *rafts* en la SI y produce un aumento de la concentración de *rafts* en la célula (81). CD28 no está de forma constitutiva en *rafts* pero tras la activación de la célula T se segrega a ellos y es entonces cuando es fosforilado. Esto indica que su segregación a *rafts* es muy importante para su función y por lo tanto para la correcta activación de la célula (144). Otras proteínas señalizadoras implicadas en las primeras fases de señalización del TCR, como Lck, Fyn (145), LAT (146), PAG (*phosphoprotein associated with glycoesphingolipids-enriched domains*) (147) o Cbp (*Csk-binding protein*) (148) residen constitutivamente en *rafts* y se ha demostrado que su segregación a *rafts* es también muy importante para su función.

La simple presencia del TCR en *rafts*, donde puede encontrar las moléculas señalizadoras, no es suficiente para inducir su vía de señalización. Está clara que la composición de los *rafts* cambia tras la activación del TCR, pues muchas proteínas señalizadoras requieren de esta activación para ser reclutadas, como ZAP-70, Vav, $\text{PLC}\gamma 1$ y $\text{PKC}\theta$ (143, 149). Por el contrario experimentos con células deplecionadas de colesterol han demostrado que la señalización inducida con AcMo anti-CD3, al menos en las fases iniciales, es independiente de *rafts*, pero los estímulos fisiológicos requieren de la presencia de *rafts* desde las fases iniciales.

El conjunto de datos aquí expuestos indican que el reclutamiento de moléculas co-estimuladoras en *rafts* es muy importante durante la activación de la célula T (150). Así los *rafts* lipídicos parecen ser más importantes en mantener y modular, más que iniciar, la cascada de señalización del TCR facilitando interacciones entre ciertas proteínas y previniendo otras (151). Ha sido también descrito que el complejo MHC de clase II-p específico se concentra en *rafts* y que esta concentración debe ser importante para la activación de la APC, pues el tratamiento con M β CD (*methyl- β -cyclodextrin*), capaz de depleccionar el colesterol de la célula, inhibe la activación de ésta (152, 153).

Durante la polarización y quimiotaxis de las células T, se produce una reorganización de los *rafts*. Entonces se pueden diferenciar dos subtipo de *rafts*, L-*rafts* (*leading rafts*), enriquecidos en el glicoesfingolípido GM3 y receptores de citocinas y situado en la parte frontal de la célula, y U-*rafts* (*uropod rafts*), enriquecidos en GM1 y moléculas de adhesión y localizado en la parte

posterior de la célula (154). Esta diferente segregación de *rafts* ocurre durante la quimiotaxis inducida por citocinas y depende de la integridad del citoesqueleto de actina (155). El bloqueo de la segregación a los L-*rafts* de los receptores de citocinas inhibe la polarización y migración de la célula. Así los *rafts* también están implicados en la distribución de los receptores y la señalización en las células en migración.

Actualmente se cree que en las células en reposo los *rafts* se están constantemente formando y disolviendo y las proteínas residen en ellos de forma transitoria, pero con la activación de la célula se induce su estabilización generando grandes microdominios lipídicos enriquecidos de proteínas señalizadoras específicas (151).

5. CD5 Y CD6 COMO MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS

Tradicionalmente se han considerado moléculas con función co-estimuladora aquellas con capacidad de aumentar la señalización del TCR. El prototipo de molécula co-estimuladora es CD28. Numerosos estudios han descrito que su activación, ya sea con AcMo o por la unión a su ligando B7, es capaz de potenciar la proliferación y la secreción de IL-2 inducida por la activación del TCR en las células T CD4⁺ (84, 156, 157). Recientemente se ha observado que estas moléculas se acumulan junto al TCR y el MHC formando el denominado SMAC y que proporcionan la segunda señal, o señal co-estimuladora, que es necesaria para la correcta activación de la célula T.

Las moléculas CD5 y CD6 tienen capacidad de aumentar los estímulos proliferativos inducidos por el TCR (158-161), y por tanto han sido consideradas moléculas con función co-estimuladora. La presencia de CD5 en la SI ha sido recientemente reportada y descrita con función inhibitoria sobre las señales enviadas por el TCR (162). Pero la presencia de CD6 y su implicación en la 2ª señal todavía no ha sido estudiada. Estos receptores tienen una alta homología tanto en su estructura como en su patrón de expresión. Ambas son glicoproteínas de membrana tipo I expresadas en linfocitos T maduros, timocitos medulares, un subtipo de células B llamado B1a y en leucemia linfática crónica (LLC-B) (163-166). Además CD6 también se expresa en tejido cerebral como la glía basal y el córtex cerebeloso (167). Se ha de destacar que un interesante trabajo utilizando técnicas de alta sensibilidad, describe la presencia de CD5 en todas las células B humanas, aunque a muy bajas dosis, e independientemente del linaje. También demuestra que todas tienen niveles de mRNA parecidos (168). Estos hallazgos están en concordancia con datos anteriores en los que se describía la presencia de bajos niveles de CD5 en todas las células B murinas (169, 170). Es importante destacar que la subpoblación B1a es la responsable de la producción de auto-anticuerpos polireactivos (171) y está expandida en enfermedades autoinmunes (172-174) y procesos linfoproliferativos, como la LLC-B, los linfomas del manto y la tricoleucemia (175).

La zona extracelular de ambas proteínas es altamente homóloga y está compuesta por tres dominios cuyas características las incluyen dentro del grupo B de la SF de los Receptores con dominios Ricos en Cisteínas tipo Scavenger (*Scavenger Receptors Cystein Rich, SRCR*) (176-178). Sus respectivos genes están situados de forma contigua en el cromosoma 11 humano (179, 180). Estos datos surgieron la hipótesis de que ambos pueden haberse originado por la duplicación de un gen ancestral común (179) y en consecuencia, podrían tener funciones similares o interrelacionadas. Es importante destacar que la marcada diferencia encontrada entre sus respectivas regiones citoplasmáticas (en comparación con la alta homología de sus zonas extracelulares) sugiere vías de señalización bastante diferentes (**Fig. I.11**), pero no por ello se descarta una posible función coordinada.

Por todo lo aquí expuesto se deduce que el estudio del receptor linfocitario CD6 se inicia en el conocimiento del miembro de su familia más cercano, CD5, pues éste ha sido tradicionalmente más estudiado y estos conocimientos pueden ayudar a avanzar en la investigación sobre CD6.

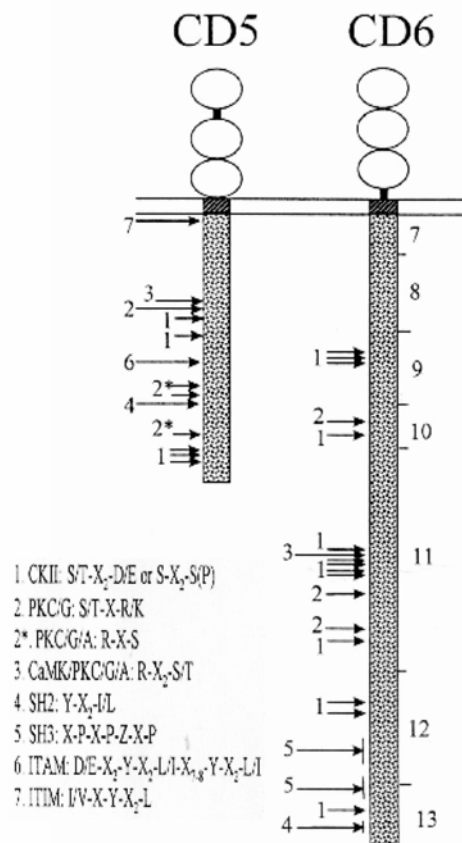


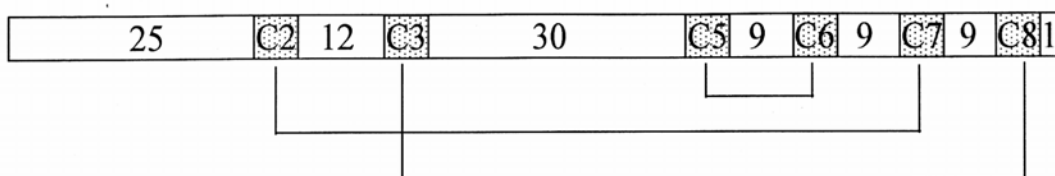
Figura I.11. Esquema de la estructura de CD5 y CD6 y las secuencias que cumplen el consenso de unión con proteínas señalizadoras. Como se puede observar ambos receptores poseen tres dominios extracelulares tipo SRCR y una región peptídica separadora (que en el caso de CD5 se sitúa entre el dominio SRCR1 y el SRCR2 y en CD6 entre el dominio SRCR3 y la región transmembrana). La región citoplasmática de CD6 es mucho más larga que la de CD5. Ambas tienen sitios de unión a CKII, PKC, CaMK y dominios SH2. CD5 también presenta un ITIM-like y un ITAM-like que no están presentes en la región citoplasmática de CD6. Este por el contrario tiene sitios de unión a proteínas con dominios SH3. *Vilà et al., 2000, Immunología, 19: 105.*

5.1. SUPERFAMILIA DE RECEPTORES CON DOMINIOS RICOS EN CISTEINA TIPO *SCAVENGER*

La SF-SRCR es una ancestral familia de proteínas altamente conservadas con representantes en la mayoría de especies (181). Incluye proteínas leucocitarias, tanto de membrana como secretadas, involucradas en el desarrollo de las células del sistema inmune y en la regulación de las respuestas inmunitarias innatas o específicas (178). Los miembros de esta familia tienen uno o más dominios ricos en cisteínas de 110 aminoácidos (aa) de longitud, llamado SRCR. Este dominio fue por primera vez descrito en la zona amino-terminal de receptor *Scavenger* de los macrófagos tipo I (SR-AI) (182). Es por ello importante diferenciar entre los miembros de la SF-SRCR y los llamados “receptores *Scavenger*”, definidos por su capacidad de unión a lipoproteínas de baja densidad modificadas (LDL acetilada o oxidada), y por tanto implicadas en los procesos de arteriosclerosis (183). Algunos de estos receptores *Scavenger* poseen a su vez dominios SRCR y por ello están incluidos dentro de esta SF (e.g. MARCO SR-AI), por el contrario otros receptores *Scavenger* no poseen estos dominios (e.g. SR-AII, CD36) y por lo tanto son excluidos de la SF-SRCR.

La SF-SRCR está compuesta por más de 25 miembros organizados en 2 grupos, A o B, según sus dominios SRCR tengan 6 u 8 cisteínas y estén codificados por 2 o 1 exones, respectivamente (181). La posición de las cisteínas en los dominios SRCR está bien conservada y permite la creación de puentes disulfuro entre ellas. Estos puentes han resultado ser muy importantes para su estructura, como ha demostrado la estructura cristalográfica de Mac2BP, el único SRCR cristalizado, y que pertenece al grupo A (184) (**Fig. I.12.**).

Grupo A



Grupo B

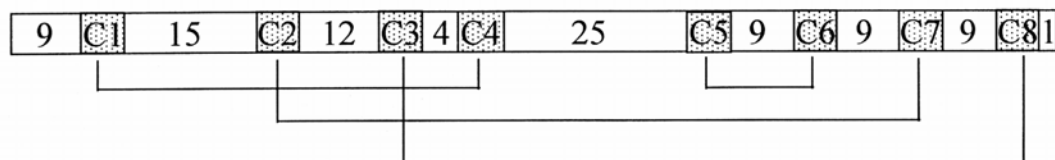


Figura I.12. Esquema de la estructura de los dominios SRCR. Los dominios SRCR del grupo A contienen 6 cisteínas que realizan puentes disulfuro entre ellas siguiendo el patrón aquí mostrado. Los dominios SRCR del grupo B tienen 8 cisteínas con el patrón de puentes disulfuro mostrado. El puente disulfuro entre la C1 y C4 es característico del grupo B. Vilà, et al., 2000, *Inmunología*, 19:105.

La función de los dominios SRCR no ha sido descrita aún, a pesar de estar altamente conservada su estructura entre las diferentes especies. Miembros de esta SF han sido implicados en el desarrollo del sistema inmune y la regulación tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa, aunque la función exacta de muchos de ellos aún no es conocida. Así a pesar de que todos los miembros de la SF comparten estos similares dominios estructurales en sus zonas extracelular no existe ni una función ni un ligando común para todos ellos

5.2. CD5

5.2.1. Descripción y estructura

CD5 es una glicoproteína de 67 kDa, que al igual que CD6, pertenece al grupo B de la SF-SRCR (177, 178). También se conoce con los nombres de T1, Leu-1 o Tp67 en humanos (185) y Ly-1 en ratones, aunque se ha clonado en otras especies animales tanto de mamíferos como anfibios (186, 187).

Su zona extracelular, compuesta por tres dominios SRCR, tiene 350 aa y está seguida de una región transmembrana de 27 aa. Su región citoplasmática consta de 94 aa, está altamente conservada entre las diferentes especies (188, 189) y posee motivos de fosforilación en tirosina (Tyr) y serinas (Ser)/treoninas (Thr) compatible con una función en la transducción de señales (188, 189).

De los tres dominios SRCR de CD5, denominados SRCR1, SRCR2 y SRCR3, el SRCR1 y el SRCR3 cumplen perfectamente el consenso de estructura aceptado para el grupo B (178, 181). El SRCR2 es un dominio atípico ya que solo posee 6 cisteínas (C) que realizan tres puentes disulfuro, manteniendo el puente entre C1-C4 que es característico del grupo B y está ausente en el grupo A (177, 181). Como se ha mencionado CD5 es una proteína altamente glicosilada tanto en N, localizada en los dominios SRCR1 y SRCR2, como en O, localizada en la región rica en prolinas y Thr denominada separadora y que se sitúa entre el SRCR1 y SRCR2 dando rigidez a esta zona (190, 191).

5.2.2. Regulación transcripcional

El gen de CD5 no posee caja TATA (marca de inicio de transcripción), así que para detectar posibles secuencias reguladoras de su transcripción se realizaron experimentos en los que construcciones conteniendo secuencias a 5' del gen de CD5 se introducían en esplenocitos murinos. Estos experimentos detectaron un fragmento de 122 pares de bases (pb), situado de -2040 a -1919 pb del sitio 5' de inicio de la transcripción de CD5, que era suficiente para conferir inducibilidad sobre la región promotora proximal cuando las células eran activadas con anticuerpos anti-IgM. Este sitio resultó ser dependiente de NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) (192). Un sitio idéntico ha sido detectado en el gen humano localizado a -9,5 kb (193).

Estudios en ratón situaron la región promotora de CD5 a -215 pb y en concreto determinaron un fragmento de 43 pb que incluía sitios de unión para el factor de transcripción (FT) Ets (194). El gen de CD5 humano presenta una zona en esa misma localización con alta homología a la del ratón (80%) y también incluye sitios potenciales de unión al FT Ets y también cajas E (E-boxes) (195). De acuerdo con esto se ha visto que los ratones *knock-out* para Ets-1 tienen niveles muy reducidos de CD5 (196, 197). También se ha de destacar que ratones deficientes para algún miembro de la familia hélice-loop-hélice, que se unen a las cajas-E, presenta reducida la expresión de CD5 y CD4 (198). Un trabajo reciente demuestra que existen dos sitios activos de unión al FT Ets en esta zona y se sugiere una posible contribución de otros sitios consenso como Sp1, c-Myb y AP-1-like en la regulación de CD5 en células T (199). Así Ets, junto con otros FT, está implicado en la expresión tejido específica de CD5.

5.2.3. Estructura génica

El gen del CD5 humano está localizado en Cr11q12.2 (200). Ocupa 24,5 kb y contiene 11 exones. A 82 kb a partir del 3' se localiza el gen del CD6, en una disposición cabeza-cola, idéntica a la encontrada en la estructura génica del ratón (179). Esto junto con la elevada similitud existente entre ambas moléculas plantea la hipótesis de un posible origen en la duplicación de un gen ancestral común.

Existe una buena correlación entre la organización exónica y los dominios estructurales de CD5, de forma que el exón 1 y 2 codifican para el péptido señal, los exones 3, 5 y 6 para cada uno de los tres dominios SRCR, el exón 4 es el que codifica para el péptido espaciador, la zona transmembrana está codificada por el exón 7 y la intracelular por los exones 8, 9 y 10. El exón 11 es el más largo y contiene dos señales de poliadenilación que podría explicar la identificación de dos especies de mRNA de CD5 (de 2.7 y 3.8 kb) (189, 200).

Se ha identificado por RT-PCR una isoforma de CD5 que carece de región citoplasmática aunque tiene zona transmembrana y de la cual se desconoce la función (200).

5.2.4. Expresión

Como ya se ha mencionado CD5 está expresado en células T maduras, teniendo niveles más altos las CD4⁺ que las CD8⁺ o la T $\gamma\delta$ (201). Los niveles de CD5 de las células aumentan tras ser estimuladas con esteroides de forbol (PMA, *phorbol 12-myristate 13-acetate*), AcMo anti-CD3, o Concanavalin A de forma dependiente de la activación de PKC, ya que ciclosporina-A y staurosporine lo inhiben (202, 203). Se ha reportado en sangre periférica de individuos sanos la presencia de una pequeña población de células T CD5⁻ que es capaz de producir IL-2 y mediar citólisis. Esta población se ha visto que aumenta tras el trasplante de médula ósea y se correlaciona con la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH) y con el tiempo post-trasplante (117).

La expresión de CD5 en timocitos aumenta a medida que maduran, en paralelo con la expresión de CD3 (204, 205). Se ha descrito que los timocitos DP responden a la unión del TCR con un aumento de sus niveles de CD5 (206). Un experimento *in vitro* sugirió que podría ser una respuesta a ligandos extracelulares, ya que células de linfoma murinas CD4⁺ CD8⁺ respondían a AcMo anti-CD3, Concanavalin A o ésteres de forbol más ionomicina con un marcado aumento de la expresión de CD5 (207). Un importante trabajo en ratones Rag^{-/-} muestra como timocitos dobles negativos (DN), a pesar de la no expresión del receptor antigénico (TCR), expresaban CD5, aunque a niveles bajos. Esta expresión parece depender de la estimulación vía CD3, normalmente expresado en estos ratones Rag^{-/-}, pues el tratamiento con diferentes AcMo anti-CD3 resultó en un aumento proporcional en la expresión de CD5 y progresión de los timocitos a DP (208). El trabajo confirmó que la expresión de CD5 está regulada por los niveles del complejo CD3/TCR, la avidéz de la unión a sus ligandos y la fuerza de las señales transducidas. Los niveles de CD5 en las células T periféricas son menores que la de los SP y se ha sugerido que es debido a la ausencia de los contactos con los antígenos específicos presentados en el timo (209). Además los niveles bajos de CD5 en las células T se asocian a hipersensibilidad del TCR (209, 210). Por el contrario los niveles altos de CD5 en los timocitos son mantenidos por la exposición crónica a antígenos específicos y esto se han relacionado con tolerancia, aunque la intervención directa de CD5 en la inducción de tolerancia no ha sido demostrada (211, 212).

La ligación del receptor de las células B (BCR) en esplenocitos B-2 murinos con AcMo anti-IgM induce la expresión de CD5. Por el contrario esta inducción no se observa en la estimulación con LPS (lipopolisacáridos), células T colaboradoras o la unión de CD40. De hecho la unión de CD40 o el tratamiento con IL-4 disminuye el aumento de expresión de CD5 inducido por AcMo anti-IgM (213, 214). La inducción de CD5 promovida por la ligación de BCR se debe a un aumento de su transcripción, como ha demostrado su sensibilidad a actinomicina D y que se correlacione con acúmulos de mRNA de CD5 (215). También se ha demostrado que es un mecanismo dependiente de NFAT. En concordancia con ello está el hecho de que NFAT se encuentra constitutivamente activo en las células B1a y estudios con ratones *nock-out* para NFATc1 han puesto de manifiesto que este FT es crucial par la supervivencia de las células B1a (192).

La reducción de la expresión de CD5 en la superficie de los LT se ha observado en infecciones víricas por Epstein-Barr (168) o virus de la familia Herpes (216), quizá como un mecanismo del virus de escapar a la apoptosis. También se ha descrito la escisión proteolítica de la superficie de la célula (191) que genera una forma soluble de CD5, cuyos niveles están aumentados en procesos autoinmunes. La internalización en vesículas de endocitosis de CD5 también es un mecanismo de regulación de la expresión de esta proteína. Así se ha demostrado en que la zona más próxima a la membrana de CD5 hay dos Thr capaces de regular la internalización de CD5 a través de mecanismos dependientes de fosforilación vía PKC (217), así como se ha propuesto que la internalización de CD5 también podría estar mediada por vesículas de clatrina a través de su asociación a AP2 (218).

5.2.5. Función

A pesar de ser uno de los primeros antígenos de diferenciación descritos para los linfocitos, la función última de CD5 aún no se conoce. Está ampliamente aceptado que CD5 está implicado en la modulación de la activación y diferenciación de los linfocitos T y B, pero CD5 da diferentes señales dependiendo del tipo celular analizado y su estado madurativo.

Se ha demostrado que en linfocitos T maduros AcMo anti-CD5 son mitogénicos en presencia de monocitos (219, 220), dosis subóptimas de ésteres de forbol (221), o entrecruzamiento simultáneo con AcMo anti-CD3 (158, 159) o anti-CD28 (222). Pero la incorporación de nuevas tecnologías ha permitido observar que CD5 da señales negativas durante la formación de la SI (162) e incluso se han observado fenómenos de hiperrespuesta en células T maduras deficientes de CD5 (223). En células B tratadas con AcMo anti-IgM más IL-2 también se ha descrito que CD5 da señales co-estimuladoras (224).

El hecho de que se haya demostrado la asociación física de CD5 al receptor antigénico de las células T (225-227) y B (228), así como a otros receptores co-estimuladores de la superficie celular (227, 229, 230), da una base física para la capacidad de CD5 de modular directamente las señales del TCR y del BCR e influir sobre la señalización de otros receptores.

El estudio con ratones knock-out CD5^{-/-} ha permitido observar los efectos de la deficiencia de CD5 en timocitos y células B. En un primer estudio se observó que la población linfocitaria de estos ratones era normal, comparada con la de los ratones salvajes, y capaz de realizar respuestas inmunitarias contra antígenos dependientes e independientes de células (169). Por tanto parecía como si CD5 no fuera necesario para la activación de la respuesta inmune. Posteriormente se observó que los timocitos de estos ratones producían una respuesta exagerada a la estimulación vía CD3/TCR, mostrando un aumento en la proliferación, movilización de calcio e hiperfosforilación en Tyr de diferentes proteínas (Vav, p36/LAT, TCR ζ , etc.) (231). Estos ratones también mostraron una selección anormal de timocitos que expresaban distintos TCR transgénicos (223, 231). De alguna manera la expresión de CD5 influía en la selección de TCR individuales según sus diferentes avideces por los ligandos. Un trabajo posterior confirmó que los niveles de CD5 durante el desarrollo tímico eran proporcionales a la avidez del TCR, y a su vez los niveles de expresión de CD5 en las células T maduras eran un reflejo de ello (232). Sorprendentemente un trabajo reciente describe que el efecto inhibitorio sobre las señales del TCR por CD5 durante la diferenciación tímica es independiente de la unión a un posible ligando en el estroma tímico (233). También se ha implicado CD5 en la selección negativa del linaje CD4⁺ (223, 234). Hay que tener en cuenta que existen otras moléculas en la superficie de los timocitos capaces de influir en su proceso de maduración y diferenciación, entre las que se ha implicado CD6 (235-238).

En células B1a de ratones CD5^{-/-} el entrecruzamiento de IgM de membrana indujo un aumento en la movilización de Ca²⁺, resistencia a la apoptosis y entrada en el ciclo celular en comparación con las células B1a normales (170, 239). Un trabajo reciente, en el que se

describe la expresión de CD5, aunque a dosis bajas, en todas las células B, propone que CD5 podría ser un antígeno de activación y su elevada expresión en las células B1a podría deberse al constante estado de activación de las células (168).

En conjunto, todos estos estudios indicaban que las señales mediadas por el complejo CD3/TCR y el BCR son reguladas de forma negativa por CD5 en timocitos y células B1a, muy probablemente influenciando los procesos de selección y maduración. El hecho de que esta regulación negativa no se produzca en ausencia de su región citoplasmática (223, 232), sugiere que dicho efecto depende de las interacciones intracelulares mediadas por CD5. Incluso un trabajo en el que timocitos CD5^{-/-} eran reconstituidos con una quimera formada por la región citoplasmática de CD5 unida al dominio extracelular del receptor de la IL-2 indicó que la región extracelular de CD5 es totalmente prescindible para la regulación negativa de las señales del TCR, descartándose así la implicación de la unión de CD5 a un ligando en este proceso (233). Por el contrario parece que la función de CD5 en células T periféricas sí depende de la interacción con su ligando y se ha descrito la capacidad de CD5 de dar señales de supervivencia en células T activadas (240, 241).

Por otro lado se ha identificado la presencia en suero humano de una forma natural soluble de CD5 (nsCD5), que se libera de la superficie de la célula por proteólisis (191). Los niveles de nsCD5 en individuos sanos son bajos pero se ha descrito que en enfermos de artritis reumatoide, síndrome de Sjögren y dermatitis atópica están aumentados (242-244). Por el contrario en pacientes de LLC-B, los niveles de nsCD5 son similares a los sanos (191). La función de esta proteína nsCD5 no es conocida pero podría actuar como competidor a distancia en la unión del CD5 de la superficie del linfocito a su ligando o generarse por rotura proteolítica como mecanismo de disminución de la señalización intracelular activada por CD5. En este sentido, un trabajo reciente describe la capacidad de una proteína quimérica de CD5 (CD5-Fc) de inhibir el desarrollo de una encefalitis autoinmune experimental en ratones (241). Este trabajo propone que el CD5 soluble tendría la capacidad de eliminar las células T activadas a través del bloqueo de la interacción CD5/ligando. Por lo tanto la eliminación selectiva de las células T activadas utilizando CD5 como diana abre una nueva posibilidad en el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias.

5.2.6. Vía de señalización

La vía de señalización de CD5 (**Fig. I.13.**) está empezando a ser entendida pero las bases moleculares de su capacidad de modular las señales del TCR y del BCR aún han de ser definidas. Una consecuencia temprana de la ligación del TCR es la rápida pero transitoria activación de tirosin cinasas, provocando fosforilación de numerosos sustratos, entre los que se encuentra el dominio intracelular de CD5 (245, 246). Es importante destacar que el patrón de fosforilación que provoca la ligación de CD5 es muy similar al descrito para el TCR (246, 247). El dominio citoplásmico de CD5 no tiene actividad catalítica intrínseca pero sí contiene sitios potenciales de fosforilación así como secuencias consenso para la unión de proteínas

señalizadoras (248-253). De sus cuatro Tyr potencialmente fosforilables (378, 429, 441 y 463), las Tyr 429 y 441 están incluidas dentro de un motivo doble de Tyr similar al motivo ITAM típico de las moléculas accesorias que se asocian al TCR. Estos ITAMs son susceptibles de ser fosforilados por miembros de la familia *Src*, y entonces sirven como sitio de unión para SH2, siendo los miembros más característicos Syk y ZAP-70. Estudios de inmunoprecipitación de CD5 en timocitos estimulados con pervanadato y estudios con péptidos de CD5 fosforilados demostraron que CD5 se asociaba con ZAP-70 fosforilado en Tyr (252), la subunidad monofosforilada de ζ (p21) (250), la subunidad p85 α de foinositol 3-cinasa (PI3K) (252), p95^{vav} (252), y *ras-GTPasa activating protein* (*ras-GAP*) (253). Se ha de destacar que el hecho de que ZAP-70 solo se asocie a CD5 cuando éste está unido a la cadena ζ del TCR, indica que el ITAM de CD5 no se comporta como un ITAM clásico.(251). También la asociación directa de CD5 con p56^{lck}, pero no p59^{fyn}, pudo ser demostrada por co-inmunoprecipitación (250).

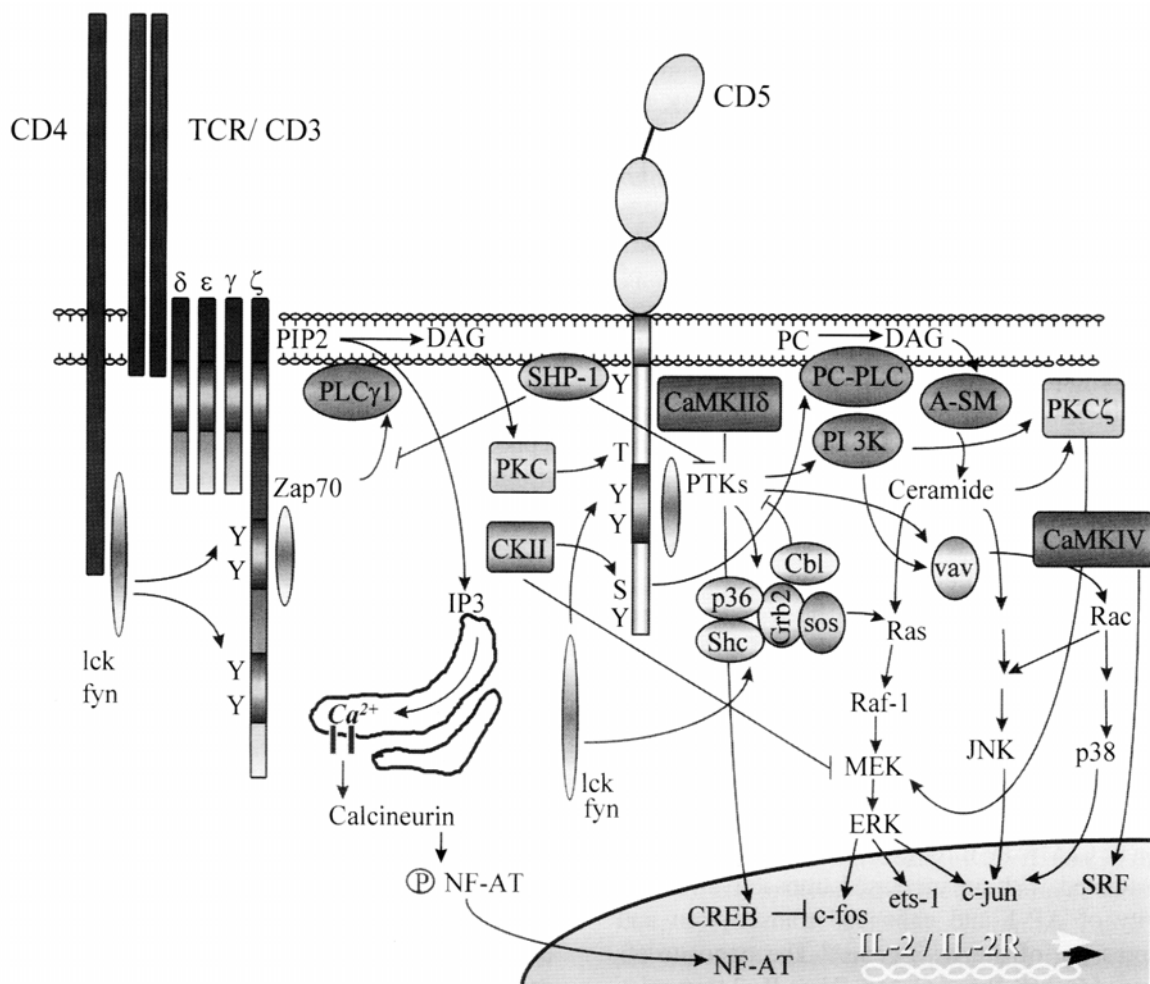


Figura I.13. Esquema de la vía de señalización activada por CD5. Lozano, et al, 2000, *Critical reviews in Immunology*, 20: 347-358.

En concordancia con el papel inhibitorio de las señales mediadas por el TCR en timocitos se ha descrito la unión de CD5 a la fosfatasa SHP-1 (*SH2 containing tyrosine phosphatase 1*) en timocitos murinos (254), células Jurkat y linfoblastos T expandidos con PHA (*phitohaemagglutinin*) y células B1a de ratón (255). El residuo de CD5 implicado en la interacción es la Y378, la cual está incluida en un motivo similar a los motivos ITIM (*Imunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*).(256). Pero la implicación de esta proteína en los efectos inhibitorios de CD5 está en entredicho. Un trabajo reciente muestra que para una óptima activación de SHP-1, sus dos dominios SH2 han de estar unidos a 2 Tyr fosforiladas (257), cosa que no pasa en su unión a CD5. También se ha descrito que células mutantes en la región citoplasmática de CD5, que excluyen la Y378, son hipersensibles al estímulo vía TCR, (223) y que esta Tyr, pero no las Tyr incluidas dentro del motivo ITAM-like (Y429, Y441), es prescindible para la inhibición de las señales del BCR por CD5 (258).

Otra molécula señalizadora asociada a CD5, llamada c-Cbl (253), es una proteína adaptadora que tiene la capacidad de regular negativamente las señales del TCR. Timocitos provenientes de ratones deficientes en c-Cbl muestran un aumento de la fosforilación en Tyr inducida por el TCR en múltiples sustratos como, ZAP-70, p36-38/LAT y SLP-76 así como una aumentada activación de la cinasa activadora de proteínas mitogénicas (MAPK) (259, 260). c-Cbl-1 se asocia con una cinasa inhibidora de Syk y ZAP-70 (261, 262). Así el reclutamiento de c-Cbl-1 podría también contribuir a la supresión de las señales del TCR y el BCR vía CD5.

El dominio citoplasmático de CD5 también contiene cuatro Thr y siete Ser, algunas de las cuales están incluidas en secuencias potencialmente fosforilables por serín/treonín cinasas intracelulares como CKII y PKC. En las células en reposo CD5 está constitutivamente fosforilado en Ser (263) y se hiperfosforila post-tratamiento con esteres de forbol (264) o post-ligación con AcMo anti-CD5 o -CD3 (247, 264). Esta hiperfosforilación fue descrita por primera vez como una actividad serín/treonín cinasa no-caracterizable asociada a CD5 (264).

Por técnica de doble híbrido se describió la asociación de la subunidad reguladora β de CKII (*casein kinase II*) a la zona C-terminal de la región citoplasmática de CD5 (248, 249). Esta asociación es responsable de la fosforilación constitutiva de CD5 en las serinas S458, S459, S461 y resultó ser crítica para la generación de segundos mensajeros lipídicos (diacilglicerol y ceramidas) iniciada por el ligamiento de CD5 (248). De forma interesante, la activación específica de CKII post-ligación con AcMo anti-CD5 se vió en timocitos pero no en esplenocitos (249). Esta diferente regulación de la actividad CKII asociada a CD5 ha sido relacionada con los diferentes efectos observados tras la unión de CD5 en células T maduras e inmaduras. De hecho, ha sido reportado que CKII podría tener un papel positivo en la regulación del ciclo celular (265) pero podría también regular de forma negativa la activación de MEK1 (266) y AP-1 (267).

La región proximal del dominio citoplasmático de CD5 también se ha descrito que se asocia con otra serín/treonín cinasa llamada cinasa II δ dependiente de Ca²⁺/calmodulin (CaMK II δ) (268). Una de las consecuencias de la activación de esta cinasa es la inhibición de la

transcripción de gen de la IL-2 en las células T (269, 270). Y este podría ser uno de los mecanismos señaladores negativos inducidos por CD5. Por el contrario se ha observado que la co-estimulación de linfocitos T activados (células T periféricas purificadas estimuladas con PHA o con AcMo anti-CD3 más AcMo anti-CD28) con AcMo anti-CD5 resulta en la ativación de CaMK IV (271), una cinasa que aumenta la transcripción del gen de la IL-2. Los efectos opuestos entre CaMK II y IV sobre la IL-2 se atribuyen a la inhibición o activación respectivamente de los factores de transcripción CREB y SRF que están implicados en la regulación del promotor c-fos (270).

Trabajos muy tempranos ya mostraban que la unión de CD5 en las células T estimuladas con AcMo anti-CD3 potenciaba el aumento de la concentración del calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), la secreción de IL-2 y la expresión de su receptor (IL-R2) (159, 272, 273). La interpretación de estos resultados fue que CD5 carecía de un vía de señalización independiente de CD3/TCR y por tanto solo capaz de potenciar la activación mediada por CD3 de la PLC- γ 1. Otros trabajos tempranos mostraron que algunos AcMo anti-CD5 inducían fosforilación en Tyr de proteínas y movilización de Ca^{2+} , independiente de la activación de PKC (220). Esto ha sido demostrado que es debido a la producción de DAG, generado tanto por la activación de la fosfolipasa específica de fosfatidilcolina (PC-PLC) como por la síntesis de *novo* (274). Estos datos indican que CD5 es una molécula accesoria con una vía de señalización propia, y sugiere el uso por CD5 de vías similares a las usadas por ciertas citocinas y receptores de superficie (TNFR1, CD95/Apo-1/FasL, CD28, IL-1R) para modular la activación linfocitaria. También se ha demostrado que la vía de señalización de CD5 activa la esfingomielinasa ácida (A-SMase) de forma dependiente a PC-PLC. Esta activación es independiente de los residuos Ser más C-terminales (S459 y S61) que son los que están constitutivamente fosforilados por CKII (275). Este descubrimiento es relevante para el efecto modulador de CD5 sobre la activación linfocitaria ya que las ceramidas (metabolitos de A-SMase) son unos mediadores muy importantes para ciertos procesos celulares como la proliferación y la apoptosis (276).

También se ha visto que CD5 induce la activación de PKC- ζ (275) de forma dependiente de la activación de la vía PC-PLC y/A-SMase. La activación de esta cinasa es muy compleja y se consigue por un delicado balance que afecta a diferentes moduladores entre los que se encuentran las ceramidas (277, 278), PIP3 (279), ácido fosfatídico (280), ácido araquidónico (278) y otros. Debido a su modulación bifuncional por segundos mensajeros lipídicos, se ha sugerido que PKC- ζ actúa como una molécula de cambio entre las señales de mitogénesis y apoptosis (278). Aunque su papel en la activación de las células T todavía está en controversia. Recientemente se ha reportado la implicación de PI3K en la vía de señalización de CD5 lo cual da un posible mecanismo de la activación de PKC- ζ (252) (281). Aunque el sitio consenso para la unión de los dos dominios SH2 de la región p85 reguladora de PI3K no está presente en la región citoplasmática de CD5, péptidos fosforilados en tirosinas de los motivos ITAM-like (Y429 Y441) o de la región C-terminal (Y463) de CD5 sí que se unen de forma eficiente a PI3K (252).

Pero la función última de la asociación de PI3K con CD5 aún no está clara. En las células T esta cinasa se ha visto asociada a CD28 (282) y CTLA-4 (283) las cuales están implicadas en la co-estimulación y represión de las señales del TCR, respectivamente.

Miembros de las MAPK son componentes centrales de las vías de señalización de varios receptores dando señales de proliferación o apoptosis. Se ha reportado que la unión directa de CD5 en células Jurkat resulta en la activación de miembros de la cascada de las MAPKs, en concreto MAPK Kinase (MEK) y JNK (275). MEK pertenece a la cascada de señalización compuesta por la serin/treonin cinasa Raf, MEK y por último ERK. Esta cascada está predominantemente activada por Ras y permite la activación de factores de transcripción y proteínas del ciclo celular relacionadas con el crecimiento. Recientemente se ha reportado que la co-estimulación de CD5 estimula las vías de señalización que llevan a la activación de ERK en timocitos CD4⁺ y CD8⁺, los cuales serán diferenciados a CD4⁺, muy probablemente a través de la inducción de Bcl-2 (284).

Por otro lado la vía de señalización de JNK está influenciada por la familia de las proteínas Rho del grupo de las pequeñas proteínas unidoras de GTP (RhoA, Rac1, Cdc42), y está implicada tanto en la iniciación como en la progresión de la apoptosis. En conjunto estos resultados contrastan por los reportados por Gringhuis et al. (271, 285) el cual basándose en resultados obtenidos con diferentes inhibidores de cinasas observó que CaMK IV pero no las MAP cinasas ERK, JNK, y p38 estaban implicadas en la activación de AP-1 a través de CD5 (271). Todos estos resultados contradictorios deben reflejar el uso de diferentes sistemas celulares, condiciones de estimulación y parámetros de evaluación de la actividad cinasa. De cualquier manera el balance dinámico entre los efectos opuestos atribuidos a las cascadas de señalización de ERK y JNK (286) deben ser de especial relevancia para la vía de CD5 y podrían ser la base de sus diferentes efectos moduladores en la activación y diferenciación de los linfocitos.

5.2.7. Ligandos

La descripción del/os ligando/s de CD5 es todavía un tema de estudio. El primer ligando identificado fue la proteína CD72, tanto humana como de ratón. CD72 es una glicoproteína tipo II de 42 kDa constitutivamente expresada en todas las células de linaje linfocitario B, con la excepción de las células plasmáticas (287, 288). Trabajos posteriores no han podido reproducir estos datos pero describieron la unión de CD5 a una proteína de expresión transitoria en células T y B activadas (gp40-80) (289, 290). También se ha descrito la interacción de CD5 con la zona V_H framework de las Ig de conejo (291) y humanas (292). Esta interacción se ha sugerido que podría estar implicada en los procesos de selección clonal de las células B en los procesos autoinmunes o linfoproliferativos (293). También se ha descrito la interacción del CD5 bovino con una proteína inducible de 200 kDa expresada en células B tras ser activadas (294). Desgraciadamente, estos ligandos de CD5 no explican todos los aspectos sus funcionales. Recientemente ha sido descrito un nuevo ligando ampliamente distribuido, llamado gp150,

expresado en linfocitos y monocitos en reposo, así como varias líneas linfocitarias (T y B), mielomonocíticas y de origen epitelial (295). Esta interacción fue descrita tras analizar las propiedades de unión tanto de formas recombinantes solubles de CD5 como de una forma soluble natural circulante en sangre, liberada por proteólisis de la membrana de los linfocitos tras ser activados (191). Este nuevo ligando recuerda por su patrón de expresión al ligando de CD6, ALCAM (296), y también se halla expresado en el epitelio tímico, y parece interactuar con la zona más N-terminal de CD5 (D1-D2) (295). Es importante destacar que tanto CD5 como CD6 son marcadores tempranos de célula T y podrían mediar interacciones entre los linfocitos y las células epiteliales tímicas (u otras APC residentes) importantes para la maduración y diferenciación de las células T. Curiosamente la expresión de CD5 aumenta a medida que madura el timocito y está determinada por la magnitud de la señal y avidéz del TCR (208).

5.3. CD6

5.3.1. Descripción y estructura

Al igual que CD5, CD6 es una glicoproteína de membrana tipo I que pertenece al grupo B de la SF-SRCR (177). Se han descrito homólogos en ratón, rata y aves (297, 298). El primer cDNA de CD6 se obtuvo de la línea HPB-ALL por Aruffo y colaboradores (176). Esta clona de cDNA (CD6-15) codificaba para una proteína de 444 aa con alta homología con CD5. Experimentos de inmunoprecipitación en células COS-7 tranfectadas con este cDNA revelaban una proteína cuyo peso de 88 kDa contrastaba con el detectado por inmunoprecipitación en células HPB-ALL. Este grupo justificaba estas diferencias por alteraciones en la capacidad de glicosilación de proteínas de las células COS-7. Posteriormente, la clonación del homólogo murino de CD6 (299) mostró una proteína con una región citoplasmática de 243 aa que no coincidía con la descrita para el CD6 (de 44 aa). Robinson y colaboradores, a partir de mRNA de PBL, obtuvo una clona que contenía la región C-terminal completa de CD6 (CD6-PB1) (300). Así por la unión de las dos clonas, CD6-15 y CD6.PBL, se consiguió el cDNA completo del CD6 humano (300) el cual predecía una proteína de 668 aa. Por lo tanto, la secuencia completa del CD6 contiene 24 aa correspondientes al péptido señal, 397 aa a los tres dominios SRCR extracelulares, 33 aa a la región espaciadora (situada a continuación del SRCR3), 26 aa a la región transmembrana y 244 aa a la región citoplasmática, aunque ésta puede ser de menor tamaño según el procesamiento alternativo de su RNA (*splicing*) (300, 301). El peso esperado es de 69,4 kDa (300) pero debido a su alto grado de glicosilación (176), ya que posee 8 posibles sitios de N-glicosilación y 2 sitios de O-glicosilación, llega a 105 kDa. La región citoplasmática está fosforilada de forma constitutiva en Ser y Thr pero tras la activación celular también se fosforila de forma transitoria en Tyr y se hiperfosforila en Ser. Esto último es el

responsable del retraso en su movilidad en un gel de poliacrilamida y que se traduce en un cambio de peso, pasando de 105 kDa a 130 kDa (302).

5.3.2. Regulación transcripcional

Los mecanismos que gobiernan la transcripción de CD6 son todavía desconocidos. Resultados preliminares de nuestro grupo (Arman M, 2004 datos no publicados) han detectado la presencia de una zona a 369 pb 5' del gen de CD6 con actividad promotora transcripcional en células T, en el que se encuentra un motivo para Ets funcional. Actualmente también estamos trabajando en la localización de zonas distales de la regulación de la transcripción, tanto del gen de CD6 como de CD5.

5.3.3. Estructura génica

Como ya se ha mencionado el gen CD6 humano se localiza en el cromosoma 11 región 11q13, contiguo al gen del CD5 (180), de forma similar a la reportada para sus homólogos murinos (179). Este hecho, junto a la gran similitud en la organización de los dominios extracelulares de CD5 y CD6, da soporte a la idea de que ambos genes evolucionaron a partir de la duplicación de un gen ancestral común. El CD6 humano está compuesto por 13 exones, seis de los cuales codifican para el péptido señal y la región extracelular, un exón codifica la región transmembrana y seis exones codifican la región intracelular, la cual según el *splicing* alternativo utilizado puede tener 5 isoformas (CD6a, CD6b, CD6c, CD6d, y CD6e) (301), siendo la CD6a la más larga y predominante.

5.3.4. Regulación de la expresión

Existen evidencias tanto *in vivo* como *in vitro* sobre la modulación de la expresión de CD6. Se ha descrito que la expresión de CD6 aumenta tras la activación con PMA en LT maduros e inmaduros, pero solo de forma insignificante en líneas B. Además este incremento es bloqueado por inhibidores de PKC (237). Estudios en pacientes con infección por Herpes virus demostró que los LT CD8⁺ que proliferaban tras la infección viral sufrían una reducción de la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD28, CD6 y CD5, sin estar afectada la población CD4⁺. Esta población T CD8⁺ a su vez era más susceptible a la apoptosis y no proliferaba tras ser estimulada con AcMo anti-CD3 (216). También se ha descrito la presencia de una población de células T periféricas CD6⁻, las cuales tienen los niveles de CD5 también reducidos y presenta baja aloreactividad (303).

Trabajos sobre desarrollo timocítico han descrito que la expresión de CD6, al igual que la de CD5, aumenta con la maduración de los timocitos. Así los timocitos DN tienen los niveles más bajos, los cuales aumentan en la fase de DP, adquiriendo los niveles más altos en la fase de

simple positivo (SP) y eventualmente se ha observado una reducción de la expresión de CD6 antes de salir a periferia en estas células (238). Además los linfocitos CD4⁺ tienen niveles más altos de CD6 que los CD8⁺ (238). También se ha observado que timocitos cultivados en presencia de una pareja de AcMo anti-CD2 (T112 y T113) sufren un aumento en la expresión de CD6, cosa que no ocurre en los cultivos de células T maduras (237). Otras combinaciones de Ac contra otros receptores de membrana como AcMo anti-CD3 o anti-CD28, solos o combinados, o AcMo anti-CD6 no afectan a la expresión de CD6 en células T maduras e inmaduras.

Existen muy pocos trabajos sobre la expresión de CD6 en las células B. Como ya se ha comentado se expresa en la subpoblación B1a y en la gran mayoría de las LLC-B. En esta última se ha visto que el estímulo con AcMo anti-CD6 más ésteres de forbol (TPA, *12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate*) con o sin IL-2, a diferencia de lo observado en las células T, no produce un aumento de su expresión (304). Además los niveles de CD6 en la LLC-B tampoco se correlaciona con progresión de la enfermedad (304).

El hecho de que existan pocas células que expresen CD5 y no expresen CD6, que ambas moléculas tengan una estructura muy similar y que sus genes se localicen muy cerca en el mismo cromosoma, sugiere una estrecha relación entre ellas y que la regulación de la transcripción de sus genes pueda ser muy similar permitiendo la regulación coordinada de su expresión (305).

5.3.5. Función

La función última de CD6 aún no es conocida pero sí existen numerosos datos que apuntan a su implicación en los procesos de activación y diferenciación de las células T.

Está bien demostrado que CD6 actúa como una molécula co-estimuladora co-sinergiando con señales activadoras y proliferativas mediadas por el complejo CD3/TCR o CD28. Así, algunos anticuerpos anti-CD6 son mitogénicos preferentemente en presencia de macrófagos (160, 306, 307), otros lo son en presencia de ésteres de forbol (PMA) (306, 307) o en presencia de AcMo anti-CD2 (165), AcMo anti-CD28 (308) o dosis subóptimas de AcMo anti-CD3 (160, 161). También existen estudios que muestran que AcMo anti-CD6 son capaces de aumentar la respuesta proliferativa en un cultivo mixto (CM) (160, 305, 307). Estas diferencias observadas sobre la capacidad de inducir proliferación de los diferentes AcMo anti-CD6, se sugirió que podrían corresponder a la existencia de hasta cuatro epítopes funcionales diferentes en el receptor y por tanto susceptibles de unir diferentes ligandos (307). Se ha de destacar que ningún AcMo anti-CD6, solo o en combinación con PMA o IL-2, ha sido capaz de inducir proliferación en timocitos ni células B.

Por otro lado se ha descrito que CD5 forma parte de complejos moleculares asociándose físicamente a otros receptores (225-230), pudiendo participar de esta manera en la modulación del estado de activación final de la célula. Hasta la fecha no se ha demostrado la asociación de CD6 a ningún otro receptor en la superficie de los LT, pero un estudio realizado en ratas

describía la co-inmunoprecipitación de CD6 con proteínas señalizadoras como Lck, Fyn, Itk, ZAP-70 y también con CD5. En este estudio también se indicaba una posible regulación de la fosforilación de CD5 a través de proteínas asociadas a CD6 (298). Ésta es la primera sospecha de la participación de CD6 en complejos moleculares funcionales a nivel de la membrana de la célula, donde podría estar unido físicamente a otro/s receptores o interactuar entre ellos a través de proteínas intracelulares (310).

Los datos aquí expuestos corroboran la función co-estimuladora de CD6 en las células T periféricas, pero poco se sabe de la función de CD6 en otros tipos celulares. Datos recientes apuntan que CD6 podría ser importante durante la selección positiva de los timocitos, permitiendo particularmente la supervivencia de aquellos timocitos con un TCR con baja avidéz por el complejo antígeno-MHC, pudiendo así pasar de DP a SP (238). Estos datos junto a la demostración de que CD6 está aumentado en clonas de células T maduras autoreactivas y que esta autoreactividad puede ser inhibida con AcMo anti-CD6 (311), sugieren una posible implicación de CD6 en los procesos autoinmunitarios.

Poco se conoce sobre la función de CD6 en las células B1a y de LLC-B. Así se ha sugerido que la interacción de CD6 con su ligando podría contribuir a la supervivencia de las células de la LLC-B a través de la modulación del equilibrio Bcl-2/Bax, ya que el entrecruzamiento de CD6 parece proteger de la apoptosis mediada por antígeno e inducir la expresión de proteínas anti-apoptóticas (304). En LLC-B los niveles de expresión de CD6 a pesar de no correlacionarse con la progresión de la enfermedad, sí parecen estar implicados en la protección a la apoptosis inducida por AcMo anti-IgM (304).

También se ha demostrado que el trasplante alogénico con médula osea depleccionada de células CD6⁺, con Ac específicos (AcMo T12), es efectivo como tratamiento de pacientes con leucemia aguda en primera remisión y de alto riesgo, sin causar excesiva toxicidad (312). Se ha relacionado el número de células T CD6⁺, y no de CD6⁻, con la EICH. Esta asociación entre células CD6⁺ y EICH se ha propuesto que depende de la diferente respuesta de estas células respecto las CD6⁻ a los antígenos del huésped, ya que las células CD6⁻ han mostrado menor reactividad a diversos antígenos *in vitro* (312, 313). Estos datos concuerdan con la descripción en sangre periférica de individuos normales de la presencia de una población CD6⁻ con una menor aloreactividad en un CM. Esta población es CD3⁺ y también CD5⁺, aunque a niveles más bajos que la población CD6⁺ (303). Todos estos datos sitúan a CD6 como un receptor implicado en aumentar la supervivencia y reactividad de las células T.

Se ha descrito la rotura proteolítica de CD6, así como de otros receptores de la superficie del linfocito T, de forma artificial con la proteasa bromelain (314). También *in vivo* se ha detectado una forma soluble de CD6, al igual a lo descrito para otros receptores como CD4, CD50, CD5 etc. (242). Los niveles de esta forma soluble de CD6 son bajos en sueros de personas sanas y más altos en sueros de enfermos de Síndrome de Sjögren (242). Este aumento en un proceso autoinmune sugiere una posible implicación de esta forma soluble en la causa o el efecto de la enfermedad. Así, un trabajo reciente ha descrito la capacidad de inhibición de la proliferación de las células T inducida por Toxina Tetánica (TT), de una proteína de fusión soluble formada

por los tres dominios SRCR de CD6 unidos al Fc de las Ig (CD6-Fc). Este mismo trabajo observó el mismo efecto con otra proteína de fusión soluble que estaba formada por la zona extracelular de ALCAM, el ligando de CD6, unida al Fc de las Ig, (ALCAM-Fc). En conjunto estos datos sugieren una posible implicación de CD6, a través de la interacción con ALCAM, en los procesos de activación de los LT (309), y están en concordancia con su implicación en los procesos autoinmunes. De la misma manera abre la posibilidad de la utilización de proteínas solubles como moléculas bloqueantes de los procesos de activación de los LT.

5.3.6. Vía de señalización

La región citoplasmática de CD6 carece de actividad catalítica intrínseca pero contiene numerosos motivos consenso de unión a proteínas implicadas en la transducción de señales. Así posee dos zonas ricas en prolinas que cumplen el consenso de unión a dominios SH3, un sitio de unión a dominios SH2, un sitio de unión a CaMK, un motivo Ser-Thr repetido tres veces, tres sitios consenso para la unión de PKC y diez sitios que cumplen el consenso de fosforilación por la CKII (**Fig I.11**). Estas secuencias se cree que han de ser importantes para la arriba descrita capacidad de AcMos anti-CD6 de inducir la proliferación de las células T (300). También se ha visto que CD6 se fosforila en Tyr tras la activación de la célula vía CD3 y dicha fosforilación es aún mayor cuando se entrecruza CD3 con CD2 o sobretodo con CD4 (315). Posteriormente se vió que las Tyr 629 y 662 eran las que sufrían dicha fosforilación (301) y que el entrecruzamiento de CD6 y el TCR producía un aumento de la movilización del calcio intracelular, localizándose la zona de CD6 responsable de tal aumento entre los residuos 502 y 555 de su región citoplasmática. Ya con anterioridad se había implicado a un miembros de la familia de las PTK en la regulación del aumento del calcio intracelular tras la activación de CD6 (316).

Existen evidencias de la implicación de la IL-2 en la proliferación inducida por CD6, ya que células estimuladas con AcMo anti-CD6 han demostrado tener aumentada la expresión del receptor de IL-2 (IL-2R) y dicha proliferación puede ser inhibida por AcMo anti-IL-2R (160). Por otro lado, en la proliferación inducida por AcMo anti-CD6 en células T pre-tratadas con ésteres de forbol (TPA) está implica la rápida activación de una PTK, como demuestra la inhibición de la proliferación de las células con herbamicina A (316). En presencia de herbamicina A también se observa una inhibición del aumento del mRNA de la IL-2, apoyando trabajos anteriores sobre la dependencia de IL-2 en la proliferación inducida por CD6. Otro estudio demuestra que el entrecruzamiento simultáneo de las moléculas co-estimuladoras CD6 y CD28, en ausencia de unión del complejo CD3/TCR, puede inducir proliferación de las células T y que dicha proliferación es dependiente de IL-2. El hecho de que la presencia de ciclosporina A, inhiba la proliferación inducida por CD6 pero no la inducida por CD28 y que inhibidores de la PKC bloqueen ambas proliferaciones, sugiere que las señales tempranas asociadas con CD6 y CD28 podrían ser similares y posteriormente divergir hacia vías totalmente distintas, para regular diferentes procesos asociados con la proliferación celular (308). Así a pesar de los

escasos conocimientos existentes sobre la vía de señalización de CD6, esta molécula parece tener capacidad de potenciar estímulos proliferativos de forma IL-2 dependiente. Así un trabajo demuestra la capacidad de un AcMo anti-CD6 (UMCD6) de bloquear la proliferación de clonas de células T reactivas a TT, y esta inhibición se revierte con la incorporación exógena de IL-2 (311). Este hecho sugiere que la interacción CD6-ALCAM no está implicada en la capacidad de respuesta a IL-2 de las células sino que debe ser importante para la producción de IL-2.

5.3.7. Ligandos

Los primeros estudios de ligandos para CD6 se realizaron con una proteína quimérica compuesta por los tres dominios extracelulares de CD6 unidos a la zona Fc de la IgG1 humana (CD6-Ig). Se observó que esta proteína se unía a secciones de timo y a una variedad de líneas celulares, incluyendo células epiteliales tímicas (317). Estas uniones eran sensibles a tripsina, eran bloqueadas por Ac anti-CD6, y también podían ser disminuidas por $TNF\alpha$, IL-1 β e IFN- γ . En experimentos de inmunoprecipitación se detectaron tres glicoproteínas de aproximadamente 100, 90 y 45 kDa. A diferencia de la interacción con el ligando de 100 kDa, las interacciones con los ligandos de 90 y 45 kDa, los cuales están todavía por identificar, resultaron ser dependiente de cationes divalentes (317, 318). Hay que añadir que también se han descrito ligandos para CD6 en queratinocitos activados con γ -interferon (319) y en fibroblastos sinoviales (320).

La primera descripción de una interacción mediada por un dominio SRCR fue la de CD6 con la proteína de adhesión ALCAM (Activated Leukocyte cell adhesion molecule). Gracias a la proteína quimérica CD6-Ig y al AcMo J4-81, descrito en el 5th *International Workshop on Leukocyte Differentiation Antigen* como capaz de bloquear la interacción de CD6 al epitelio tímico, se describió la interacción de CD6 a una glicoproteína de 100 kDa (318). Posteriormente se consiguió el aislamiento y la clonación del cDNA de esta proteína, que por su expresión en leucocitos activados, fue denominada ALCAM (o también denominada CD166) (296).

ALCAM tiene una expresión tisular amplia, así se expresa en LT y LB maduros activados, monocitos activados por adhesión a plástico, macrófagos, células de la médula ósea CD34⁺, linfomas T y B, leucemias mieloides, varias líneas celulares de carcinoma, epitelio tímico, córtex cerebral, neuronas, queratinocitos, fibroblastos y endotelio (296). Está compuesto por una corta región intracelular de 32 aa que contrasta con su gran zona extracelular de 556 aa que forman 5 dominios Ig-like. Los dos dominios Ig-like más N-terminales son de estructura similar a los dominios Ig variables (V), mientras que los tres más C-terminales tienen una estructura más similar a los dominios Ig constantes (C) (321). La interacción entre CD6 y ALCAM tiene una estequiometría de 1:1 y están implicados el dominio SRCR más C-terminal (SRCR3) de CD6 y el dominio V1 de ALCAM (322, 323) (**Fig. I.14.**). Es importante destacar que ALCAM también puede interactuar con el ALCAM de otra célula, realizando interacciones homotípicas, en las que están implicados los dominios V1 de ambos ALCAMs (324). Estudios

de unión con proteínas de fusión de CD6 y ALCAM, que contenían más de un dominio, demostraron que la interacción CD6-ALCAM es estabilizada por las zonas circundantes en ambas moléculas. De hecho interacciones homotípicas entre los dominios C-like de ALCAM causan su oligomerización y favorecen la unión de CD6 (324). Estudios de mutagénesis del dominio V1 demuestran que los residuos aminoacídicos críticos para la unión a CD6 se localizan en la cara AGFCC'C'' de ALCAM (325). La denominada cara AGFCC'C'' de unión se localiza en la hoja β de los dominios V-like de los miembros de la SF-Ig y que se ha visto implicada en la interacción con ligandos de familias muy diversas (83, 326-328). Los mismos tipo de estudios de mutagénesis en el SRCR3 de CD6 determinan 3 residuos importantes para la unión a ALCAM, los cuales están conservados entre el CD6 humano y murino (329). También los residuos descritos para el ALCAM implicados en la interacción con CD6 están conservados en sus homólogos murinos, permitiendo así la interacción cruzada entre las especies (180).

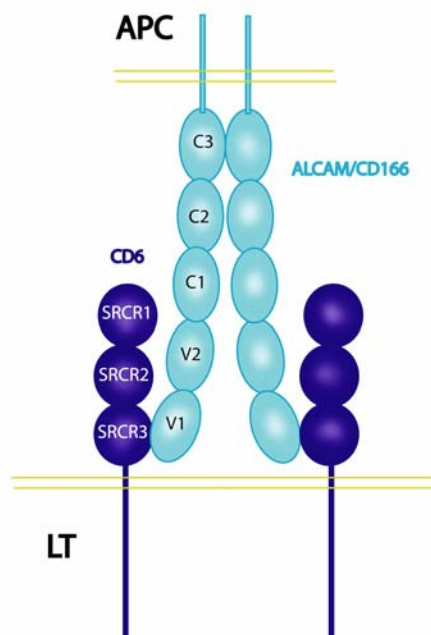


Figura I.14. Modelo de la interacción entre CD6 y ALCAM. ALCAM (en azul claro) con los 3 dominios Ig-constantes (C) y los dos dominios Ig-variables (V). CD6 (azul oscuro) representado con los tres dominios SRCR. En la interacción CD6/ALCAM intervienen el dominios V1 de ALCAM y el dominio SRCR3 de CD6. La holigomerización de ALCAM facilita su unión a CD6.

Se ha demostrado que la interacción CD6-ALCAM media la adhesión entre los timocitos y las células epiteliales tímicas, y por tanto podría estar implicada en la diferenciación tímocítica. También se especula una función de esta interacción en el sistema nervioso, ya que tanto CD6 como ALCAM están expresados en el cerebro (296). La presencia de ALCAM tanto en precursores hematopoyéticos como en las células estromales de tejidos formadores de sangre junto con la descripción de presencia de CD6, aunque a niveles bajos, en células precursoras hematopoyéticas CD34⁺, indican que ALCAM, ya sea a través de interacciones homo- o hetero-

típicas, podría estar implicado en la adhesión entre progenitores hematopoyéticos tempranos y células estromales de los tejidos primarios (330). En este sentido se ha implicado a ALCAM en los procesos de angiogénesis. Aunque el mecanismo no es conocido, se cree que puede ser debida a sus interacciones homotípicas, pero la participación en este proceso de su interacción con CD6 no puede ser descartada (331).

II HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Los receptores linfocitarios CD5 y CD6 están altamente expresados, entre otras células, en linfocitos T CD4⁺, los cuales tienen un papel central en la regulación de la respuesta inmunitaria. Además estos receptores tienen capacidad de regular las señales enviadas por el complejo CD3/TCR y por tanto pueden influir en el estado de activación de estas células. También se ha descrito la implicación de CD5 y CD6 en procesos autoinmunitarios y linfoproliferativos, así como durante la maduración timocítica. Por todo ello el avance sobre el conocimiento de sus vías de señalización, función, ligandos, etc., podría ser muy interesante para comprender mejor ciertos trastornos del sistema inmunitario y para el diseño de nuevas terapias. Tradicionalmente el receptor CD5 ha sido muy estudiado, sobretodo en LB, y actualmente existe bastante información sobre él. Por el contrario existen pocos trabajos sobre CD6 y por ello nos hemos interesado en su estudio. El hecho de que ambos pertenezcan a la misma familia (SF-SRCR), tengan un patrón de expresión muy similar y una estructura extracelular y génica muy homóloga, orienta a un posible origen común por la duplicación de un gen ancestral y que sus funciones, descritas como accesorias, puedan estar relacionadas. Por tanto, dadas las similitudes entre ambas moléculas, nos planteamos el estudio de CD6 guiándonos en los conocimientos existentes sobre CD5 (pero no por ello dejando de interesarnos también por esta última).

Se sabe que en la superficie de los linfocitos T existen asociaciones entre receptores formando complejos moleculares funcionales. En este sentido se ha descrito que CD5 está asociado a receptores co-estimuladores, como CD2, CD9 e incluso al propio TCR (y al BCR en las células B). Esto último da una base física para su capacidad de modular las señales del TCR. Por tanto uno de nuestros primeros objetivos ha sido analizar posibles asociaciones de CD6 con otros receptores en la superficie de los LT que nos permitiera entender mejor su función accesoria o co-estimuladora.

Durante la activación de los LT, el encuentro con una APC portadora de un MHC-p específico induce una reorganización de las moléculas accesorias y sus ligandos en la zona de contacto formando una estructura denominada Complejo supramolecular de activación o *Supramolecular activation cluster* (SMAC). Entonces, la zona de contacto entre el LT y la APC así organizada, se denomina sinapsis inmunitaria (SI). Los receptores co-estimuladores se redistribuyen colocándose cerca del complejo CD3/TCR y a su vez reclutan proteínas señalizadoras intracitoplasmáticas contribuyendo a la modulación de las señales. Las estructuras lipídicas denominadas *rafts* sirven como base física para esta organización molecular, permitiendo que ciertas proteínas se mantengan cerca y puedan realizar su función. De acuerdo con estos datos y teniendo en cuenta que CD5 y CD6 tienen capacidad de modular las señales del complejo CD3/TCR, nos hemos interesado en investigar su localización en la SI y su posible implicación funcional durante la activación de los LT, así como la relación de CD6 con los *rafts* lipídicos, donde se ha descrito la presencia de CD5.

Una consecuencia importante de la unión de CD5 y CD6 a sus ligandos es la activación de sus respectivas cascadas de señalización que influirán en el estado de activación final de la célula. La vía de señalización de CD5, a diferencia de la de CD6, ha sido bastante estudiada y actualmente empieza a ser comprendida. Por lo tanto, con la finalidad de dar un poco de luz al escaso conocimiento existente sobre la vía señalización de CD6, nos hemos interesados en investigar posibles proteínas con capacidad de unión a la región citoplasmática de CD6.

Objetivos:

- 1- Estudio de las asociaciones moleculares realizadas por CD6 en la superficie de los LT.
- 2- Implicación de CD5 y CD6 en la activación de los linfocitos T:
 - 2.1- Análisis de la presencia de CD5 y CD6 en estructuras relacionadas con la activación linfocitaria (Sinapsis inmunitaria/SMAC y *rafts*).
 - 2.2- Implicación de la interacción de CD5 y CD6 a sus respectivos ligandos sobre la activación de los linfocitos T.
- 3- Estudio de asociaciones moleculares mediadas por de la región citoplasmática de CD6.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CÉLULAS

Los linfocitos fueron obtenidos a partir de la punción de ganglios linfáticos e infusión de suero fisiológico, o por centrifugación en gradiente de Ficoll de sangre total o bolsas de concentrados de células sanguíneas obtenidas del banco de sangre. Los timocitos provienen de disrupción de timo de niños sometidos a cirugía cardíaca. Las líneas de células T humanas HUT-78 y Jurkat, la línea B Raji y la línea eritromieloide K562 fueron obtenidas del *American Tissue Culture Collection* (ATCC). Las células COS-7 fueron obtenidas del *European Collection of Cell Culture* (ECACC 87021302). Las células 2G5 CD5⁺CD6⁻ fueron obtenidas por FACS y posterior subclonación a partir de células Jurkat (274). Las líneas celulares fueron cultivadas en RPMI con 10% suero fetal bovino (*Fetal calf serum*, FCS), 1 mM Piruvato de sodio, 2 mM L-glutamina, 50 unidades/ml de penicilina G y 50 µg/ml estreptomina. La línea HEK 293-EBNA utilizada en la producción de proteínas solubles fue obtenida de Invitrogen live Technologies y cultivada en DMEM/F12 (Invitrogen Live Technologies) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptidina, 250 µg/ml geneticina (G418) y 10% FCS.

2. ANTICUERPOS Y REACTIVOS

Los AcMo murinos Cris-1 (anti-CD5, IgG_{2a}), 148.1C3 (anti-CD43, IgG_{2a}), 33-2A3 (anti-CD3, IgG_{2a}), 161.8 (anti-CD6, IgG₁), 33-3B3 (anti-CD44, IgG_{2a}) y anti-CD50 (152-2D1, IgG₁) fueron producidos en nuestro laboratorio por el Dr R. Vilella (Hospital Clínico, Barcelona). El AcMo Leu-1 (anti-CD5_{2a}) es de BD Biociences. El SPV-L14.2 (anti-CD6, IgG₁) es de Immunotech (Marsella, Francia), el W6/32 (anti-HLA case I, IgG_{2a}) de ATCC (HB-95) y el OKT-3 (anti-CD3) de Ortho Biotech Inc.). El AcMo anti-actina es de ICN biomedical (Costa Mesa, CA). El anti-CD3ζ policlonal fue cedido por Dr B. Alarcón (Centro de Biología molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid) (332). El anti-ICAM-1 de ratón es de F. Luscinskas (Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA) (333). El AcMo MAE-C10 fue cedido por el Dr F. Sánchez-Madrid (Hospital de la Princesa, Madrid) (302). El AcMo anti-*haemagglutinin* (HA) llamado HA.11 es de BAbCO (Berkeley, USA). Los AcMo anti-CD5 (UCHT2, IgG₁), anti-CD6 (M-T605, IgG₁) y anti-CD3 (UCHT1, IgG₁) marcados con *fluorescein isothiocyanate* (FITC) son de Farmigen. El AcMo anti-ACAM marcado con *phycoerythrin* (PE) es de R&D Systems (Minneapolis). El 148.1C3 (anti-CD43) fue conjugado con FITC (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) como se describió en (334). Los AcMo Leu-1, 33-2A3 y 161.8 fueron conjugados a cianina 3 (Cy3) usando el kit de Amersham Bio-science. Las Ig polivalentes de cabra contra Ig de ratón (goat anti-mouse Ig, GAMIg) marcadas con FITC son de Sigma. Las IgG normales de ratón (m-IgG) son de Caltag (Burlingame, CA). La Ig de cabra contra Ig de conejo (GARIg) con Cy3 es de Jackson ImmunoResearch (Westgrove, PA). El suero GARIg o GAMIg conjugados a peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase, HRP) son de Amersham

Pharmacia Biotech (Little Chalfont Buckinghamshire, UK). La streptavidina (SAv) conjugada con HRP es de Dako (Alemania). La SAv conjugada a tri-color (TC) o Texa-red (TR) son de Caltag (Burlingame, CA).

La obtención del suero de conejo contra la región extracelular de-CD5 se ha descrito en (191). El anti-suero anti-la región intracelular de CD6 fue producido en nuestro laboratorio tras la inmunización durante 2 semanas de conejos con 4 inyecciones intramusculares (50 µg cada una) de glutathione-S-transferase (GST)-CD6.cy en adjuvante de Freund (Invitrogen) completo primero e incompleto después.

La biotinización de AcMo se realizó con EZ-Link sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Pierce) siguiendo el protocolo del producto. El Mowiol 4-88 es de Calbiochem. La poly-L-lisina (PLL), el AcMo anti- α -tubulina (DM1A) marcado con FITC y la subunidad B de la toxina colérica (CTX) marcada con FICT o HRP son de Sigma. El marcador fluorescente azul clorometil derivado de aminocoumarin (CMAC) y el GAMIg-Alexa Fluor 488 y SAv-Rhodamine Red-X (RR) son de Molecular Probes (Eugene, OR). La enterotoxina E, B y A de *Staphylococcus* (SEE, SEB y SEA respectivamente) y la fibronectina son de Toxin Technology (Sarasota, FL).

3. CONSTRUCCIONES

3.1. Construcciones en el vector de expresión pH β Apr-1-neo para células de mamífero

La porción extracelular de CD6 se obtuvo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los oligonucleótidos sentido (forward, Fw) y anti-sentido (reverse, Rv) 5'-TCTCGTCGACATGTGGCTCTTCTTCGGGAT-3' y 5'-AACTTCTTTGGGGATGGTGATGGG-3' a partir de la secuencia de cDNA de CD6 clonada en el vector pBJneo (300). La región intracelular de CD6 se obtuvo por PCR a partir de cDNA de HUT.78, con la pareja de oligonucleótidos Fw y Rv 5'-GTCACTATAGAATCTTCTGTG-3' y 5'-AAAGGATCCCTAGGCTGCGCTGATGTCATC-3'. Estos dos fragmentos fueron digeridos *Sall/EcoRI* y *EcoRI/BamHI* respectivamente y clonados en los sitios de restricción *Sall/BamHI* del vector de expresión en células de mamífero pH β Apr-1-neo (**Fig III.1A**) para obtener la construcción que codifica para las moléculas de CD6 completa (pH β -CD6.wt). La construcción pH β -CD6.613^{STOP} se obtuvo por amplificación por PCR a partir de la anterior con la pareja 5'-GTCACTATAGAATCTTCTGTG-3' y 5'-GTTGGATCCCTATGCTGAAAAGGCTGGCTGG-3'. La generación de las construcciones de expresión codificantes para las moléculas CD5.wt y CD5.K384^{STOP} fueron descritas en (274).

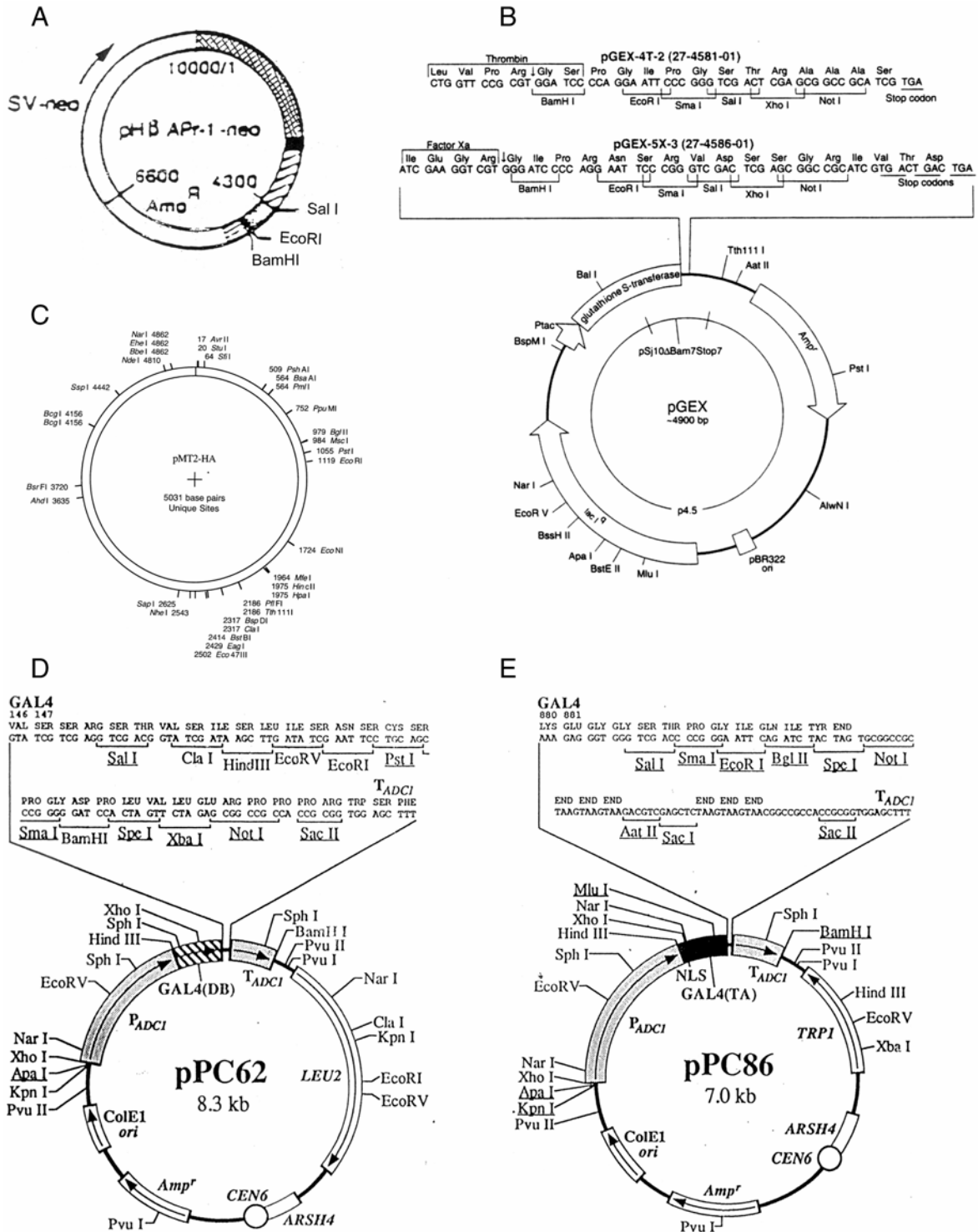


Figura III.1. Esquema de los vectores utilizados en las diferentes construcciones. **A**, Vector pHBApr-1-neo. Es un vector de expresión para células de mamífero. **B**, Vectores pGEX-4T2 y pGEX-5X3. Son vectores para la producción en bacterias de proteínas de fusión a GST. **C**, Vector pMT2-HA. Variación del vector pMT2. Expresión en eucariotas de proteínas unidas a un tag de HA. **D**, Vectores del sistema de doble híbrido pPC62 y pPC86. Expresión de proteínas de fusión al dominio de unión al DNA (BD) o de activación (AD) del FT Gal4, respectivamente

3.2. Construcciones para la expresión de proteínas de fusión a *glutathione S-transferase* (GST) en vectores pGEX

La construcción GST-CD6.cy codifica para una proteína de fusión compuesta por la proteína GST fusionada a la región citoplasmática de CD6 (de L427 a A668). Esta región se obtuvo por amplificación por PCR con los oligonucleótidos Fw y Rv 5'-AGCSGTGACGAAAGGAAAATATGCCCTCCCCGTA-3' y 5'-AAGAATGCGGCCGCTAGGCTGCGCTGATGTCATCGGT-3' a partir de la construcción pH β -CD6.wt y clonación en los sitios de restricción *Sall/NotI* (Fermentas MBI, Vilnius, Lithuania) del vector de expresión pGEX-4T-2 (Amersham Bioscience AB) (**Fig. III.1B**).

La proteína de fusión GST-syntenin. Δ Nt se obtuvo por digestión directa de la construcción pPC86-syntenin.wt, aislada en los experimentos de doble híbrido. Se digirió con el enzima *EcoRI*, utilizando el sitio de corte interno situado antes de su primer PDZ, y aprovechando el sitio de clonación *NotI* del vector. El fragmento resultante fue clonado en el vector pGEX-5X-3 (**Fig. III.1B**).

La expresión de las proteínas de fusión GST y su inmovilización a bolas de *glutathione-Sepharose 4B* fue realizada según el protocolo del producto (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

3.3. Construcciones para el sistema de doble híbrido

Los diferentes fragmentos de la región citoplasmática de CD6 fueron obtenidos por PCR a partir de la construcción pH β -CD6.wt y clonados *Sall/NotI* en el vector pPC62 (**Fig. III.1D**) de expresión en levaduras (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) a continuación del dominio de unión a DNA (binding domain (BD)) del factor de transcripción (FT) Gal4 (335). En la **tabla III.I**, se muestra el nombre recibido por cada fragmento de cDNA de la región citoplasmática de CD6, su aa de inicio (aa.i) y de fin (aa.f) y la pareja de oligonucleótidos utilizada en cada caso.

La construcción pPC62-CD5cy se obtuvo como se explica en (248).

La construcción que codifica para la proteína murina syntenin-1 completa (syntenin.wt) se aisló de los experimentos de doble híbrido. La construcción syntenin.PDZ1 (M1 a R619) se obtuvo por PCR a partir de la anterior con la pareja de oligonucleótidos Fw/Rv 5'ATTAGTCGACATGTCTCTTTATCCATCTCTTGA3' y 5'AGAATGCGGCCGCTTACCTGTCACGGATCGTCATG3' y clonada *Sall/NotI* en el vector pPC86 (**Fig. III.1E**) a continuación del dominio de activación (Activation domain (AD)) del FT Gal4. El fragmento Syntenin.PDZ2 se obtuvo por delección del dominio PDZ1 por el solapamiento por PCR (*overlapping*) de dos fragmentos de cDNA, uno que codificaba desde M1 a K109 y amplificado con la pareja de oligonucleótidos

5'ATTAGTCGACATGTCTCTTTATCCATCTCTTGA3' y
 5'ACTGTCCGTTGAAAGGGCTTAATCTTCGTTCTCCG3', y el otro codificando desde P194 al
 codon stop con la pareja 5'CGGAGAACGAAGATTAAGCCCTTTGAACGGACAGT3' y
5'GAATGCGGCCGCTTAACTTCAGGAATGGTGTGAT3'. Los fragmentos de cDNA
 generados (M1 a K109 y P194 a condon stop) fueron ligados por PCR con los oligonucleótidos
 subbrillados y el producto resultante fue clonado igual que el anterior.

Tabla III.I. Construcciones de la región citoplasmática de CD6 para el sistema de doble híbrido.

Nombre	aa.i-aa.f	Fw	Rv
CD6.cy	K427-A668	5'AGCAGTCGACGAAAGGAAAATATGCCCTCCCGTA3'	5'AAGAATGCGGCCGCTAGGCTGCGCTGATGTCATCGT3'
E8910	K427-E527	5'AGCAGTCGACGAAAGGAAAATATGCCCTCCCGTA3'	5'AAGAATGCGGCCGCTATTCTCCAAGGGTGGCAT3'
E891011	K427-S612	5'AGCAGTCGACGAAAGGAAAATATGCCCTCCCGTA3'	5'AAGAATGCGGCCGCTATGAAAAGGCTGGCTGGGT3'
E11s	G528 a S612	5'AGCAGTCGACAGGACTTGAAGAGTTGCATGCC3'	5'AAGAATGCGGCCGCTATGAAAAGGCTGGCTGGGT3'
E1213	A613-A668	5' TAACGTCGACTGCAGGGCCCCCGGCTGATGAC 3'	5'AAGAATGCGGCCGCTAGGCTGCGCTGATGTCATCGT3'
E12s	A613 a P647	5'TAACGTCGACTGCAGGGCCCCCGGCTGATGAC3'	5'AAGAATGCGGCCGCTATGGACAGCCAACTGCTCCTC3'
E13s	S649-A668	5'TAACGTCGACATCCCAGCCCTCAGCCTGAC3'	5'AAGAATGCGGCCGCTAGGCTGCGCTGATGTCATCGT3'
E1213.A668S	A613-S668	5' TAACGTCGACTGCAGGGCCCCCGGCTGATGAC 3'	5'TAATGCGGCCGCTAGGATGCGCTGATGTCATCGT3'
E1213.A667S	A613-A668	5' TAACGTCGACTGCAGGGCCCCCGGCTGATGAC 3'	5'TAATGCGGCCGCTAGGCTGAGCTGATGTCATCGT3'
E1213.S666A	A613-A668	5' TAACGTCGACTGCAGGGCCCCCGGCTGATGAC 3'	5'AAGAATGCGGCCGCTAGGCTGCTGCGATGTCATCGT3'
E1213.I665A	A613-A668	5' TAACGTCGACTGCAGGGCCCCCGGCTGATGAC 3'	5'AAGAATGCGGCCGCTAGGCTGCGCTGGGCTCATCGT3'
E1213.D664A	A613-A668	5' TAACGTCGACTGCAGGGCCCCCGGCTGATGAC 3'	5'AAGAATGCGGCCGCTAGGCTGCGCTGATGGCATCGT3'
E1213.D663A	A613-A668	5' TAACGTCGACTGCAGGGCCCCCGGCTGATGAC 3'	5'AAGAATGCGGCCGCTAGGCTGCGCTGATGTCAGCGTAG3'
E1213.Y662A	A613-A668	5' TAACGTCGACTGCAGGGCCCCCGGCTGATGAC 3'	5'AAGAATGCGGCCGCTAGGCTGCGCTGATGTCATCGGCGTC3'
E1213.D4	A613-D664	5' TAACGTCGACTGCAGGGCCCCCGGCTGATGAC 3'	5'AAGAATGCGGCCGCTAGTATCATCGTAGTATCGTTGTC3'

La tabla muestra los oligonucleótidos sentido (Fw) y anti-sentido (Rv) utilizados en la obtención de las diferentes construcciones de la región intracelular de CD6 utilizadas en el sistema de doble híbrido. También se indican los aa iniciales (i) y finales (f) de cada construcción.

3.4. Construcciones en pMT2-HA

Las construcciones HA (*haemagglutinin*)-Syntenin.wt y HA-syntenin.PDZ1 fueron obtenidas por PCR a partir de la construcción syntenin.wt con el oligonucleótido 5'ATGAATTCATGTCTCTTTATCCATCTCTT3' (Fw) combinado con los Rv 5'ATACTCGAGTTAACTTCAGGAATGGTGTG3' y 5'ATACTCGAGTTACCTGTCACGGATCGTCAT3' respectivamente, y clonados *EcoRI/XhoI* en el vector de expresión en células de mamífero pMT2HA (**Fig. III.1C**). La construcción HA-syntenin.PDZ2 se obtuvo por delección del dominio PDZ1 a partir de la construcción HA-syntenin.wt por PCR con los oligonucleótidos Fw y Rv 5'GGGATCCGTGAAGTTATTATGCATAAGGACAGC3' y 5'GCTGTCCTTATGCATAATAACAATAACTTCACGGATCCC3'.

La construcción PP2A.wt fue aislada de las levaduras en los experimentos de doble híbrido.

4. EXPERIMENTOS DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN A PARTIR DE SOLUBILIZADOS CON DIFERENTES DETERGENTES

4.1 Biotinización de células en superficie

Las células fueron lavadas 2 veces con tampón fosfato salino (*phospate buffered saline*, PBS) pH8 y resuspendidas también en PBS pH8 a una concentración de 25×10^6 células/ml. Posteriormente fueron incubadas con bionina (EZ-Link sulfo-NHS-LC-LC-Biotin, Pierce) (0,5 mg/ml) durante 30 min. a temperatura ambiente (TA) con agitación ligera. La biotina no unida fue eliminada mediante tres lavados de las células con PBS pH8.

4.2. Experimentos de inmunoprecipitación (IP), re-inmunoprecipitación e inmunodeplección

Diferentes alícuotas de células biotiniladas o no en superficie fueron lisadas 30 min en hielo con un tampón de lisis que contiene 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 140 mM NaF, 0.4 mM orthovanadate, 5 mM pyrophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) y 1 tabletas de mezcla de inhibidores de proteasas cada 50 ml (Complete™, Roche Molecular Biochemicals) y 1% de uno de los detergentes siguientes: Nonidet P-40 (NP-40) (Roche Molecular Biochemicals), Brij 96 (Fluka) o Brij 58 (Sigma-Aldrich). Tras ser centrifugados a 14.000 r.p.m 15 min a 4 °C los lisados celulares fueron pre-aclarados por rotación a 4 °C con 50 µl de bolas de sepharose CL-4B copuladas a proteína A (protA-seph) (Amersham Boiscience AB) al 50 % en tampón de lisis. La IP se realizó por la adición de 3 µg de AcMo con 20 µl de protA-seph y rotación a 4 °C durante 2 h. Los inmuno-complejos fueron lavados 3 veces en tampón de lisis con 1 % de detergente y según el experimento realizado, eluidos en tampón reductor y corridos en gel SDS-PAGE (inmunoprecipitación, IP) o procesados para los experimentos de re-inmunoprecipitación (re-IP) o inmuno-deplección, como se indica.

Para los experimentos de re-IP los inmuno-complejos de la 1ª IP fueron eluidos por ebullición 5 min en 50 µl de tampón de lisis 3 % SDS. Los eluidos fueron recuperados totalmente (aspirando con aguja de insulina) y diluidos hasta 500 µl con tampón de lisis. Entonces los eluidos se pre-aclararon con 50 µl de bolas de protA-seph 30 min a 4 °C antes de la 2ª IP, la cual se hizo con 5 µl de suero policlonal de conejo anti-CD6 o anti-CD5 más 20 µl de protA-seph y rotación a 4 °C durante 2 h. Los re-precipitados fueron lavados 3 veces con tampón de lisis, eluidos por ebullición de 5 min en tampón reductor y corridos en 8 % SDS-PAGE.

Para los experimentos de inmunodeplección, células HUT-78 biotiniladas en superficie fueron lisadas en tampón de lisis con 1 % Brij 96 o Brij 58 y entonces IP de forma secuencial (8 veces) con AcMo anti-CD5 (Cris-1) o anti-CD6 (161.8). Una vez los lisados estaban depleccionados fueron pre-aclarados con protA-seph e inmunoprecipitados cruzando los Ac (los lisados depleccionados de CD5 fueron IP con AcMo anti-CD6 y a la inversa). Finalmente los inmunocomplejos fueron eluidos con tampón de lisis con 3 % SDS, tal como se explica arriba, y reprecipitados para la molécula depleccionada con el anti-suero de conejo específico. En un caso los lisados depleccionados de CD5 también fueron re-IP para CD3, eluidos con tampón 3% SDS y re-IP contra CD6. Los 2° IP (provinientes de lisados depleccionados de alguna molécula) fueron comparados con IP de lisados no depleccionados de CD5 o CD6.

5. TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS COS-7

La transfección transitoria de las células COS-7 se realizó en algunos casos con el método dithylaminoethyl-dextran/Me₂SO como se describió (336) (en resumen, se utilizan 2 µg de DNA plasmídico por cada 2x10⁶ células en pocillos de 9 cm²) o con liposomas, lipofectamine 2000 (invitrogen, Carisbad, CA) siguiendo el protocolo del producto. En algunos casos las células son biotiniladas en superficie antes de ser lisadas en tampón de lisis con 1% de detergente.

6. ENSAYOS DE *PULL-DOWN*

Lisados de células COS-7 transfectadas con pHβ-CD6.wt en tampón de lisis 1% NP-40 fueron incubadas con cantidades iguales de GST o GST-syntenin inmovilizada a sepharosa durante 2 h a 4 °C. Los precipitados fueron lavados 3 veces con tampón de lisis 1% NP-40 y fueron resueltos en gel de poliacrilamida al 10% en el que también se incluyó 30 µl de cada lisado como control de transfección.

7. ANÁLISIS POR *WESTERN BLOT*

Los geles de acrilamida fueron transferidos por electroforesis (a 0,4 A, 100 v 1 h) a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Richmond, CA). Las membranas fueron bloqueadas 30 min a 37 °C o 1 h a TA con 5 % de leche descremada en polvo en PBS. Las situaciones en que las células habían estado previamente biotiniladas en superficie la detección de las proteínas se realizó por hibridación de las membranas con SAV-HRP 1/1000 en tampón de bloqueo durante 30 min a TA. En las otras situaciones, las membranas fueron incubadas 30 min a TA con el Ac

indicado, lavadas tres veces con PBS 0,1 % Tween 20 e incubadas con el 2º anticuerpo (GAMlg o GARlg en función del tipo de anticuerpo usado como primario). Finalmente las membranas son otra vez lavadas tres veces con PBS 0,1 Tween 20. Todas las membranas son reveladas por quimioluminiscencia con Super-Signal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce) y expuestas a films X-OMAT™ (Kodak, Rochester, NY) o analizadas con LAS-3000 Fujifilm.

8. FORMACIÓN DE CASQUETES O CAPS EN LA SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS T

Todo el procedimiento aquí descrito se realiza a 4 °C sino se especifica otra temperatura.

Experimentos de co-capping de CD5 o CD6 con otras moléculas de superficie: 1×10^6 linfocitos de sangre periférica (PBL, *peripheral blood lymphocytes*) fueron incubadas 10 min con dosis saturantes de AcMo biotinizados anti-CD6 o anti-CD5. Tras ser lavadas con PBS frío, las células fueron incubadas con dosis saturantes de TR-SAv 10 min. La inducción de la modulación o *capping* se hizo por incubación de las células a 37 °C durante 30 min, mientras que la situación basal se mantuvo en hielo. Se paró la formación de los *caps* con PBS frío 0,1 % azida. Las células fueron transferidas a cubres previamente tratados con PLL y dejadas caer 30 min en frío. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS frío y las células se fijaron 10 min a TA con 2 % paraformaldehído. Tras ser lavadas con tampón tris salino (TBS, *Tris buffered saline*), fueron teñidas con los AcMo conjugados a FITC anti-CD5, anti-CD6, anti-CD43 o anti-CD3, diluidos a la mitad en PBS, durante 30 min y transferidas a portas con Mowiol 4-88 (Calbiochem, La Jolla, CA, USA).

Experimentos de co-capping de CD6 y syntenin-1: se utiliza la misma técnica arriba explicada con alguna variación. La modulación se realiza con AcMo anti-CD6 (161.8) más GAMlg conjugado a FITC. Tras la fijación se permeabilizan las células con 1 % Tritón-X-100 durante 1 min y se lavan 3 veces con PBS. Syntenin-1 se tiñe con un anti-suero de conejo específico más GARlg-Cy3.

Experimentos de co-capping de CD6 y rafts: también se realiza la misma técnica con variaciones. La modulación de CD6 se realiza con un anti-suero de conejo anti-CD6 más GARlg-Cy3. Las células antes de ser fijadas son incubadas 1 min a TA con CTX-FITC (1/100). Finalmente las células son lavadas y fijadas como se ha explicado.

Todas las preparaciones son observadas con microscopio confocal espectral (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Las imágenes fueron analizadas con el Software de procesamiento de Imágenes de Leica y Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA).

9. CO-MODULACIÓN DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE

1×10^6 PBL fueron incubadas en 500 μ l de RPMI 10 % FCS con 3 μ g de AcMo Cris-1 (anti-CD5) (modulación de CD5) o 161.8 (anti-CD6) (modulación de CD6) durante 30 min en hielo. Después fueron lavadas en PBS frío dos veces e incubadas de nuevo con 500 μ l de RPMI 10 % FCS con 3 μ l de GAMlg-FITC. Tras dos lavados con PBS frío, finalmente las células fueron incubadas toda la noche a 37 °C para que los inmuno-complejos pudieran ser internalizados. Al día siguiente parte de las células son analizadas directamente por citometría de flujo (FACScan, BD Bioscience), son el control de internalización. Las demás células fueron incubadas con AcMo anti-CD5 (si habían sido moduladas para CD6) o anti-CD6 (si habían sido moduladas para CD5) biotinilados más SAV-TC, antes de ser analizadas por FACS. Otro 1×10^6 PBL fueron incubadas con 500 μ l de RPMI 10 % FCS sin Ac toda la noche a 37 °C y al día siguiente teñidas con Cris-1 (anti-CD5) o 161.8 (anti-CD6) más GAMlg-FITC y utilizadas como control de expresión de CD5 y CD6. Las incubaciones de toda la noche se hicieron en placa de 24 pocillos en 500 μ l de RPMI 10 % FCS.

10. MEDICIÓN DE FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*)

10.1. Bases

Esta técnica se basa en la capacidad de ser transferida energía entre dos fluorocromos o proteínas fluorescentes cuando están a una distancia menor de 100 Å (1-10 nm), distancia sugestiva de asociación física. El fluorocromo (o proteína fluorescente) denominado donador, es excitado y entonces emite luz en una frecuencia que ha de coincidir con la frecuencia de excitación del fluorocromo denominado aceptor, por ello no se puede utilizar cualquier pareja de fluorocromos o proteínas de fusión fluorescentes. Si la distancia entre ambos fluorocromos, es menor a 100 Å, el fluorocromo aceptor puede ser excitado por la energía liberada por el donador (**Fig. III.2**). Así el fluorocromo aceptor libera a su vez luz que es la que nosotros captamos y se denomina FRET. Si la distancia es mayor la fluorescencia emitida por el donador no puede alcanzar al aceptor y no se produce FRET.

Además por el hecho de utilizar marcadores fluorescentes, no solo sirve para determinar si existe asociación física entre dos proteínas, sino también localizar el lugar de la célula en la que se está produciendo la interacción.

En nuestros experimentos de FRET hemos utilizado la pareja de fluorocromos FITC como donador y Cy3 como aceptor, cada uno unido a un Ac específico.

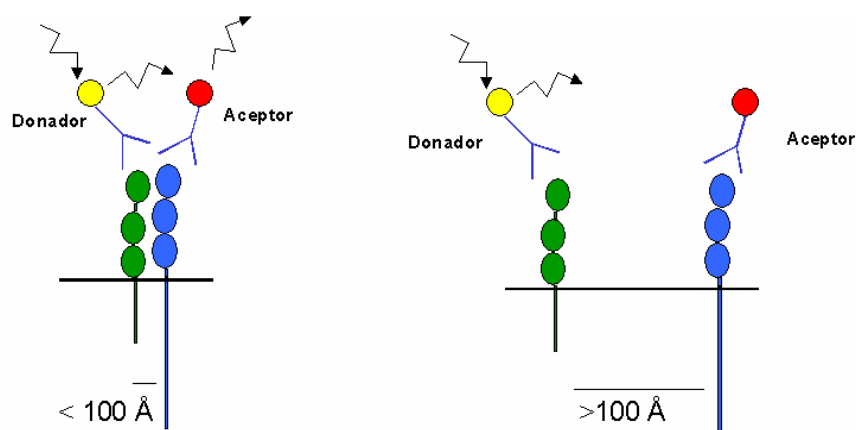


Figura III.2. Técnica de FRET. Aquí se muestra en esquema de la superficie de un linfocito donde se ha representado CD5 en verde y CD6 en azul. El Ac anti-CD5 (amarillo) actúa como donador y el Ac anti-CD6 (rojo) como aceptor. Izquierda, cuando CD5 y CD6 están cerca se produce transferencia de energía del fluorocromo donador excitando al fluorocromo aceptor, que entonces emite luz. (FRET). Derecha, cuando las moléculas de CD5 y CD6 están distantes no se produce la transferencia de energía entre los fluorocromos.

10.2. Técnica

1×10^6 PBL son transferidas a cubres cubiertos de PLL. Tras el bloqueo con 1 % de suero de conejo inactivado 10 min a TA, las células se incuban 15 min a 4 °C con dosis saturantes de AcMo marcados con FITC (donador) o con Cy3 (aceptor) tanto combinados como solos. Las células son fijadas con 2 % paraformaldehído 10 min a TA y lavadas dos veces con TBS antes de ser transferidas a portas con Mowiol.

Para la medición de FRET en situación de *capping* las células son incubadas con AcMo anti-CD3 marcado o no con Cy3 más GAMlg y moduladas a 37 °C. Las células se lavan dos veces con PBS frío con 0,1 % azida y transferidas a cubres con PLL. Tras ser fijadas se incuban con AcMo conjugados a FITC y se transfieren a portas con Mowiol.

Las mediciones de FRET se basan en el método de emisión sensible (337, 338) con modificaciones menores. Se utilizó un microscopio espectral confocal Leica TCS SL laser-scanning equipado con láseres de argón y verde HeNe, objetivo x100 de inmersión en aceite, y filtro triple dicróico (488/543/633 nm). Para medir el FRET, se adquirieron tres imágenes en el mismo orden en todos los experimentos: 1) canal de FITC (absorbancia 488 nm, emisión 500-555 nm), 2) canal de FRET (absorbancia 488, emisión 590-700 nm) y 3) canal de Cy3 (absorbancia 543, emisión 590-700 nm). El fondo fue sustraído de las imágenes antes de calcular el FRET. Las imágenes de los controles y los casos se tomaron bajo las mismas condiciones de fotomultiplicador, apertura y compensación (*offset*). El cruce entre la fluorescencia del donador y aceptor a través del filtro de FRET es una proporción constante entre los niveles de intensidad de fluorescencia del donador y el aceptor y su contaminación (*bleed-through*). Para calcular el *bleed-through* espectral del donador y aceptor a través del filtro de FRET, se tomaron imágenes de células solo marcadas con FITC o solo con Cy3 bajo las

mismas condiciones del experimento. La fracción de *bleed-trough* de las fluorescencias FITC (A) y Cy3 (B) a través del canal de FRET se calculó para diferentes condiciones de marcaje y situaciones. Para las condiciones basales: anti-CD3-FITC, 0.13 ± 0.0224 ; anti-CD43-FITC, 0.13 ± 0.020 ; anti-CD6-FITC, 0.13 ± 0.022 ; anti-CD5 más FITC-GAMlg, 0.12 ± 0.015 ; anti-CD5-Cy3, 0.56 ± 0.043 . Para las condiciones de capping: anti-CD43-FITC, 0.11 ± 0.011 ; anti-CD6-FITC, 0.10 ± 0.01 ; anti-CD5-FITC, 0.11 ± 0.01 ; y anti-CD3-Cy3, 0.54 ± 0.03 .

El FRET corregido ($FRET^c$) fue calculado en una base píxel-por-píxel para toda la imagen usando la ecuación: $1) FRET^c = FRET - (A \times FITC) - (B \times Cy3)$, donde FRET, FITC y Cy3 corresponden a las imágenes sustraídas de fondo de las células marcadas con conjugados de AcMo marcados con FITC y Cy3 a través de los canales de FRET, FITC y Cy3 respectivamente. Las imágenes de intensidad de $FRET^c$ fueron renormalizadas de acuerdo con la tabla *lookup*, en la que los valores mínimos y máximos son mostrados como azul o rojo, respectivamente. Las medias de los valores de $FRET^c$ fueron calculados de las medias de fluorescencias de cada una de las 10 regiones de interés (ROI, *regions of interest*) seleccionadas a partir de 5 células diferentes de acuerdo con la ecuación 1. Los valores de $FRET^c$ fueron relacionados con los del fluorocromo donador (FITC), ya que la expresión de CD6 es menor que la de CD43 en PBL. Regiones con ratio FITC/Cy3 altos o bajos (ej. fuera del rango de estequiometría de 1:1 a 1:4) fueron excluidos del análisis.

La eficiencia aparente de FRET (E_a) fue calculada de acuerdo con la ecuación: $2) E_a = FRET^c/FITC$, donde $FRET^c$ y FITC son las intensidades medias de $FRET^c$ y FITC en las ROI. Estos cálculos permiten que la E_a sea < 0 . Todos los cálculos se realizaron con el Software de el Procesador de Imágenes Leica Confocal y Microsoft Excel. El análisis estadístico se realizó con SPSS (Chicago, IL). Los resultados fueron graficados mostrando la media \pm desviación estándar (SD) y los percentiles 25 y 75. Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron probadas con el test no-paramétrico U de Mann-Whitney. Un valor de $p < 0.001$ fue tomado para indicar significancia estadística.

11. CONJUGADOS DE CÉLULAS T-CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO (APC)

11.1. Bases

Esta técnica consiste en formar conjugados celulares entre células T y APCs de forma antígeno específica, así se produce una reorganización de las moléculas en la zona de contacto entre las dos células originando una SI. Como la probabilidad de que se produzca dicho reconocimiento antigénico específico de forma natural es baja, se cargan las células APCs con un superantígeno (ej. SEB, SEE), el cual tiene la capacidad de interactuar directamente con el TCR de la célula T remedando un reconocimiento antigénico específico. Se pueden utilizar

combinaciones de LT normales con DC o combinaciones de células leucémicas como las células Jurkat (célula T) con las células Raji (célula B). En el caso de LT-DC para aumentar el rendimiento de la técnica se ha de crear previamente una población de LT sensible al superantígeno con el que se cargarán las DC, que en nuestros experimentos es SEB. En los conjugados de células leucémicas se utiliza un subpoblación de las células Jurkat que expresan un TCR determinado que puede ser unido por el superantígeno SEE, con el que se cargarán las células Raji. Las células se ponen entonces en contacto a 37°C dejando que se induzca la formación y maduración de la SI durante 30 min y posteriormente se analizan los conjugados celulares.

Si se quiere realizar un análisis de la localización precisa de una proteína en una SI madura se pueden utilizar diferentes marcadores. Así en nuestros experimentos de tinción dobles hemos utilizado la localización del complejo CD3/TCR en la zona central de la SI (cSMAC) y la localización de ICAM-1 en el pSMAC como referencia para analizar la localización de las proteínas de nuestro interés.

Para el estudio de la maduración de la SI, se pueden utilizar los marcadores anteriores o, lo que hemos utilizado en la mayoría de nuestros experimentos, la translocación del MTOC hacia la zona de contacto entre la célula T y B. Esto es un evento que se produce de forma tardía durante la maduración de la SI (a partir de los 15 min), a diferencia de la localización del complejo CD3/TCR en el cSMAC que se produce en los primeros 5 min del contacto.

11.2. Conjugados de Células T-Células Dendríticas

Se utilizan DC derivadas de monocitos y generadas como se describe en (339). De forma resumida, monocitos de sangre periférica fueron aislados y cultivados durante 5 días en presencia de IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN) y GM-CSF (R&D Systems) 10 ng/ml y 1000 U/ml, respectivamente. Entonces se añadió lipopolisacáridos (LPS) (10 ng/ml) (Sigma-Aldrich) por 36 h. El fenotipo de las DC maduras se confirmó que era CD1a^{high}, CD14^{low}, y CD83^{high} por análisis de citometría de flujo. Células T primarias policlonales específicas para SEB se generaron como se indica en (61). La clona S3085B (S3) de células T se obtuvo por dilución al límite de la población policlonal SEB específica de células T.

DC maduras fueron incubadas 20 min a 37 °C con 1 µg/ml SEB en RPMI. Células T S3 se mezclaron con las DC y se incubaron 15 min a 37 °C. La mezcla celular se depositó sobre cubres tratados con fibronectina (20 µg/ml) durante 10-30 min a 37 °C. Seguidamente las células fueron fijadas con 4 % formaldehído 5 min. Para los experimentos de fluorescencia las uniones no específicas se bloquearon PBS + 1 % Ig humana. Los conjugados se tiñeron para CD6 con MAE1-C10 más GAMIg-Alexa Fluor 488. Los conjugados fueron examinados con fotomicroscopio DMR (Leica Microsystems) y las imágenes adquiridas con el software Leica QFISH 1.0. También se obtuvieron imágenes DIC (*Differential Interference contrast*).

11.3. Conjugados de Células J77-Células Raji para la detección de CD5 y CD6 en la sinapsis inmunitaria

Estos conjugados célula T-APC se generaron por la utilización de las células Jurkat que expresan el TCR V β 8 (J77c120) y las células B Raji en presencia o ausencia de SEE, como se describió previamente en (31). De forma breve, las células Jurkat J77 fueron cargadas con CMAC 20 min a 37°C y posteriormente lavadas tres veces. Las células Raji (5×10^6 células/ml) fueron resuspendidas en solución de Hanks' e incubadas 20 min en presencia o no de SEE (5 μ g/ml). Las J77 (5×10^4 células/situación) fueron mezcladas con igual cantidad de Raji en un volumen final de 600 μ l y tras un pulso a 4000 r.p.m. de 1 min, incubadas por 30 min antes de ser puestas en cubres pre-tratados con PLL. Se dejaron caer las células por 10 min a 37 °C, se fijaron y bloquearon con 100 μ g/ml IgG humana antes de ser teñidas con AcMo anti-CD5 (Cris-1 o Leu-1) o anti-CD6 (MAE1-C10 o 161.8) más GAMlg-FITC. Los conjugados se observaron en fotomicroscopio DMR de Leica. Las imágenes fueron adquiridas con el software Leica QFISH 1.0. Los conjugados fueron primero identificados por observación directa bajo DIC y ultravioleta para identificar la fluorescencia azul de las J77 marcadas con CMAC.

11.4. Conjugados de Células J77-Células Raji para la detección de proteínas en el cSMAC

Estos conjugados celulares las células Raji fueron cargadas con CMAC 20 min a 37°C (3×10^6 células/ml RPMI) y lavadas 3 veces. Entonces fueron resuspendidas en RPMI e incubadas 20 min en presencia de SEE (5 μ g/ml). Se mezclaron las células Raji y las J77 y se repitió el procedimiento anterior. Los conjugados fueron doblemente teñidos: para CD5 o CD6, con la misma combinación de AcMo de arriba, y para ICAM-1 o CD3 (utilizados como marcadores de pSMAC o cSMAC, respectivamente) de la siguiente forma: para ICAM-1 con AcMo anti-ICAM-1 biotinilado más SAV-RR, para CD3 con anti-suero policlonal de conejo anti-CD3 ζ más GAMlg-RR tras ser permeabilizadas las células con 1 % tritón-X-100 durante 1 min.

En el caso en que se investiga la presencia de ALCAM en el cSMAC los conjugados son teñidos con un AcMo anti-ALCAM marcado con PE en combinación con un AcMo anti-CD3 marcado con FITC.

Para la investigación de la presencia de syntenin-1 en el cSMAC se utilizaron unas células J77 transfectadas con el vector GFP-CD3 ζ . Se realizaron el mismo tipo de conjugados y se teñió syntenin-1 con una anti-suero anti-syntenin más GAMlg-Cy3 tras ser permeabilizadas las células con 1% Tritón-X-100. Todos los conjugados se observaron y analizaron con las condiciones descritas en el apartado 11.3.

11.5. Ensayo de maduración de la sinapsis inmunitaria

Para los ensayos de inhibición de la maduración de la SI, las células Raji marcadas con CMAC y SEE fueron incubadas o no con 10 µg/ml de las proteínas recombinantes solubles (rs) CD5 (rsCD5) o CD6 (rsCD6) o albúmina. Entonces, sin lavar, fueron añadidas las células J77, se hizo un pulso de 1 min a 4000 r.p.m. y los conjugados fueron preparados, fijados y permeabilizados tal como se explica arriba. Los conjugados fueron teñidos para α -tubulina (con AcMo anti- α -tubulina-FITC) o para CD3 ζ (con suero policlonal anti-CD3 ζ más GAMlg-RR) por 30 min a TA. Entonces los conjugados fueron observados en microscopi confocal (Leica) y se contaron los conjugados clasificándolos en aquellos que mostraban o no una reorientación del MTOC, localizándose cerca de la zona de contacto de la célula T y la célula Raji, o un acúmulo de CD3 ζ en la zona de contacto entre las dos células. Se contaron 100 conjugados en cada experimento.

12. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

Los ensayos de proliferación se realizaron en triplicados de pocillos de fondo en "U" en placa de 96 pocillos (Costar, Corning, NY). 1×10^5 PBL fueron incubadas 4 o 7 días a 37 °C en atmósfera húmeda en aire al 5 % de CO₂. Todas las células fueron resuspendidas en X-VIVO 10 (BioWhittaker, Verviers, Belgium) a 2×10^6 células/ml. Se repartieron 50 µl por pocillo y se añadieron los diferentes estímulos dejando siempre un triplicado sin estímulo (control de viabilidad). Los estímulos y sus concentraciones finales por pocillo son: AcMo OKT-3 a 0.5 ng/ml, PHA a 0.125 % (Murex Biotech, Dartford, U.K), Pokewit mitogen (PWM) a 5 µg/ml (Sigma-Aldrich), SEA a 0,1 ng/ml, y células PBL alogénicas irradiadas (Cultivo Mixto unidireccional, CM) a 1×10^5 cel/pocillo. Entonces se añadieron las proteínas rs a diferentes concentraciones (0.02 a 0.125 µM) excepto al triplicado de control de viabilidad y a otro triplicado que se considera el control del estímulo. Las células se dejaron en cultivo 4 días en todos los casos excepto el CM que se dejó 7 días. Tras este periodo las células fueron marcadas con [³H]thymidine (Monavek Biochemicals, Brea, CA) las últimas 16 h de cultivo y recogidas en un colector celular automático y analizados en el Beta-plate de Beckman. Los resultados se presentan como media y SD cpm.

13. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES SOLUBLES

El dominio extracelular de CD5 fue expresado en células HEK 293-EBNA con un sistema de expresión episomal (340).

El ectodominio de CD6 fue expresado de la misma manera. La zona extracelular fue amplificada por PCR con la pareja de oligonucleótidos Fw y Rv 5'-CTTCTAGATGACCAGCTCAACACCACCAGCA-3' y 5'-GCGGATCCCTATTCTATAGTGACTGTCTGAACA-3' y a partir del cDNA CD6-PB1 (300). El producto de la PCR fue clonado *XbaI/BamHI* en el vector pCEP-Pu. La construcción resultante fue transfectada en HEK 293-EBNA como se describió en (341, 342) (**Fig. III.3**). A los tres días de la transfección se incorporó puromicina al medio (antibiótico de selección de células transfectadas). Cuando las células están confluentes cada dos días se recoge el medio del cultivo, donde están las proteínas rs producidas, y se añade medio nuevo. La proteína rsCD6 producida fue purificada por afinidad en una columna de Sepharose CNBr-activada 4B copulada con el AcMo 161.8 (anti-CD6). La biotilización de las proteínas rs se realizó como se describió en (340).

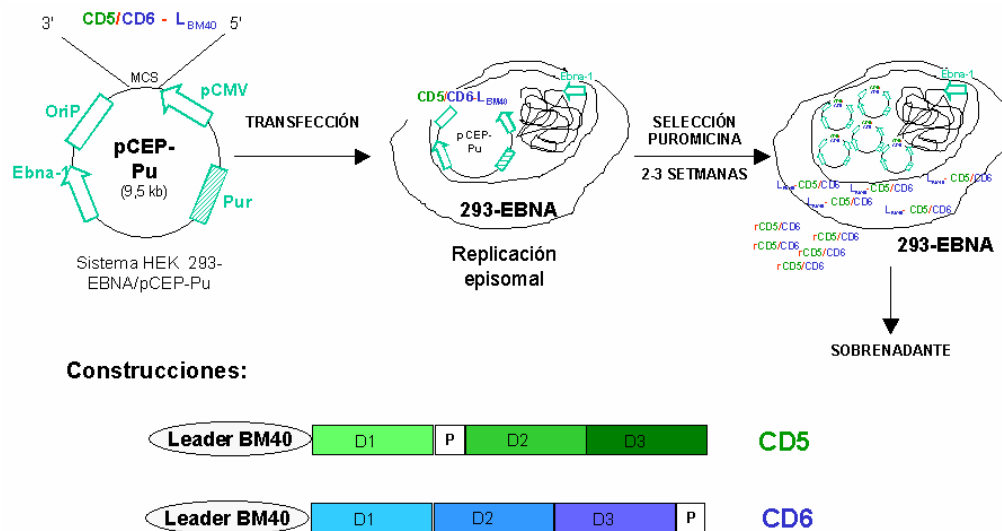


Figura II.3. Producción de proteínas recombinantes solubles. En la parte superior se muestra un esquema de la clonación del cDNA codificante para CD5 y CD6, la transfección en células HEK 293-EBNA y la posterior recogida del sobrenadante donde se acumula las proteínas producidas. En la parte inferior se muestra un esquema de las construcciones utilizadas. D, dominio SRCR. P, zona peptídica.

14. TÉCNICA DE DOBLE HÍBRIDO

14.1. Bases

Esta técnica se basa en utilizar levaduras como tubo de ensayo. Consiste en la utilización de unas levaduras previamente modificadas con la incorporación a su genoma de dos genes llamados *reporter*. A estas levaduras se les introduce dos plásmidos, uno que codifica para la proteína de interés, fusionada al BD del FT Gal4, y el otro plásmido que pertenece a la llamada

librería de cDNA, contiene una secuencia de DNA codificante para una proteína desconocida unida al AD del FT Gal4. Estos plásmidos traducirán las dos proteínas híbridas, de ahí el nombre de doble híbrido. Si se produce la interacción entre la proteína de interés y la proveniente de la librería se reconstituye el FT Gal4 y entonces se activa la transcripción de los genes *reporter*, los cuales fenotípicamente se traducen por crecimiento de las levaduras en medios restrictivos en histidina (gen HIS3) o cambiar la coloración de las clonas a azul en presencia de X-gal (gen lacZ) (**Fig.II.4**). Esta técnica es bastante sensible e incluso permite detectar interacciones que están por debajo de los límites de detección de métodos *in vitro* como la IP (lo cual puede dificultar estudios posteriores que corroboren dicha interacción). También permite el estudio *in vivo* de la interacción y no necesita de Ac.

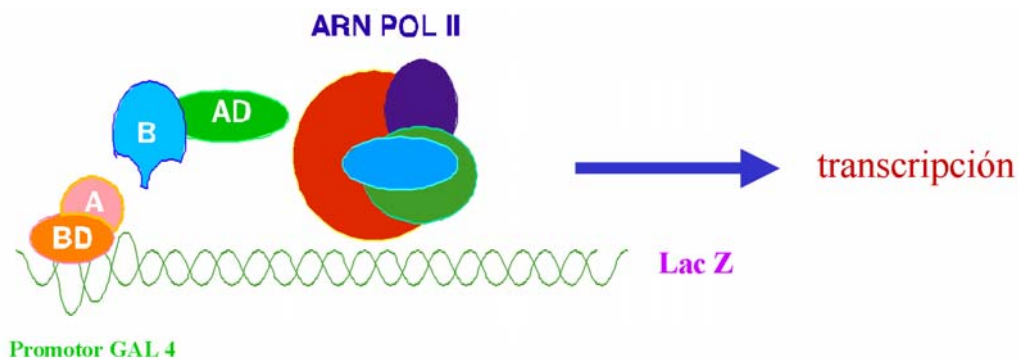


Figura II.4. Esquema de del funcionamiento de la técnica de doble híbrido. Si se produce una interacción de las proteínas A y B se reconstituye el FT Gal4 permitiendo la transcripción de los genes *reporter*.

14.2. Técnica

La librería de cDNA obtenida a partir de linfoma murino de células B K46 que expresan IgG_{2a} (268) fue proporcionada por KS Campbell. Este cDNA fue direccionalmente clonado en el vector pPC86 (335) a continuación del AD del FT Gal4. La librería de cDNA, en el vector pPC86, fue co-transformada con la construcción E1213, clonada en el vector pPC62, en las levaduras HF7c (343), que contiene integrados el gen *reporter* HIS3 de crecimiento en medios deficitarios de histidina (-H), utilizando el procedimiento de acetato de litio (344). Las clonas positivas fueron aisladas por crecimiento en medios -H y el cDNA de la levadura fue extraído, secuenciado y transformado de nuevo. Para los ensayos de interacción directa las levaduras HF7c fueron co-transformadas con las construcciones indicadas y analizadas por crecimiento en medios -H.

Como control de transformación o co-transformación se utiliza la capacidad de crecimiento de las levaduras en medios restrictivos en leucina (-L) o treonina (-T), adquirida por la incorporación de los vectores pPC62 y pPC86 respectivamente.

Antes de iniciar los experimentos de doble híbrido se analizó si las diferentes construcciones en pPC62 producían transactivación espontánea del gen reporter HIS3. Para ello fueron transformadas solas o co-transformadas con el vector pPC86 vacío en las levaduras y se analizó el crecimiento en los respectivos medios deficitarios.

15. AISLAMIENTO DE RAFTS

15.1. Bases

Existen numerosos métodos para estudiar y aislar los *rafts*, aunque algunos de ellos requieren tecnología avanzada. Tradicionalmente se ha conseguido aislar *rafts* del resto de la membrana de la célula aprovechando su capacidad de ser insolubles en detergentes no-iónicos, por ello también se han denominados DIM (membranas insolubles en detergentes) (345). Debido a su alto contenido en lípidos los *rafts* flotan a baja densidad en gradientes de centrifugación en varios medios (346-349). Las resultantes fracciones de *rafts* de baja densidad están enriquecidas no solo en colesterol y glicoesfingolípidos, sino también en múltiples proteínas ya sea ancladas a GPI (348, 349), de transmembrana o citosólicas. Tradicionalmente se describió el aislamiento de *rafts* con gradientes de sucrosa de lisados celulares en el detergente tritón X-100, que es el que hemos utilizado en nuestros experimentos. Pero se ha de tener en cuenta que la composición de los *rafts* varía según el detergente utilizado, así se recomienda utilizar los detergentes Brij si lo que se quiere estudiar es el TCR, ya que preserva mejor los complejos proteicos.

15.2. Técnica

Todo el procedimiento se realiza en frío. 600×10^6 PBLs son lavadas y resuspendidas en tampón de homogenización (TH) que contiene 25 mM de TrisCl pH 7,6, 150 mM NaCl y 5mM de EDTA. Tras ser incubadas 5 min a 37 °C con 10 µg/ml de AcMo 161.8 o sin Ac las células son lavadas en TH frío y lisadas en 0.5 ml de TH con 1% Tritón X-100 (Merck, Darmstadt, Germany). El lisado se deja 30 min en hielo y se homogeneiza por 20 pasos por jeringa de 23G. Se mezcla el homogeneizado celular vol/vol con sacarosa al 85 % y se deposita en el fondo de un tubo de Beckman de 5 ml. Se cubre con 2 ml de sacarosa al 30 % y finalmente se pone 1 ml de sacarosa al 5 %. Las diferentes concentraciones de sacarosa se realizan con TH y se añaden con cuidado para no romper la interfase de las diferentes capas. Los tubos se centrifugan durante 18 h a 39,000 r.p.m a 4 °C. Se recogen fracciones de 0.5 ml y se procesan o se congelan a -20 °C. Se analizan las diferentes fracciones (30 µl de cada) por dot para investigar la presencia de GM1 (esfingolípidos residente en *rafts*) con CTX-HRP. Para investigar la presencia de CD6 se corren 40 µl del lisado en condiciones reductoras en 8% SDS-PAGE,

se transfieren las proteínas a membranas de nitrocelulosas y se hibrida con anti-suero de conejo anti-CD6 intracelular más GARlg-HRP. Tras un *stripping* con 200mM de NaOH, se comprueba la presencia de CD5 con un anti-suero anti-CD5 más GARlg-HRP y de actina con un AcMO anti-actina más GAMlg-HRP: Todas las membranas son reveladas con quimioluminiscencia de Pierce.

16. COALESCENCIA DE RAFTS

Bolas de látex de 6 μ (Sigma-Aldrich) son lavadas en PBS e incubadas toda la noche en frío y rotación con 10 μ g/ml de OKT-3 o 1 μ g/ml de OKT3, este último solo o combinado con 10 μ g/ml de CD28.2 (anti-CD28) o 161.8 (anti-CD6). Posteriormente se lava el excedente de AcMo y se comprueba la unión del AcMo por FACS. Las bolas de látex se incuban con células a razón 2:1 durante 30 min a 37 °C. La mezcla se deja caer sobre cubres tratados con PLL durante 10 min a TA, se fija con paraformaldehído al 2% por 10 min y tras ser lavados con TBS se procede a la tinción de los *rafts* con CTX-FITC. Las preparaciones son observadas en microscopio de fluorescencia y las imágenes se analizan con photoshop.

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LAS ASOCIACIONES MOLECULARES DE CD6 EN LA SUPERFICIE DE LOS LINFOCITOS T

Introducción

Tras la unión del TCR al antígeno específico presentado por la APC se produce una señal hacia el interior de la célula que ha de ser finamente regulada para que se produzca una correcta activación y/o diferenciación de los linfocitos T. En esta regulación participan las denominadas moléculas accesorias, entre las que se encuentran CD2, CD4, CD8, CD9, CD28, CD43, CD45, etc y también CD5 y CD6. Estos receptores han de ejercer su función de forma coordinada y por ello se sugirió una posible asociación física entre ellos, formando complejos moleculares funcionales, que permitiera esta inter-relación (310). En este sentido investigaciones posteriores describieron la asociación física de CD5 con CD2 y la implicación de ambos en la diferenciación timocítica (229, 350), así como la asociación de CD5 con el propio complejo CD3/TCR (226) permitiéndole influir de forma directa en la activación de las células T. Así nos planteamos investigar si CD6, como molécula accesoria, también podría realizar este tipo de asociaciones en la superficie de los linfocitos T, formando parte de algún complejo molecular. Iniciamos la investigación de posibles receptores asociados a CD6 incluyendo CD5 y el complejo CD3/TCR, entre otros receptores. En estas investigaciones fueron realizados estudios de co-inmunoprecipitación de proteínas a partir de lisados de células biotiniladas en superficie y solubilizadas con diferentes detergentes, análisis por FRET y estudios de modulación (*capping* e internalización de proteínas). El uso de diferentes detergentes está justificado por su diferentes capacidades de solubilización, así es conocido que los detergentes tipo Brij preservan mejor ciertas asociaciones moleculares como el complejo CD3/TCR (351). En conjunto estos estudios nos permitieron describir la asociación física de CD6 al receptor CD5 y el complejo CD3/TCR, así como sugerir una posible asociación a otros receptores linfocitarios como CD44 e ICAM-3.

1.1. Las moléculas accesorias CD5 y CD6 se asocian en la membrana de las células T

1.1.1. Los receptores CD5 y CD6 co-inmunoprecipitan en linfocitos T normales y leucémicos

La posible asociación de CD5 y CD6 en la membrana de los linfocitos se exploró por experimentos de co-inmunoprecipitación (IP) de proteínas de superficie biotinadas solubilizadas bajo diferentes condiciones de detergentes (1% Brij96 o 1% NP-40). La presencia de CD6 en los IP de CD5 fue investigada por reprecipitación con un anti-suero policlonal anti-CD6. De la misma forma se realizó el experimento inverso en el que se investigó la presencia de CD5 en los IP de CD6. Experimentos realizados con la línea celular T leucémica, HUT-78, mostró dos bandas de 105 y 130 kDa en los IP de CD5 de lisados con Brij 96 pero no con NP-40 (**Fig. IV.1A.**). Así mismo no se detectaron estas bandas en los IP de HLA clase I y CD3 a partir de lisados con Brij 96 (**Fig. IV.1B.**). Las bandas observadas se corresponden con la masa molecular reportadas para CD6, por la que existe una forma no fosforilada de 105 kDa que rápidamente cambia a una forma fosforilada de 130 kDa por la exposición a suero o activadores de PKC (302, 306). En los inmunocomplejos de CD6 se re-IP con un anti-suero específico para CD5 una banda de 67 kDa (**Fig. IV.1A.**). Los experimentos de deplección mostraron que la extracción de los lisados de las proteínas CD5 o CD6 por IP secuencial impide la co-IP de las dos moléculas (**Fig. IV.1C.**), confirmando que la banda de 67 kDa y la de 105-130 kDa detectadas por nuestros sueros policlonales específicos corresponden a CD5 y CD6, respectivamente. Otros experimentos realizados con timocitos y linfocitos de gánglios linfáticos biotinados en superficie demostraron la asociación de CD5 y CD6 en células T normales (**Fig. IV.1D.**).

1.1.2. La asociación de CD5 y CD6 es independiente de la co-expresión de otros receptores linfocitarios de superficie y de la región intracelular de CD5

Se conoce que CD5 se asocia a otros receptores linfocitarios (CD2, CD3, CD4, CD8, y CD9) bajo condiciones de solubilización de la membrana celular del detergente Brij 96 (227, 229, 230). Así, utilizamos un ambiente heterólogo para investigar si la co-precipitación de CD5 y CD6 es directa o mediada por alguna otra molécula linfocitaria de superficie. Para este propósito, células COS-7 fueron transfectadas con CD5 completo (CD5.wt) solo o en combinación con CD6 completo (CD6.wt) y después biotinadas en superficie antes de ser lisados con tampón 1% Brij 96. Como se muestra en la figura **Fig. IV.2.**, detectamos una banda de 130 kDa en los inmuno complejos de CD5 solo cuando las células fueron co-transfectadas con CD5.wt y CD6.wt. Este resultado indicaba que las bandas detectadas en nuestros estudios

de re-precipitación corresponden a CD6 y que la asociación de CD5 y CD6 es poco probable que sea mediada por alguno de aquellos receptores de superficie previamente descritos como asociados a CD5. La implicación de la región citoplasmática de CD5 fue también investigada mediante similares experimentos en COS-7 transfectadas con una forma de CD5 con una delección parcial de su región citoplasmática (CD5.K378^{Stop}). Esta forma truncada fue capaz de co-IP con CD6, indicando que la zona depleccionada (K378 a L471) es dispensable para la asociación de CD5 y CD6 (**Fig. IV.2.**).

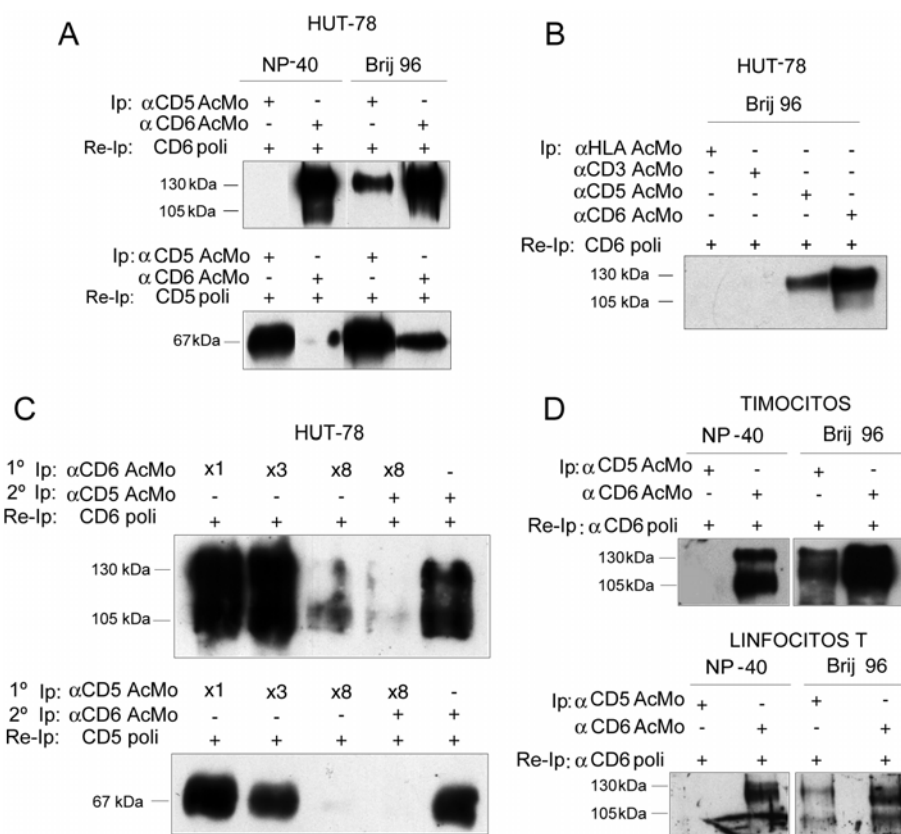


Figura IV.1. CD5 y CD6 co-precipitan de lisados en Brij 96 de células T. **A**, Co-IP de CD5 y CD6 de células T humanas leucémicas. 25×10^6 células HUT-78 fueron biotiniladas en superficie y lisadas con tampón de lisis con 1% NP-40 o Brij 96. Las proteínas CD5 o CD6 fueron IP con AcMo (Cris-1 y 161.8 respectivamente) y re-IP con anti-sueros policlonales contra CD5 o CD6. Los re-IP fueron corridos en un gel SDS-PAGE al 8% en condiciones reductoras y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas biotinadas fueron detectadas por SAV-HRP y reveladas con quimioluminiscencia y expuestas a films de rayos-X. **B**, Asociación específica de CD5 y CD6. Lisados en Brij 96 de 25×10^6 células HUT-78 biotinadas en superficie fueron IP con AcMo específicos contra HLA clase I (W6-32), CD3- ϵ (33-2A3), CD5 (Cris-1) y CD6 (161.8) y reprecipitados con un suero policlonal de conejo contra CD6 como se hizo en A. Las proteínas biotinadas fueron corridas y detectadas también como en A. **C**, Experimentos de deplección de CD5 y CD6. Muestras de HUT-78 (50×10^6) biotinadas en superficie fueron lisadas en tampón de lisis con 1% Brij96, divididas en 2, y sometidas a varias rondas de IP (1, 3, 8) con AcMo anti-CD6 (161.8) o anti-CD5 (Cris-1). Una segunda IP con AcMo anti-CD5 o anti-CD6 fue realizada solo en las muestras señaladas. Todos los IP fueron re-precipitados con anti-sueros de conejo anti-CD5 o anti-CD6. La detección de las proteínas biotinadas en los reprecipitados se realizó por SAV-HRP y revelado por quimioluminiscencia tras ser corrido en geles al 8% SDS-PAGE bajo condiciones reductoras y seguidamente transferidas a membranas de nitrocelulosa. **D**, La co-precipitación de CD5 y CD6 en timocitos y linfocitos de ganglio linfático. Muestras de timocitos (2×10^8) fueron biotinadas en superficie y analizadas como se describe en A.

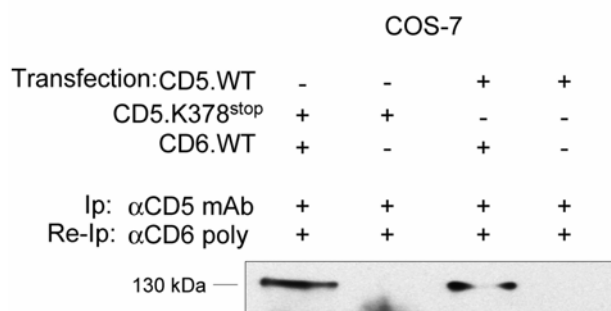


Figura IV.2. Experimentos de co-transfección en células Cos-7. Las células COS-7 fueron transfectadas de forma transitoria con construcciones de expresión para CD6.wt y CD5.wt, y una forma de CD5 con la región citoplasmática truncada (CD5.K378^{stop}) solas o en combinación. Las células transfectadas fueron biotinadas en superficie, lisadas en Brij 96 y sometidas a IP para CD5 (Cris-1). Los inmuno complejos fueron eluidos y entonces re-precipitados con suero policlonal de conejo anti-CD6. La detección de las proteínas biotinadas fue realizada por SAV-HRP en condiciones reductoras y posteriormente transferida a membranas de celulosa.

1.1.3. Medición de la asociación de CD6 y CD5 por FRET

Para descartar posibles artefactos causados por los detergentes, realizamos análisis microscópico de FRET, un método que puede detectar proximidad molecular entre dos proteínas con una resolución de 100 Angstroms (338). Para ello utilizamos un AcMo anti-CD5 marcado con Cy3 como aceptor y una serie de AcMo (anti-CD6, -CD3, y -CD43) marcados con FITC como donadores. Las imágenes de FRET obtenidas para las diferentes parejas de AcMo se muestran en la **Fig. IV.3A.** Se detectó FRET positivo entre los AcMo anti-CD6-FITC y anti-CD5-Cy3, confirmando los datos de asociación entre CD5 y CD6 deducidos de los experimentos de co-IP. De acuerdo con anteriores publicaciones sobre la asociación física de CD5 y el complejo CD3/TCR en la superficie de los linfocitos T (226), también observamos FRET entre AcMo anti-CD3-FITC y anti-CD5-Cy3. Por el contrario, se detectó niveles muy bajos de FRET cuando fueron usados AcMo anti-CD43-FITC y anti-CD5-Cy3, pareja usada como control negativo. Como control de transferencia óptima de energía, incubamos AcMo anti-CD5-Cy3 con GAMIg-FITC. La eficiencia de transferencia de energía entre los fluorocromos FITC y Cy3 medida calculando la señal de FRET sensibilizado (FRET^c) pixel-por-pixel se muestra en la **Fig. IV.3B.** La media de E_a (eficiencia de FRET) más alta se detectó por la unión de AcMo anti-CD5-Cy3 y GAMIg-FITC. Los valores medios de E_a obtenidos por la combinación de AcMo anti-CD5-Cy3 más anti-CD6-FITC y anti-CD5-Cy3 más anti-CD3-FITC fueron similares y tenían significancia estadística cuando eran comparados con la combinación utilizada como control negativo (AcMo anti-CD5-Cy3 más anti-CD43-FITC) (**Fig. IV.3B.**). En conjunto nuestros datos de FRET indican que CD5 está muy próximo, no solo a CD3, sino también a CD6. La proporción de moléculas de CD3 y CD6 que se asocian con CD5 fue estimada como 18 y 12 %, respectivamente, de los valores numéricos presentados en la **Fig. IV.3B.** (asumiendo el 100 % de asociación para GAMIg-FITC/anti-CD5-Cy3 y los niveles

basales de E_a para anti-CD43-Cy3/antiCD5-Cy3). Esta estimación está en concordancia con datos reportados previamente los cuales mostraban que entre el 10 y el 20 % de las moléculas de CD5 están asociadas con CD3 en los linfocitos T humanos (225).

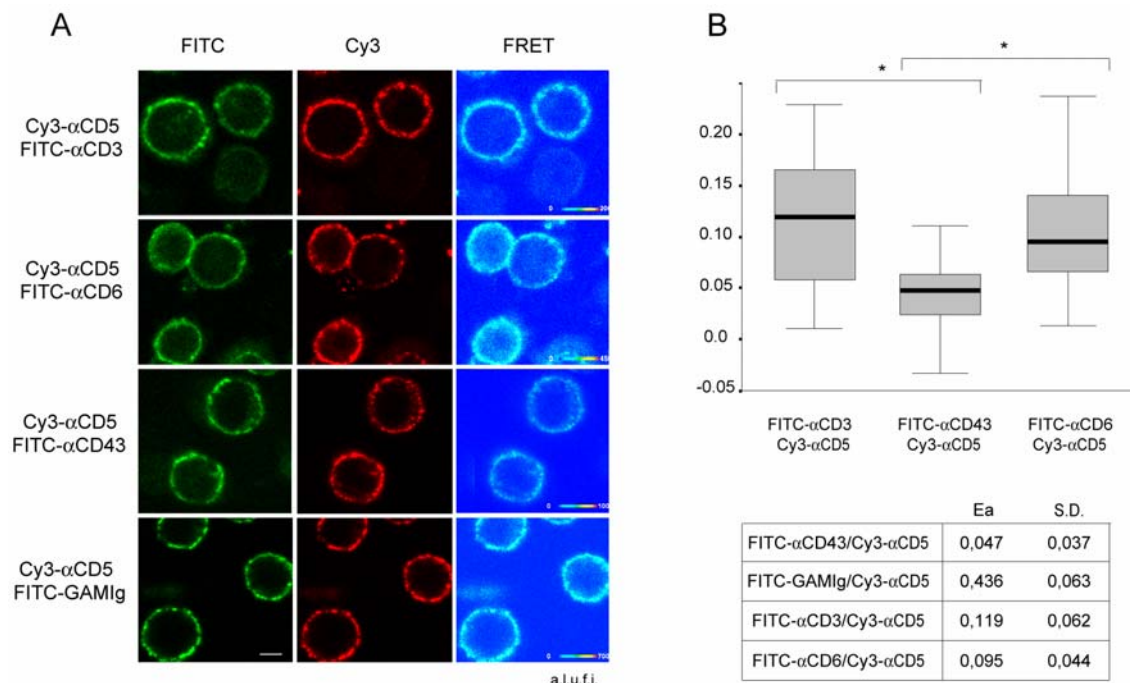


Figura IV.3. Detección de la asociación de CD5 y CD6 por FRET. **A**, PBL fueron teñidas simultáneamente con AcMo anti-CD5-Cy3 (aceptor) y AcMos marcados con FITC (donadores) anti-CD3, -CD6, -CD43 o GAMlg. Las imágenes de FRET^c fueron obtenidas como se describe en el apartado de Materiales y métodos y presentadas como imágenes de pseudocolor moduladas en intensidad. *A.l.u.f.i.*, *arbitrary linear units of fluorescence intensity*. Barra, 2 μ m. **B**, La eficiencia aparente de transferencia de energía entre FITC y Cy3, E_a , fue calculada de varias regiones de membrana (regiones de interés, ROI). Las medias de los valores de $E_a \pm$ S.D. están representados y graficados indicando los percentiles 25 y 75. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) como se deduce del test de Mann-Whitney.

1.1.4. Co-modulación parcial de CD5 y CD6 (*co-capping* y *co-internalización*)

Para re-confirmar que CD5 está asociado físicamente a CD6 en la superficie de los linfocitos T, examinamos la capacidad de las dos moléculas de co-modular utilizando doble inmunofluorescencia. Así investigamos la formación conjunta de un casquete (*cap*) incubando las células con AcMo biotinilados más SAV-TR 30 min a 37 °C, y seguidamente fijadas y teñidas con diferentes AcMo marcados con FITC. Como se muestra en la **Fig. IV.4A.**, se observa formación de un casquete parcialmente conjunto (*co-capping*) entre CD5 y CD6 independientemente de la dirección explorada. Por el contrario no se detectó *co-capping* entre CD6 y CD43 (**Fig. IV.4A.**) ni CD5 y CD43, esto último está de acuerdo con nuestros resultados anteriores que muestran falta de FRET entre las moléculas CD5 y CD43. En concordancia con trabajos anteriores (226) se detectó presencia de CD3 en los *caps* de CD5.

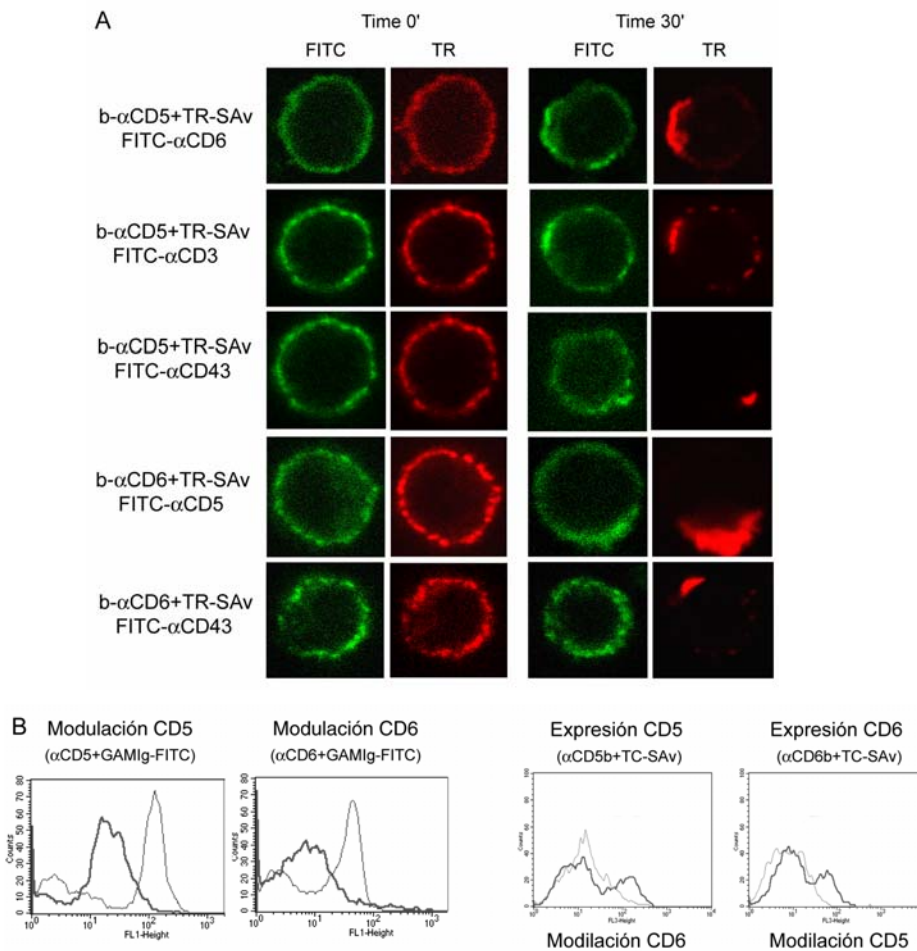


Figura IV.4. Co-modulación de CD5 y CD6. A, Co-capping de CD5 y CD6. PBL fueron incubadas a 37 °C con AcMo biotinados (b) más SAV-TR. A los tiempos 0 y 30 min las células fueron lavadas con PBS-azida frío y teñidas con los AcMo-FITC indicados. Las imágenes muestran la fluorescencia verde (FITC) y roja (TR). **B, co-internalización** de CD5 y CD6. Linfocitos de ganglio fueron inducidos a internalizar las moléculas CD5 y CD6 por incubación durante toda la noche a 37 °C con o sin AcMo específicos más GAMlg-FITC. Tras ese tiempo las células fueron teñidas con AcMo biotinados (b) contra CD5 o CD6 más SAV-Tricolor (TC) y analizadas por citometría de flujo. Los dos histogramas de la derecha muestran la fluorescencia verde (FL1) antes (línea gris) y después (línea negra) de modular las proteínas. Los dos histogramas de la izquierda muestran la fluorescencia roja (FL3) de las células moduladas (gris) o no (negro).

Seguidamente, se investigó si la internalización de uno de los dos receptores (CD5 o CD6) reducía la expresión del otro. Con esta intención, los linfocitos se incubaron toda la noche a 37 °C con o sin AcMo específicos más GAMlg-FITC. Esto resultó en la pérdida total de la expresión del antígeno correspondiente, observado cuando se compara la emisión fluorescente verde (FL1) de las células incubadas con AcMo con la de las incubadas sin AcMo (**Fig. IV.4B.**). Entonces las células fueron teñidas con AcMo biotinados específicos más SAV-tricolor y analizados por fluorescencia roja (FL3). Como se muestra en la **Fig. IV.4B.**, se observó una reducción de la expresión de CD5 en las células incubadas con AcMo anti-CD6 (modulación de CD6), en comparación con la expresión de CD5 de las células no incubadas con AcMo. De

forma similar, también se detectó una reducción de la expresión de CD6 en las células donde se había inducido la internalización de CD5 (modulación de CD5) (**Fig. IV.4B.**). En conjunto los resultados de *co-capping* y co-internalización reafirman nuestras evidencias de la asociación física de CD5 y CD6 en la superficie de los linfocitos.

1.2. El receptor CD6 se asocia físicamente al complejo CD3/TCR

1.2.1. Co-precipitación del complejo CD3/TCR y CD6 en lisados de linfocitos T

El complejo CD3/TCR es fácilmente dissociado por tratamiento con detergentes, aunque detergentes suaves como digitonin o Brij 58 preservan su estructura (351). Así, la posible asociación de CD6 al complejo CD3/TCR fue explorada mediante experimentos de co-IP de células biotiniladas en superficie y solubilizadas bajo diferentes condiciones de detergentes (1% Brij 58, Brij 96 y NP-40). La presencia de CD5, CD6, CD3 y HLA clase I en IP de células HUT-78 fue investigada por reprecipitación con un anti-suero de conejo específico anti-CD6. Como se muestra en la **Fig. IV.5A.**, detectamos la presencia de CD6 en los IP de CD3 solo en los solubilizados con Brij 58. De acuerdo con nuestros resultados anteriores CD6 fue también detectado en los IP de CD5 de lisados con Brij 96 y Brij 58, pero no con NP-40. CD6 no pudo ser detectado en los IP de HLA clase I en ninguna situación (**Fig. IV.5A.**). Experimentos adicionales realizados con timocitos y PBL biotinados en superficie y lisados con 1% Brij 58 confirmaron la presencia de CD6 en los IP de CD3 de células T normales (**Fig. IV.5B.**).

1.2.2. La asociación de CD6 y el complejo CD3/TCR es independiente de CD5

Se ha descrito que CD5 se asocia al complejo CD3/TCR (226, 227) y nuestros resultados anteriores demuestran que también se asocia a CD6. Así la posibilidad de que la asociación de CD6 con el CD3/TCR estuviera mediada por CD5 fue investigada por ensayos de co-IP en células 2G5, una línea derivada de las Jurkat que es CD5⁻CD6⁻CD3⁺ (274). Una clona transfectante que expresaba un forma de la proteína CD6 con la región citoplasmática parcialmente truncada (CD6.A613^{Stop}) (**Fig. IV.6A.**) fue biotinada en superficie y lisada bajo condiciones de Brij 58. Las moléculas de HLA clase I, CD3, CD5 y CD6.613^{Stop} fueron IP con AcMo específicos y re-IP con anti-suero policlonal anti-CD6. Como se muestra en la **Fig. IV.6A.**, la proteína CD6.613^{Stop} fue co-IP de los inmuno complejos de CD3 pero no de los de HLA clase I, CD5 o CD3. Estos resultados indicaban que no solo CD5, sino también los 55 aminoácidos más C-terminal de CD6 eran dispensables para la asociación de CD6 con el complejo CD3/TCR.

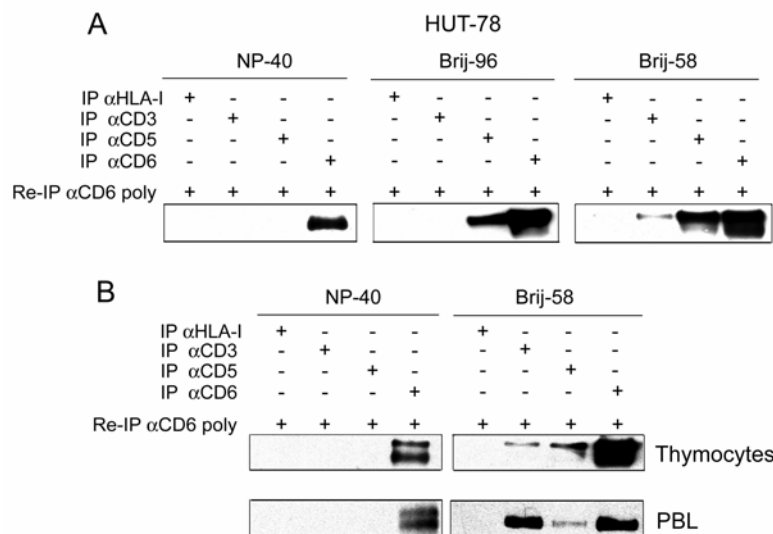


Figura IV.5. CD6 co-IP con CD3 de lisados en Brij 58 de células T normales y leucémicas. **A**, 25×10^6 células HUTT-78 fueron biotiniladas en superficie y lisadas con 1% NP-40, Brij 96 o Brij 58. Las proteínas HLA clase I, CD3 ϵ , CD5 y CD6 fueron IP con AcMo específicos (w6/32, 33-2A3, Cris-1, 161.8 respectivamente) y re-IP con anti-sueros policlona de conejo anti-CD6. Los re-IP fueron corridos en 8% SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas biotinadas fueron reveladas por SAV-HRP y quimioluminiscencia y seguidamente expuestas a films de rayos-X. **B**, Timocitos (2×10^8) y PBL (5×10^7) fueron biotinados en superficie y lisados en tampón con 1% NP40 o Brij 58 y entonces analizados como se describe en el apartado A.

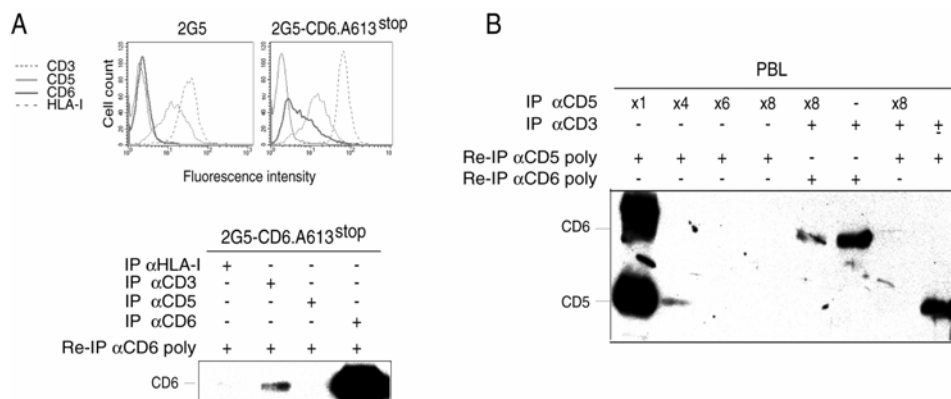


Figura IV.6. Co-IP independiente de CD5 entre CD6 y CD3. **A**, Co-precipitación específica de las moléculas de CD6 y CD3 de células T deficientes de CD5. En la parte superior se muestran los histogramas de la expresión de HLA clase I, CD3, CD5 y CD6 en células 2G5 transfectadas con la construcción CD6.613^{stop}. En la parte inferior se muestra la co-IP de CD6 y CD3 en las células 2G5 transfectadas con CD6.613^{stop}. Un total de 5×10^7 células biotinadas en superficie fueron lisadas en tampón 1% Brij 58 y las moléculas de HLA clase I, CD3 ϵ , CD5 y CD6 fueron IP con AcMo específicos (w6/32, 33-2A3, Cris-1, 161.8, respectivamente). Seguidamente los inmuno-complejos fueron re-IP con suero policlona de conejo contra-CD6. Los re-precipitados fueron corridos en 8% SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas biotinadas fueron reveladas por SAV-HRP y quimioluminiscencia y seguidamente expuestas a films de rayos-X. **B**, Co-IP de CD3 y CD6 en lisados de PBL depleccionados de CD5. PBL biotinadas en superficie (10×10^7) fueron lisadas en tampón 1% Brij 58, dividido en dos, y uno de ellos sometido a varias rondas de IP (x1, x4, x6, x8) con AcMo anti-CD5 (Cris-1). Se sometió a una segunda IP con AcMo anti-CD3 (33-2A3) a los lisados tanto depleccionados como no de CD5. Todos los IP fueron re-IP con suero policlona anti-CD5 o anti-CD6 y revelados como en el apartado A.

Ensayos de inmunodeplección secuencial también confirmaron la asociación independiente de CD5 entre CD6 y CD3/TRC. PBL biotinadas en superficie fueron lisadas con tampón 1% Brij 58, y las moléculas de CD5 fueron extraídas de una de las dos alícuotas de lisado con varias rondas de IP con AcMo anti-CD5. Posteriormente tanto los lisados depleccionados de CD5 como los no depleccionados fueron sometidos a IP con AcMo anti-CD3, y la presencia de CD6 o CD5 fue investigada por re-IP con anti-sueros policlonales específicos. Como se muestra en la **Fig. IV.6B.**, se detectó la presencia de bandas correspondientes a CD6 en los inmuno-complejos de CD3 tanto en los lisados depleccionados como no de CD5. Esto indicaba que al menos una porción de las moléculas de CD6 se asocian con CD3 de forma independiente de CD5. Como control de que la deplección ha sido eficiente se detectó la presencia de CD5 solo en los IP de CD3 no depleccionados de CD5, estando ausente de los depleccionados (**Fig. IV.6B.**).

1.2.3. CD3/TRC se redistribuye parcialmente a los caps de CD6

Al igual que en el estudio de la asociación entre CD6 y CD5, realizamos experimentos de modulación o *capping* para confirmar que la asociación detectada en los experimentos de co-IP no se debía a un artefacto causado por la utilización de detergentes. Así PBL fueron incubadas con AcMo biotinado anti-CD6 más SAV-TR por 30 min a 37 °C, y seguidamente fijadas y teñidas con AcMo marcados con FITC anti-CD3 o anti-CD43. Como se muestra en la **Fig 7**, se observó un *co-capping* parcial entre CD3 y CD6, indicando una posible asociación física entre ambas moléculas. La específica de la asociación viene dada por la falta de *co-capping* con CD6 mostrada por otro receptor de la célula T, como CD43 (**Fig. IV.7.**).

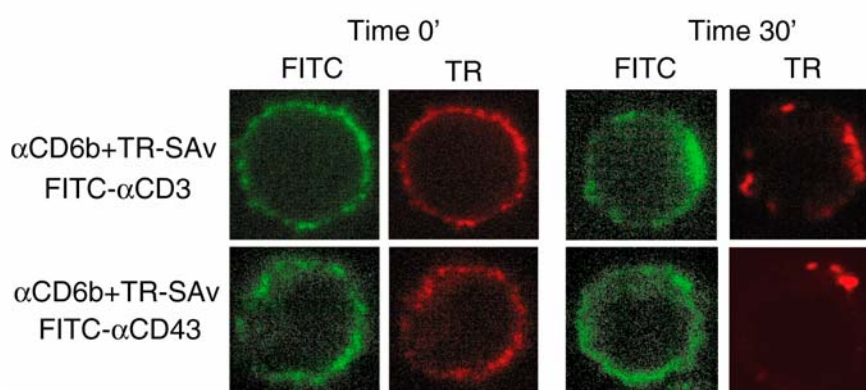


Figura IV.7. Análisis de la asociación de CD3 y CD6 por *co-capping*. PBL fueron incubadas con AcMo anti-CD6 biotinado por 30 min a 37 °C para la formación del *cap*. A tiempo 0 y 30 min las células fueron lavadas con PBS/azida frío, fijadas y teñidas con AcMo marcados con FITC. Las imágenes muestran la fluorescencia roja (TR) y verde (FITC).

1.2.4. Análisis por FRET de la asociación de CD6 con CD3/TCR

Para más confirmación de la asociación física entre CD6 y CD3/TCR en la superficie de los linfocitos, realizamos análisis microscópico de FRET. Como aceptor se utilizó AcMo anti-CD3 marcado con Cy3 y como donadores AcMo anti-CD5, -CD6 y -CD43 marcados con FITC. Las mediciones de FRET entre CD6 y CD3/TCR se realizaron en PBL bajo condiciones de *capping* y fueron comparadas con las obtenidas para CD3/TCR y CD43, dos receptores no relacionados utilizados como control basal, y CD3/TCR y CD5, dos receptores ya descritos como asociados (226), y utilizados como control positivo. Las imágenes de FRET obtenidas para las parejas de AcMo anti-CD6-FITC/anti-CD3-Cy3, CD5-FITC/anti-CD3-Cy3 y CD43-FITC/anti-CD3-Cy3 se muestran en la **Fig. IV.8.** La eficiencia de transferencia de energía entre los fluorocromos Cy3 y FITC medida calculando la señal de FRET sensibilizado (FRET^c) pixel-por-pixel se muestra también en la **Fig. IV.8.** Nuestros resultados muestran que el FRET en los *caps* de CD3 es significativamente mayor para la pareja de AcMo CD6/CD3 que para la pareja CD43/CD3 considerada como control negativo. Estos resultados están en concordancia con la existencia de una asociación física entre CD6 y el complejo CD3/TCR.

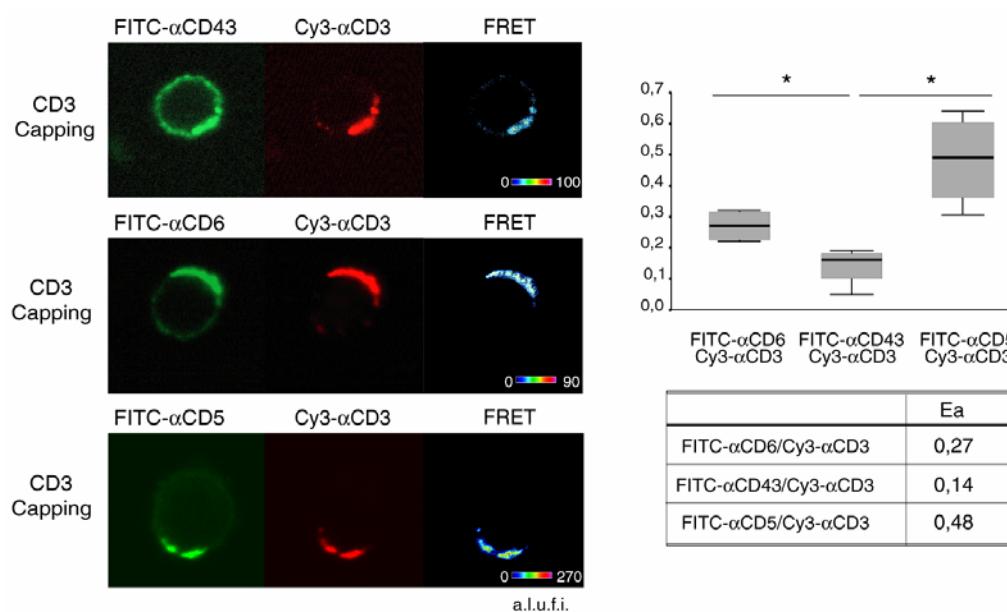


Figura IV.8. Análisis de la asociación CD3/CD6 por FRET bajo condiciones de *capping*. Fue inducida la formación de *cap* en PBL por la incubación de las células durante 30 min a 37 °C con AcMo anti-CD3 marcado con Cy3 más GAMlg sin marcar. Posteriormente las células fueron fijadas y marcadas con AcMo marcados con FITC anti-CD6, -CD43 o -CD5. Las imágenes de FRET^c fueron obtenidas como se describe en el apartado de Materiales y Métodos y presentadas como imágenes de pseudocolor moduladas en intensidad. *A.l.u.f.i.*, *arbitrary linear units of fluorescence intensity*. Barra, 2 μ m. La eficiencia aparente de transferencia de energía entre FITC y Cy3, E_a , fue calculada de varias regiones de membrana (regiones de interés, ROI). Las medias de los valores de $E_a \pm$ S.D. están representados y graficados indicando los percentiles 25 y 75. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) como se deduce del test de Mann-Whitney. Las medias de E_a se muestran en la tabla.

1.3. Asociación de CD6 con CD44 e ICAM-3

1.3.1 Estudios de co-immunoprecipitación de CD6 con CD44 e ICAM-3

Seguindo nuestra búsqueda de posibles receptores de la superficie de los linfocitos T asociados a CD6 realizamos los mismos tipos de experimentos de co-IP en células 2G5 transfectadas con CD6.613^{Stop}. Así estas células fueron biotinadas en superficie y lisadas en tampón con 1% Brij 58. Las moléculas CD3, CD5, CD6, CD44 e ICAM-3 fueron IP con AcMo específico (33-2A3, Cris-1, 161.8, 33-3B3, 152-2D1, respectivamente) y re-IP con un anti-suero policlonal de conejo anti-CD6. Como se muestra en la **Fig. IV.9**, CD6.613^{Stop} fue co-IP con CD3, control positivo, CD44 y ICAM-3, pero no con CD5, utilizado como control de especificidad ya que las células no expresan CD5. Estos resultados orientan a una posible asociación física entre CD6 y CD44 e ICAM-3, para la cual son prescindible los últimos 55 amino ácidos más C-terminales de la región citoplasmática de CD6. La fiabilidad de esta técnica como método de búsqueda de asociaciones moleculares está validado por nuestros resultados de asociación de CD6 con CD5 y con el complejo CD3/TCR, pero son necesarios estudios más sensibles (como FRET) para confirmar estas asociaciones.

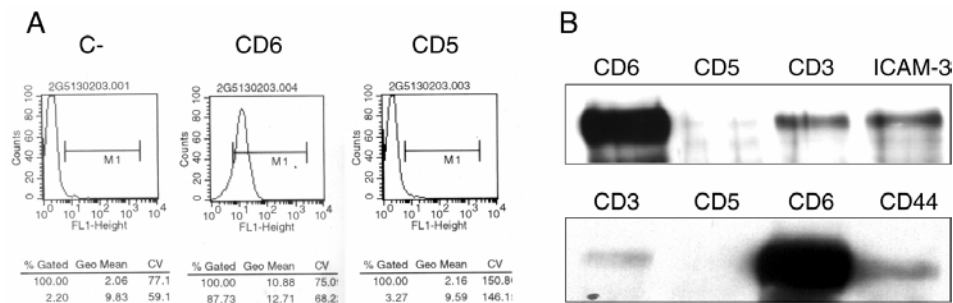


Figura IV.9. Co-IP de CD6 con otros receptores linfocitarios. **A**, Expresión de CD5 y CD6 en las células jurkat 2G5 transfectadas con la construcción pHβ-CD6.wt de forma estable. **B**, Las células jurkat 2G5 CD6⁺ fueron biotinadas en superficie, lisadas en tampón 1% Brij 58 e IP para CD3, CD5, CD6, CD44 e ICAM-3. Posteriormente re-precipitados con un anti-suero policlonal anti-CD6. Las proteínas biotinadas fueron corridas en un gel al 8% SDS-PAGE, transferidas a una membrana de nitrocelulosa, revelada con SA_v-HRP y ECL y expuestas a un film de rayos-x.

2. IMPLICACIÓN DE CD5 Y CD6 EN LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T

Introducción

Un hecho esencial para la activación de los linfocitos T es la interacción del complejo TCR con el antígeno peptídico presentado por el MHC de la APC, aunque para una activación mantenida de la célula T se requiere una amplificación de esta primera señal, lo cual es realizado por las moléculas accesorias (94). La zona de contacto entre la célula T y la APC se denomina sinapsis inmunitaria (SI) y en ella se organizan las moléculas co-estimuladoras y de señalización, tanto de la célula T como de la APC, formando el llamado SMAC (*Supra Molecular Activation Cluster*). La SI se organiza rápidamente tras el contacto antígeno específico entre las dos células y a los 30 min (SI madura) se pueden diferenciar 2 zonas; una central o cSMAC, en la que se localiza el complejo CD3/TCR y moléculas como CD28 y Lck, y una periférica o pSMAC, en la que se encuentran moléculas más implicadas en la adhesión como Talina y FLA-1 (19, 65). La estabilidad de la SI depende de la integridad del citoesqueleto de actina, la participación de los mecanismos de transporte intracelular y del acúmulo de receptores co-estimuladores, entonces se incrementa la amplitud y la duración de la señalización de la célula T (51).

Tradicionalmente tanto CD5 como CD6 han sido descritos como receptores co-estimuladores con capacidad de modular las señales del TCR. Así los primeros estudios funcionales sobre estas moléculas, en los que se utilizaban AcMo específicos, describían la capacidad que ambas tenían de aumentar los estímulos proliferativos enviados por el complejo CD3/TCR (158-161). En concordancia con esta función co-estimuladora es conocida la asociación del complejo CD3/TCR con CD5 (226), y en este trabajo se describe su asociación también con CD6. En conjunto estos datos nos han llevado a analizar no solo la presencia de CD5 y CD6 en la SI sino también la importancia de las interacciones de CD5 y CD6 con sus respectivos ligandos en los procesos de activación de los linfocitos T. El ligando de CD6, ALCAM, es bien conocido y se expresa en linfocitos maduros T y B activados, macrófagos, córtex cerebral así como en varios epitelios (296). Por el contrario el ligando de CD5 no se ha caracterizado hasta la fecha, pero sí se ha descrito su interacción a varias proteínas de diferente peso (289, 290, 292) (294). Así nuestro grupo describió un ligando de 150 kDa de peso (gp 150) con una distribución muy parecida al ligando de CD6 (295).

Nuestro análisis por la imagen de conjugados celulares antígeno específicos entre células T y APC demostraron que CD5 y CD6 se localizaban en la SI. Estos resultados están en concordancia con un trabajo reciente que demuestra la localización de CD5 en la SI (162). Un estudio más detallado demostró la co-localización de CD5 y CD6, y también la de ALCAM, con el complejo CD3/TCR en la zona central de la SI (cSMAC). Posteriores experimento en

presencia de una forma recombinante soluble de CD6 (rsCD6), pero no de CD5 (rsCD5), reducía significativamente el número de conjugados celulares antígeno específicos. Estos datos indicaban que CD6 media interacciones célula-célula necesarias para la progresión de la maduración de la SI. De la misma manera rsCD6 era capaz de inhibir de forma dosis-dependiente la proliferación de las células T mediada por PHA o AcMo anti-CD3. Esta última inhibición también fue observada con rsCD5. En conjunto nuestros datos ilustran el importante papel realizado por las interacciones moleculares mediadas por CD6 durante los procesos de activación y diferenciación de la célula T. También nuestros resultados plantean que las interacciones de CD5/CD5L pueden ser importantes para aquellos procesos de activación de las células en los que esté implicado directamente el complejo CD3/TCR.

Por otro lado se ha demostrado que muchas proteínas co-estimuladoras residen en *rafts* o son reclutados a ellos tras la activación de la célula. La presencia de CD5 en estas estructuras en células en reposo ya había sido demostrada (352), pero la presencia de CD6 no había sido investigada. Nuestros resultados de modulación y de separación de *rafts* en gradientes de sucrosa son todavía preliminares, pero sugieren que CD6 no se localiza en *rafts* en las células en reposo pero tras la estimulación con Ac-Mo anti-CD6 es reclutado a ellos. Además, al igual a lo demostrado para CD28 (81), es capaz de dar las señales complementarias necesarias para el reclutamiento de *rafts* a la zona de contacto entre la célula T y bolas de látex recubiertas con AcMo. En conjunto nuestros datos corroboran el papel co-estimulador de CD6.

2.1. Localización de CD5 y CD6 en la sinapsis inmunitaria

2.1.1. Análisis de conjugados de células J77 y células Raji

Está descrito que las moléculas con función co-estimuladora se acumulan en la zona de contacto entre la célula T y la APC tras el reconocimiento antigénico específico, llamada SI. Para investigar si CD5 y CD6 también se localizaban en la SI realizamos conjugados entre Jurkat J77 (Célula T) y células Raji (APC) en presencia o ausencia de superantígeno (SEE). A los 30 min de incubación a 37 °C la localización de CD5 y CD6 fue estudiada mediante tinción con AcMo específicos más GAMlg-FITC. Como se muestra en la **Fig. IV.10.**, CD5 y CD6 se acumulan en la zona de contacto entre la célula Raji y la J77 de forma antígeno específica. Estos datos están en concordancia con un trabajo reciente que sitúa a CD5 en la SI (162) y con nuestros resultados anteriores de asociación de CD6 con CD5 indicando que estos receptores están implicados en la activación de los linfocitos T y podrían tener una función conjunta.

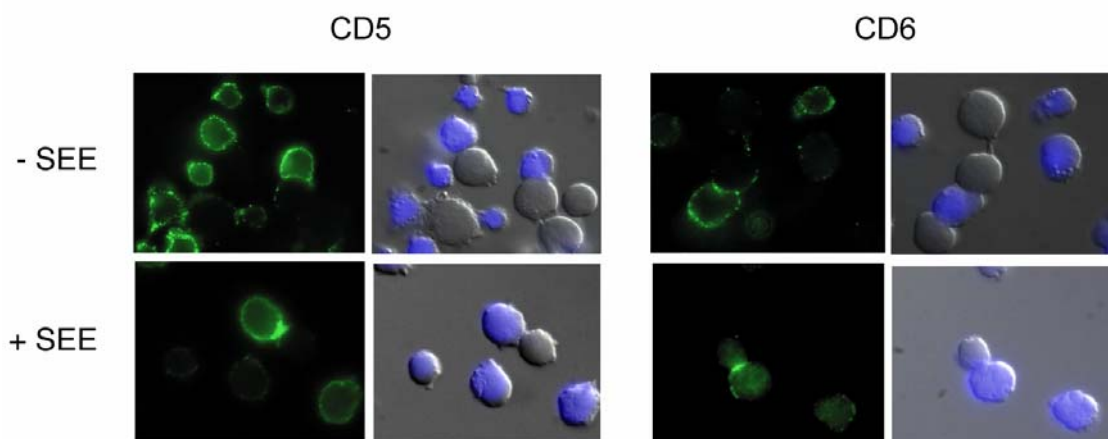


Figura IV.10. Localización de CD5 y CD6 en la SI. Células Raji fueron incubadas con o sin 5 $\mu\text{g/ml}$ SEE y mezcladas con las células J77 marcadas con CMAC. Tras 30 min de incubación, los conjugados celulares fueron adheridos a cubres pre-tratados con PLL, fijados y teñidos (verde) para CD5 y CD6. Las correspondientes imágenes de contraste de interfase diferencial (DIC) fueron sobrepuestas a la tinción azul de las J77.

2.1.2. Análisis de conjugados de células T y células dendríticas (DC)

Para validar el resultado anterior en un sistema más fisiológico realizamos conjugados de células dendríticas y células T primarias (339) e investigamos la localización de CD6. Como se muestra en la **Fig. IV.11.**, CD6 se acumula en la zona de contacto entre las células T policlonales específicas para SEB y las DC, generadas *in vitro* y pulsadas con SEB. Este resultado valida el uso de conjugados entre células leucémicas como modelo de formación de

SI. En conclusión CD6 se distribuye a la zona de contacto entre las células T-B y T-DC de forma antígeno dependiente.

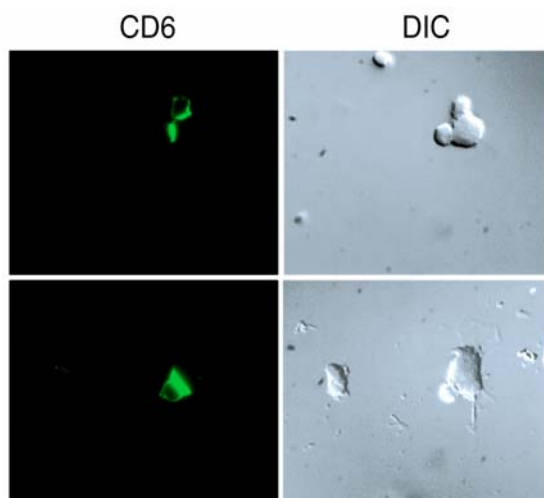


Figura IV.11. CD6 se acumula en la zona de contacto entre DC y linfocitos T. La clona de células T S3 (generada como se describe en Materiales y Métodos) fueron mezclada con las DC (pre-incubada con 1 $\mu\text{g/ml}$ SEB) por 15 min a 37 $^{\circ}\text{C}$. Los conjugados celulares fueron adheridos a cubres pre-tratados con fibronectina durante 10 min. Seguidamente las células fueron teñidas para CD6 (MAE1-C10) más GAM1g marcado con Alexa Fluor 488. Las imágenes de DIC también se muestran.

2.1.3. Estudios de localización de CD5 y CD6 en el cSMAC

Para analizar en más detalle la precisa localización de CD5 y CD6 en la SI, estudiamos su localización con relación a ICAM-1 y CD3/TCR, marcadores de pSMAC y cSMAC respectivamente. Como se muestra en la **Fig. IV.12A.**, CD6 se acumulan en el cSMAC entre las células J77 y Raji en presencia de SEE, co-localizando con el complejo CD3/TCR mientras que ICAM-1 permanece en la periferia. Como se esperaba CD5 también se distribuye al cSMAC (**Fig. IV.12A.**). Estos datos demuestran que cuando se forman estructuras altamente especializadas y funcionalmente muy importantes, como la SI, tanto CD5 como CD6 se mantienen muy próximos al complejo CD3/TCR, apuntando a una implicación directa de ambas moléculas en la regulación de la activación del linfocito T.

Al ser el ligando de CD6 conocido, a diferencia del de CD5, pudimos investigar su localización en la SI. Como se muestra en la **Fig. IV.12B.**, tinciones dobles para CD3 y ALCAM demostraron que ALCAM se acumulaba en la SI y co-localizaba parcialmente con CD3/TCR en el cSMAC. La localización solo parcial de ALCAM en el cSMAC puede ser explicado por el hecho de que ALCAM también realiza interacciones homotípicas con el ALCAM de la otra célula (324), pues ALCAM se expresa tanto en linfocitos B como T activados (**Fig. IV.12C.**). La interacción homotípica de ALCAM implica el dominio V1 de cada ALCAM, lo cual hace que la

interacción sea de unas dimensiones demasiado grandes para su cabida en el cSMAC, quedando así en el pSMAC.

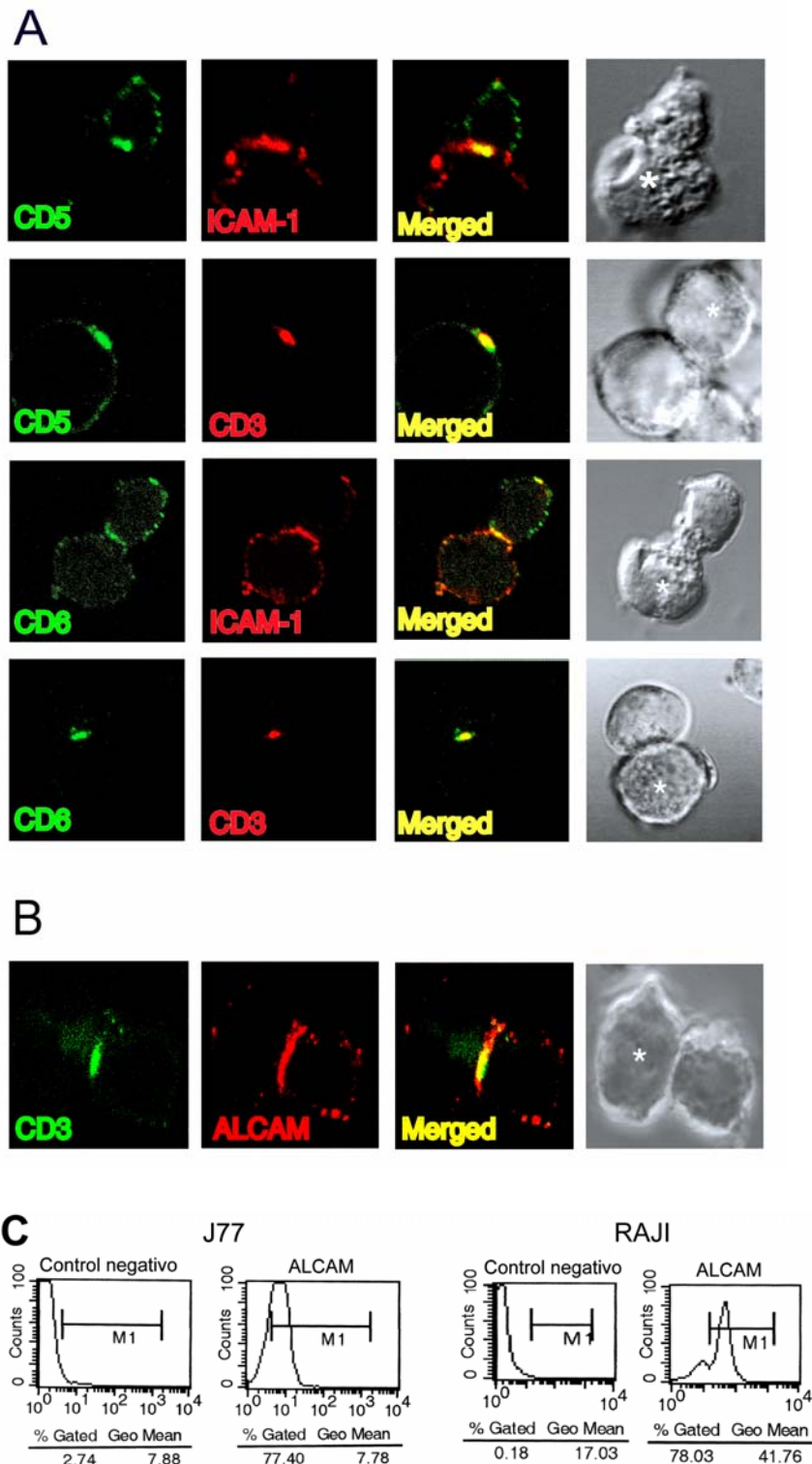


Figura IV.12. Localización de CD6, CD5 y ALCAM en el cSMAC. **A**, Co-localización de CD5 y CD6 con CD3 en el cSMAC. Conjugados de células Raji y J77 fueron incubados durante 30 min en presencia de SEE y fueron teñidos para CD5 o CD6 (verdes) en combinación con ICAM-1 o CD3 (rojos). **B**, Localización de ALCAM en el cSMAC. Conjugados de células Raji y J77 fueron incubados 30 min en presencia de SEE y teñidos para ALCAM (rojo) y CD3 (verde). Las imágenes de DIC también se muestran. *, células Raji. **C**, Expresión de ALCAM en las células J77 y Raji.

2.2. Inhibición de la activación de los linfocitos T con formas recombinantes solubles de las proteínas CD5 y CD6 (rsCD5, rsCD6)

2.2.1. Ensayos de inhibición de la maduración de la SI

Los datos de presencia de CD5 y sobretodo de CD6 y su ligando en el cSMAC, sugerían una implicación de estas proteínas durante los procesos de activación de los linfocitos T. Así investigamos el efecto de la presencia de rsCD5 y rsCD6, con capacidad de bloquear la interacción de los receptores CD5 y CD6 con sus respectivos ligandos, durante la maduración de la SI. Para este propósito producimos las proteínas rsCD5 y rsCD6 en un sistema de expresión de células de mamífero y las purificamos por cromatografía de afinidad, de forma similar a como se explica en (340) (**Fig. IV.13A.**). La actividad de ambas proteínas fue probada por ensayos de unión a células que expresan el respectivo contra-receptor (**Fig. IV.13B.**) (295).

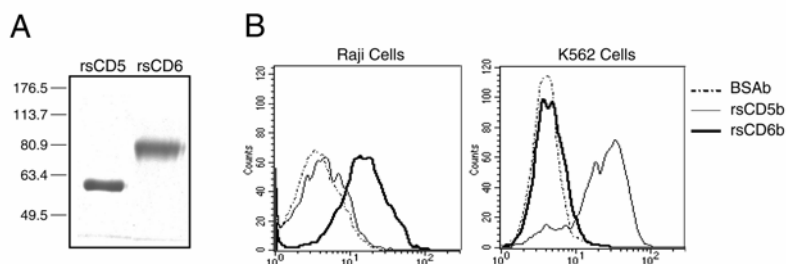


Figura IV.13. Análisis de las proteínas purificadas rsCD5 y rsCD6. **A,** Análisis por SDS-PAGE. Las proteínas rsCD5 y rsCD6 fueron purificadas y corridas en 10% SDS-PAGE en condiciones reductoras y teñidas con azul coomassie. **B,** Estudio de unión a células. Células Raji y K562 fueron incubadas con rsCD5, rsCD6 y BSA biotiniladas (rsCD5b, rsCD6b, BSAb, respectivamente), y las proteínas unidas fueron detectadas con SAV-Tricolor.

Una vez comprobada la funcionalidad de las proteínas, incubamos células Raji cargadas con SEE con o sin 10 $\mu\text{g/ml}$ de estas proteínas. Posteriormente las células Raji fueron mezcladas con las J77 para la formación de los conjugados. Como marcador de SI madura investigamos la re-orientación del MTOC hacia la zona de contacto entre el linfocito T y B, por ello los conjugados fueron teñidos con anti- α -tubulin (**Fig. IV.14.**).

La presencia de rsCD6 redujo de forma significativa (entre un 30 a un 47%) el número de contactos con re-orientación del MTOC (**Tabla IV.I.**). Por el contrario no se observó ningún efecto inhibitorio cuando las células fueron pre-incubadas con rsCD5 (**Tabla IV.I.**).

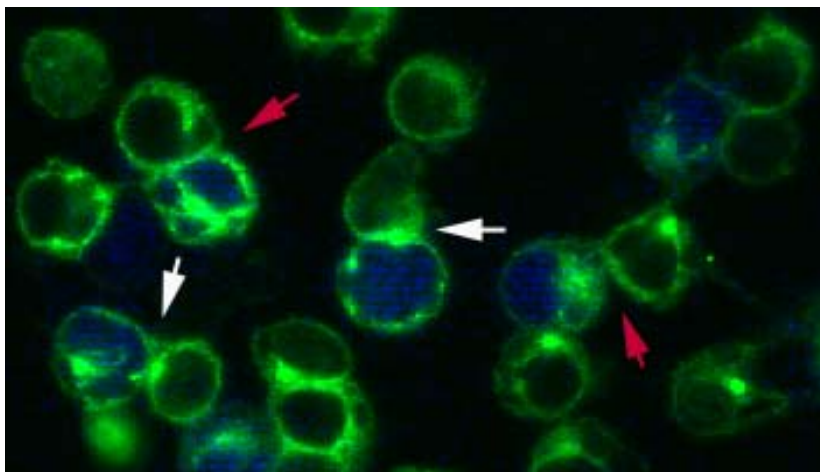


Figura IV.14. Ensayo de re-orientación del MTOC. Conjugados de células Raji-J77 antígeno específicos teñidos con α -tubulina marcada con FITC. Se contaron 100 contactos entre células Raji (marcadas con CMAC, azul) y células J77 para cada situación de incubación con proteínas y se clasificaron en contactos positivos (flecha blanca) o negativos (flecha roja) en función de la translocación del MTOC hacia la zona de contacto o no, respectivamente.

También rsCD6 redujo el número de conjugados en los que CD3 se distribuía a la zona de contacto entre las dos células (**Tabla IV.II.**). Se ha de destacar que los efectos inhibitorios de rsCD6 en la maduración de la SI no se vieron cuando fue añadido a los 3 o 10 min tras inicio de la formación de los contactos, indicando que rsCD6 interfiere con interacciones célula-célula tempranas necesarias para que se produzca la maduración de la SI (**Tabla IV.III.**).

TABLA IV.I. Efecto inhibitorio de las proteínas purificadas rsCD5 y rsCD6 sobre la maduración de la SI, usando como marcador la re-orientación del MTOC.

	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	% SI madura	% inhibición	% SI madura	% inhibición	% SI madura	% inhibición
Pre-incubation						
-	64	0	67	0	70	0
Albumina	67	-4.6	61	8.9	ND	ND
rsCD5	62	3.1	60	10.4	61	12.8
rsCD6	40	37.5	36	46.2	40	42.2

Células Raji cargadas con SEE fueron pre-incubadas con o sin 10 μ g/ml de rsCD5 o rsCD6 purificadas o con Albumina. Seguidamente fueron mezcladas con las células J77 e incubadas 30 min a 37 °C. Los conjugados fueron fijados y teñidos con AcMo anti- α -tubulina marcado con FITC. Los conjugados fueron clasificados según la translocación del MTOC hacia la zona de contacto entre las 2 células (SI madura) o no (no SI) y los valores expresados en % en relación al total de contactos contados. Las células Raji fueron tratadas con CMAC. Aquí se muestran los resultados de 3 experimentos representativos de 6 realizados. El porcentaje de inhibición de la SI madura (% inhibición) fue calculado tomando como 0 el porcentaje de SI maduras en ausencia de proteína (-). ND, no determinado.

TABLA IV.II. Efecto de las proteínas purificadas rsCD5 y rsCD6 sobre la maduración de la SI utilizando como marcador el acúmulo de CD3 en la zona de contacto entre las dos células.

	% SI madura	% inhibición
-	67	0
Albumina	67	0
rsCD5	67	0
rsCD6	46	31.3

Células Raji cargadas con SEE fueron pre-incubadas con o sin 10 $\mu\text{g/ml}$ de rsCD6 o rsCD5 purificadas o con Albumina. Seguidamente fueron mezcladas con las células J77 e incubadas 30 min a 37 °C. Los conjugados fueron fijados y teñidos con AcMo antiCD3 ζ más GAMlg-RR. Los conjugados fueron clasificados según el acúmulo de CD3 en la zona de contacto entre las 2 células (SI madura) o no (no SI) y los valores expresados en % en relación al total de contactos contados. Las células Raji fueron tratadas con CMAC. El porcentaje de inhibición de la SI madura (% inhibición) fue calculado tomando como 0 el porcentaje de SI maduras en ausencia de proteína (-).

TABLA IV.III. Efecto de la proteína purificada rsCD6 añadida a diferentes tiempos durante la maduración de la SI.

	T0'	T3'	T10'
rsCD6	54 %	76 %	71 %
rsCD5	76 %	66 %	66 %

Las proteínas purificadas rsCD5 y rsCD6 (a 10 $\mu\text{g/ml}$) fueron incubadas con células Raji cargadas con SEE antes de ser mezcladas con células J77 (T0') o a tiempos 3 (T3') y 10 (T10') min tras ser mezcladas. Las células fueron incubadas durante 30 min y teñidas para AcMo anti- α -tubulina marcado con FITC. Los conjugados fueron contados y clasificados según la re-orientación del MTOC igual que en la tabla I. Las células Raji fueron marcadas con CMAC. Los datos se muestran en porcentaje (%) de SI maduras.

2.2.2. Ensayos de inhibición de la proliferación de los linfocitos T

Para la óptima activación y posterior proliferación de los linfocitos es necesaria la correcta maduración de la SI y que ésta, una vez formada, se mantenga estable durante cierto tiempo. Nuestros resultados anteriores demuestran que la proteína rsCD6, a diferencia de la rsCD5, tiene capacidad de interferir en la maduración de la SI impidiendo la activación celular y esto sugiere su capacidad de inhibir respuestas biológicas como la respuesta proliferativa a diferentes estímulos. Por el contrario no se puede deducir lo mismo de nuestros resultados con rsCD5. Así para continuar investigando las propiedades de estas dos proteínas realizamos ensayos de proliferación en su presencia. PBL fueron estimuladas con concentraciones mitogénicas de AcMo OKT-3 (0.5 ng/ml), PHA (0.125%), PWM (5 $\mu\text{g/ml}$), SEA (0,1ng/ml) o

PBLs alogénicas irradiadas (1×10^5) (CM) en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de las proteínas recombinantes solubles rsCD5 o rsCD6. Como se muestra en la **Fig. IV.15A.**, rsCD6 claramente inhibe la proliferación medida por AcMo anti-CD3 y PHA de forma dosis dependiente. Por el contrario rsCD5 tiene efecto inhibitorio dosis dependiente solo en las proliferaciones mediadas por AcMo anti-CD3, pero no PHA (**Fig. IV.15A.**). Tampoco se observó inhibición de la proliferación usando dosis óptimas de rsCD5 y rsCD6 en los ensayos de proliferación de PBLs estimuladas con PWM, SEA y células alogénicas (**Fig. IV.15B.**). Esto datos de no-inhibición junto al análisis por tinción con azul tripán de los cultivos descartó un posible efecto tóxico de rsCD5 y rsCD6. Estos datos indican que tanto rsCD5 como rsCD6 inhiben de forma selectiva la proliferación de las células T inducida por ciertos estímulos, como el de AcMo anti-CD3.

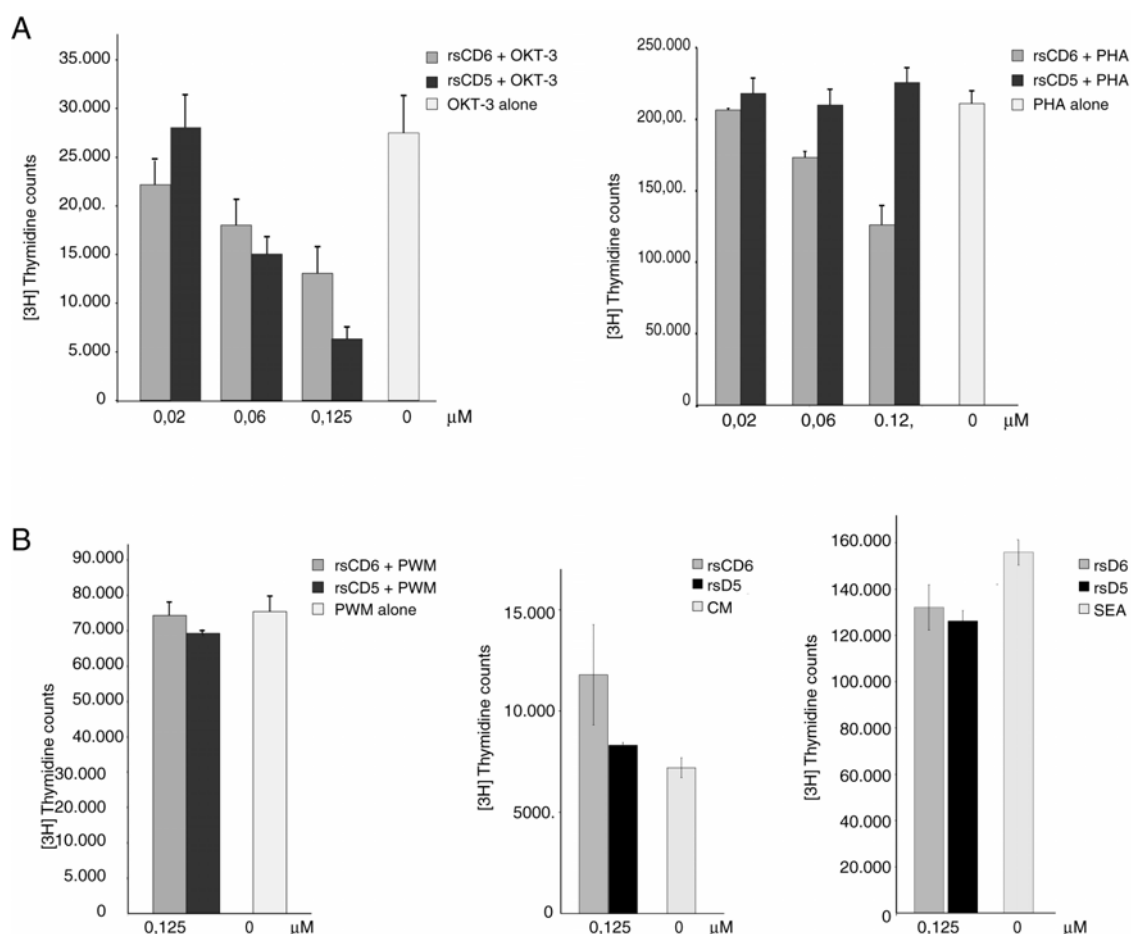


Figura IV.15. Inhibición de la proliferación de linfocitos T por rsCD5 y rsCD6. PBL fueron estimuladas con AcMo anti-CD3 (0,5 ng/ml) (**A**), PHA (0,125%) (**A**), PWM (5μg/ml) (**B**), SEA (0,1 ng/ml) (**B**) o PBL irradiadas (Cultivo Mixto, CM) (**B**) (1×10^4). Las células fueron incubadas a 37 °C con 5% CO₂ durante 3 días o 7 días en el caso de CM en placa de 96 pocillos en "U" en presencia de diferentes concentraciones (0,02, 0,06, o 0,125 μM) de rsCD5 o rsCD6. Las gráficas muestran los valores medios y SD de las cuentas de timidina tritiada de muestras por triplicado de un experimento representativo.

2.3. Relación de CD5 y CD6 con las balsas lipídicas ricas en colesterol, *rafts*

2.3.1. Co-localización de CD6 con *rafts* en LT

Las balsas lipídicas o *rafts* son estructuras de la membrana celular ricas en esfingolípidos y colesterol (127). Se ha demostrado que los *rafts* intervienen en la activación de la célula T (128) y que en ellos se segregan proteínas de la vía de señalización del TCR como Lck, LAT (130) o receptores co-estimuladores como CD44 (353). Algunas proteínas son residentes en *rafts*, o sea se localizan ya en *rafts* en las células en reposo, y otras son segregadas a ellos tras la activación celular, como CD2 (354), CD28 (144) y el propio complejo CD3/TCR (81). Aunque tanto el receptor CD5 como el receptor CD6 son moléculas con función co-estimuladoras, solo ha sido investigada la presencia de CD5 en estas estructuras, y se ha descrito que CD5 reside en *rafts* de las células en reposo (352). Así nos interesamos en analizar la presencia de CD6 en estas estructuras.

Primero comparamos la distribución de CD6 y *rafts* en la superficie de células T tanto en reposo como tras la inducción de *caps* de CD6. Para ello realizamos co-tinción de CD6 y de *rafts* en HUT-78 incubadas con AcMo anti-CD6 más GAR1g-Cy3 30 min a 4 °C (basal) o 37 °C (*capping*). La distribución de CD6 en las células T en reposo es parcheada mientras que la tinción de *rafts*, con CTX-FITC, es más homogénea. Pero se puede observar zonas en las que ambas tinciones co-localizan (**Fig. IV.16.**). Cuando se movilizaron las moléculas de CD6, formando un casquete o *cap* también se observó una movilización parcial de la tinción de *rafts*. En conjunto estos datos sugieren que si bien CD6 en estado basal puede residir o no en *rafts*, cuando este receptor se activa, ya sea por la unión de Ac específicos o por su ligando, podría translocarse a *rafts* (**Fig. IV.16.**).

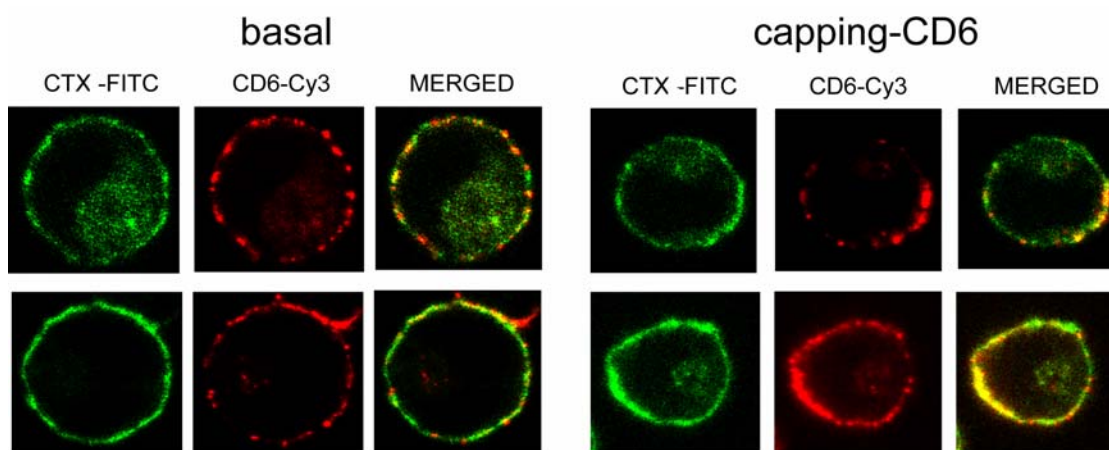


Figura IV.16: Acúmulo parcial de *rafts* en los casquetes de CD6. Células HUT-78 fueron incubadas con anti-suero-policlonal anti-CD6 más GAR1g-Cy3 durante 30 min a 4 °C (basal) o 37 °C (*capping*). Tras este tiempo fueron depositadas sobre cubres pretratados con PLL, teñidas durante 1 min con CTX-FITC y posteriormente fijadas. Las células fueron analizadas con microscopio confocal espectral (Leica).

2.3.2. Estudio de la presencia de CD5 y CD6 en rafts

Tradicionalmente la presencia de proteínas en *rafts* ha sido analizada aprovechando la característica de los *rafts* de ser insolubles en detergentes no-iónicos, pudiendo ser así aislados por flotación en un gradiente de sacarosa. Esta fue la técnica por nosotros utilizada para aislar *rafts* de PBLs. Nuestros datos de inmunofluorescencia sugerían que CD6 podía traslocarse a *rafts* por la unión a Ac específicos y por ello quisimos analizar esta situación, además de la situación basal. Así PBLs estimuladas o no con AcMo anti-CD6 (161.8) durante 5 min. fueron lisadas con tampón con 1% Tritón X-100. Los lisados fueron centrifugados 18 h en frío en un gradiente de sucrosa, y fueron recogidas fracciones de 0,5 ml. Como se puede observar en la **Fig. IV.17.** el esfingolípidido GM1, residentes en *rafts*, se localiza mayoritariamente en las fracciones 3, y 4 tanto en las células estimuladas como no. La distribución de la actina es utilizada como control de carga. El receptor CD5, de acuerdo con lo descrito (352), sí se localiza en *rafts* tanto en células no estimuladas como estimuladas con AcMo anti-CD5. Por el contrario la distribución de CD6 es diferente y observamos que en células no estimuladas CD6 se acumula fuera de *rafts* pero su unión por Ac específicos provoca un cambio en su distribución translocándose a *rafts* (**Fig. IV.17.**). Esto mismo ha sido descrito para otros receptores co-estimuladores como CD28 (144) y CD2 (354), los cuales a pesar de no residir en *rafts*, son traslocados a ellos tras su ligación con AcMo específicos o con su ligando (144, 354). Son necesarios más estudios para determinar si esta translocación a *rafts* es importante para la implicación de CD6 en los procesos de activación de los LT.

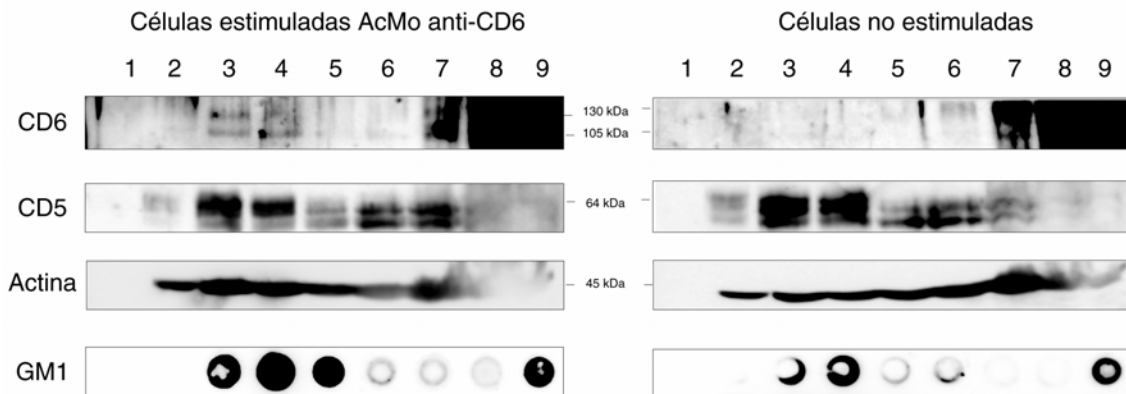


Figura IV.17. Separación de rafts. 6×10^8 PBLs fueron incubadas o no 5 min a 37°C con $10 \mu\text{g/ml}$ de AcMo anti-CD6 (161.8). Las células fueron lisadas con tampón 1% tritón-X-100 y los lisados fraccionados por gradiente de sucrosa. Se recogieron 9 fracciones de 0,5 ml y se cargaron $40 \mu\text{l}$ de cada fracción en condiciones reductoras en 8 % SDS-PAGE. Las membranas fueron incubadas con anti-suero anti CD6 o anti-CD5 o AcMo anti-actina. Para la detección de los *rafts* se analizaron $30 \mu\text{l}$ de cada fracción por dot y la membrana hibridada con CTX-HRP. Todas las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia.

2.3.3. CD6 induce coalescencia de rafts

Los rafts son reclutados a la zona de contacto entre una célula T y APC tras el reconocimiento antigénico específico. Se ha descrito que una forma artificial de remedar esto es la utilización de bolas de látex recubiertas de AcMo anti-CD3 más AcMo anti-CD28 (81), donde el AcMo anti-CD28 daría la señal co-estimuladora necesaria para que se produzca este hecho. Teniendo en cuenta que CD6 es una molécula con función co-estimuladora y que juega un papel importante en la maduración de la SI, quisimos analizar si CD6 era capaz de dar la señal co-estimuladora necesaria para el reclutamiento de los rafts a la SI. Como se puede observar en la **Fig. IV.18.** en los conjugados entre bolas de látex recubiertas con AcMo anti-CD3 más AcMo anti-CD6 se observa un acúmulo de rafts en la zona de contacto con el linfocito T.

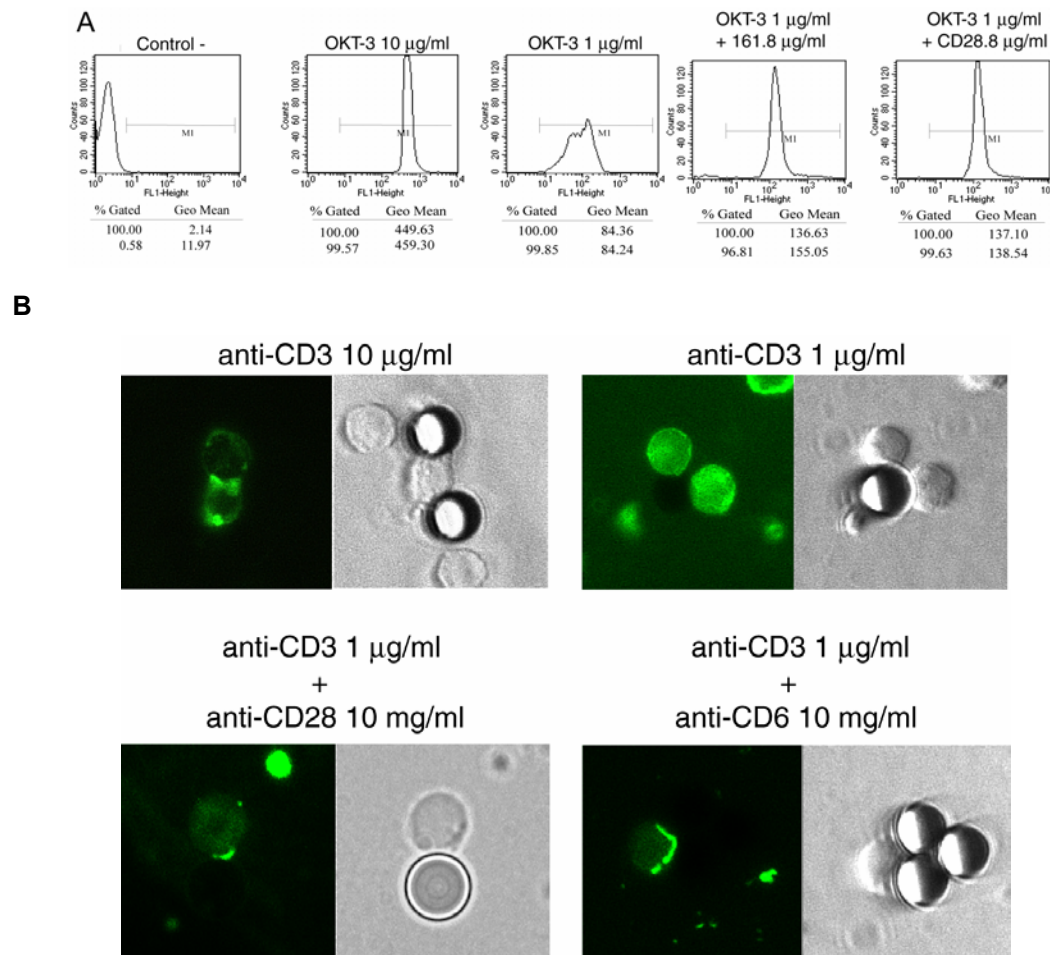


Figura IV.18. Conjugados de PBL y bolas de látex recubiertas con AcMo. A, Eficiencia de unión de de AcMo a las bolas de látex. Las bolas de látex fueron incubadas con los AcMo a las concentraciones indicadas durante toda la noche a 4 °C. Los histogramas muestran el resultado del estudio por FACS de la eficiencia de la unión de AcMo a las bolas de látex. El control negativo son bolas de latex no incubadas con AcMo. **B,** Acumulo de rafts en la zona de contacto entre la célula T y las bolas de látex. Linfocitos. T y bolas de látex recubiertas de AcMo son incubadosa razón 1:2 por 30 min a 37°C. Los conjugados son lavados con PBS frío y se dejan caer sobre cubres pre-tratados con PLL. Después de ser fijados se tiñen los rafts con CTX-FITC (verde en la imagen) y son analizados en microscopio de fluorescencia. Aquí se muestra una imagen de fluorescencia y luz blanca representativa de cada situación.

Por lo tanto el receptor CD6, al igual a lo descrito para CD28, funciona como una molécula co-estimuladora participando en el reclutamiento de *rafts* y por tanto de proteínas señalizadoras a la SI. A diferencia de lo observado por otros grupos (81) también detectamos reclutamiento de *rafts* la la zona de contacto entre bola de látex y LT a dosis altas de AcMo anti-CD3 (OKT-3), estas diferencias podría ser explicadas por la utilización de diferentes Ac anti-CD3.

3. ASOCIACIONES MOLECULARES MEDIADAS POR LA REGIÓN CITOPLASMÁTICA DE CD6

Introducción

El dominio citoplasmático de CD6 carece de actividad intrínseca, pero posee varias secuencias consenso de unión a proteínas señalizadoras como CKII, PKC y zonas de unión a dominios SH3 y SH2 (300) (**Fig. I.11.Introducción**). CD6 está constitutivamente fosforilado en Ser y Thr y tras la estimulación con AcMo anti-CD3, solos o conjuntamente con AcMo anti-CD2 y sobretodo con anti-CD4 (301, 315), se fosforila de forma transitoria en Tyr y se hiperfosforila en Ser. Esta fosforilación en Ser es la responsable del cambio de movilidad en SDS-PAGE de 105 a 130 kDa (302, 306). La vía de señalización de CD6 es bastante desconocida aunque trabajos sobre la proliferación y la movilización de calcio inducida por CD6 han implicado a un miembro de la familia de PKC en estos procesos (308, 316). Hasta la fecha no se le ha reportado ningún ligando intracelular para CD6, por ello nos interesamos en buscar, utilizando la técnica de doble híbrido, posibles proteínas con capacidad de interacción con su región citoplasmática.

Gracias a la utilización de esta técnica pudimos detectar la interacción de la región C-terminal del dominio citoplasmático de CD6 a syntenin-1, una proteína adaptadora con dominios PDZ, y al dominio regulador A de la fosfatasa PP2A. Posteriores análisis de la interacción CD6 con syntenin-1 sugieren que esta proteína podría hacer de puente entre el receptor CD6 y el citoesqueleto de actina o otras proteínas señalizadoras. La presencia de syntenin-1 en la SI sugiere una implicación de esta proteína en los procesos de activación de los linfocitos T.

3.1. Obtención y análisis de las construcciones de CD6 para los ensayos de doble híbrido

Con el fin de detectar interacciones moleculares de la región intracelular de CD6 conservadas entre las especies, utilizamos en nuestros ensayos de doble híbrido una librería de cDNA de linfos B murinos. Antes de iniciar el análisis de esta librería de cDNA, estudiamos si la construcción con el cDNA completo de la región citoplasmática de CD6 (CD6cy) (**Fig. IV.19.**) tenía capacidad de transactivar el gen reporter HIS3. Para ello la transformamos sola o junto al vector pPC86 (el vector en el que está clonada la librería y que lleva el cDNA del AD del FT Gal4) vacío. El resultado fue crecimiento de levaduras en los medios deficitarios de histidina (-H) a pesar de no existir interacción entre proteínas híbridas y por tanto de no reconstituirse el FT Gal4. Por tanto esta construcción no la podíamos utilizarla en nuestros ensayos de doble híbrido (**Tabla IV.IV.**).

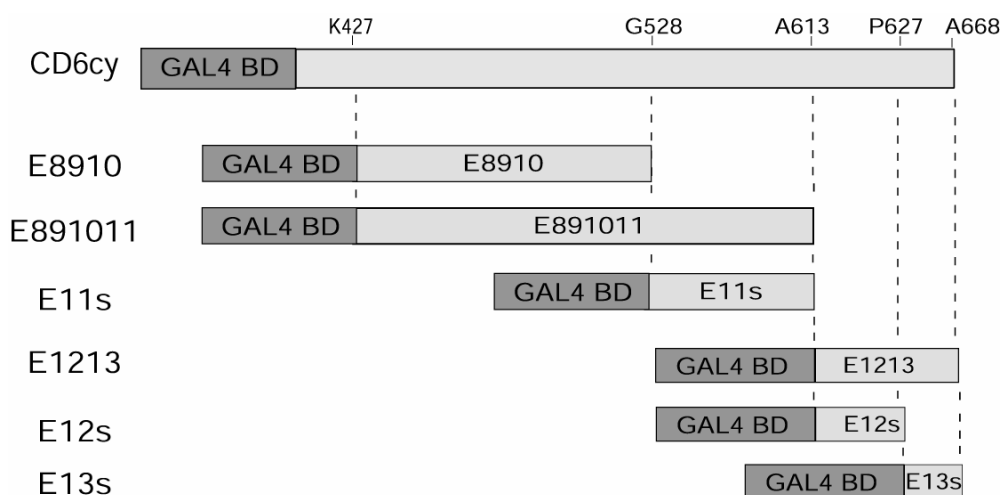


Figura IV.19. Construcciones de la región citoplasmática de CD6 utilizadas en los experimentos de doble-híbrido. cDNAs que codificaban para diferentes zonas de la región citoplasmática de CD6, las cuales coincidían con la organización exónica, fueron clonados en el vector pPC62 a continuación del cDNA del dominio de unión al DNA (BD) del factor de transcripción Gal4. Aquí se muestra un esquema de estas construcciones.

Así que hicimos construcciones con cDNAs parciales de la región citoplasmáticas de CD6 para intentar detectar la zona responsable de la transactivación y obtener construcciones válidas para ser utilizadas en nuestro sistema de doble-híbrido. En concreto realizamos las siguientes construcciones: E8910, E11s, E891011 y E1213 (**Fig. IV.19.**). Transformamos primero estas construcciones con o sin el vector pPC86 vacío y solo detectamos la transactivación del gen HIS3 con la construcción E891011 (**Tabla IV.IV.**). Así podíamos utilizar las otras tres construcciones.

Tabla IV.IV. Transformación de las construcciones de CD6 con o sin el vector de la librería vacío.

Transformación	-L	-HL	Co-transformación	-TL	-HTL
pPC62-CD6cy	+	+	pPC62-CD6cy + pPC86	+	+
pPC62-E891011	+	-	pPC62-E891011+ pPC86	+	+
pPC62-E8910	+	-	pPC62-E8910 + pPC86	+	-
pPC6262-E11s	+	-	pPC6262-E11s + pPC86	+	-
pPC62-E1213	+	-	pPC62-E1213 + pPC86	+	-

Columna derecha: Aquí se muestran las construcciones de CD6 en el vector pPC62 transformadas en levaduras (sin el vector pc86) con sus controles de transformación, por crecimiento en medios deficientes en leucina (-L), y el control de transactivación por crecimiento de las levaduras en medios también deficientes de histidina (-HL). **Columna izquierda:** se muestran las mismas construcciones de CD6 co-transformadas con el vector pPC86 vacío. El control de co-transformación son los medios deficientes en L y Trifofano (-TL) y el control de transactivación es por crecimiento de las levaduras en medios deficientes en los tres aminoácidos (-HTL).

3.2. Análisis de la librería murina en ensayos de doble-híbrido

Realizamos ensayos de doble híbrido transformando la librería de cDNA murina en levaduras previamente ya transformadas con una de las tres construcciones viables (E8910, E11s y E1213). Los ensayos con la construcción E1213 fueron los primeros en dar clonas positivas, y por ello nos centramos en su análisis.

De esta forma fueron aislados los cDNAs correspondientes a las formas murinas de syntenin-1 (syntenin.wt) y la subunidad reguladora A de PP2A (PP2A-A). La comparación de las secuencias proteicas de las formas murinas de estas proteínas con sus homólogas humanas demostró una similitud de más del 95% entre ellas (**Fig. IV.20.**).

3.3. Interacción de la región C-terminal de CD6 con la fosfatasa PP2A

Para mapear el sitio de unión de CD6 a PP2A hicimos dos construcciones a partir de la construcción E1213, una con el cDNA que codificaba para el exón 12 (E12s) (A613-P647) y una para el exón 13 (E13s) (S649-A668) (**Fig.IV.19.**). Tras comprobar que ninguna de las dos transactivaba el gen HIS3 realizamos co-transformaciones de estas construcciones con la que

contenía el cDNA de PP2A. Detectamos que la fosfatasa PP2A se unía a CD6 en la zona codificada por el exón 12, o sea, entre el aa A612 y el aa P627. (Tabla IV.V.).

Posteriormente realizamos ensayos de co-IP en células de mamífero (COS-7, transfectadas con p β -CD6.wt y PP2A-HA, y HUT-78) pero no pudimos demostrar dicha interacción.

Syntenin-1	
h 1	MSLYPSLEDLKVQIAQTAFSANPANPA-ILSEASAPIPHDGNLYPRLYPELSQYMGLSLNEEIRASVAVVSGAPLQGGQLVARSSINYMVAPVTGN 99
m 1	MSLYPSLEDLKVQIAQTAYSANPASQAFVLVDASAALPPDGNLYPKLYPELSQYMGLSLNEAEICHSMPVMSGAPQGLVARSSVNYMVAVVTGN 99
h 100	DVGIRRAEIKQGIREVILCKDQDGKIGLRLKSIDNGIFVQLVQANSASLVGLRFGDQVLQINGENCAGWSSDKAHKVLKQAFGEKITMTIRDRPFERTI 199
m 100	DAGIRRAEIKQGIREVILCKDQDGKIGLRLKSIDNGIFVQLVQANSASLVGLRFGDQVLQINGENCAGWSSDKAHKVLKQAFGEKITMTIRDRPFERTV 199
h 200	TMHKDSTGHVGFIFKNGKITSIVKDSAAARNGLLTHEHNICEINGQNVIGLKDSQIADILSTSGTVVTITIMPAFIFEHIIKRMAPSIMKSLMDHTIPEV 298
m 200	IMHKDSSGHVGFIFKSGKITSIVKDSAAARNGLLTDHHICEINGQNVIGLKDAQIADILSTAGTVVTITIMPFTIFEHIIKRMAPSIMKSLMDHTIPEV 298
PP2A-A	
h 1	MAAADGDDSLYPIAVLIDELRNEDVQLRLNSIKKLSTIALALGVERTRESELLPFLTDTIYDEDEVLLALAEQLGTFITLVGGPEYVHCLLPPLSLATVE 100
m 1	MAAADGDDSLYPIAVLIDELRNEDVQLRLNSIKKLSTIALALGVERTRESELLPFLTDTIYDEDEVLLALAEQLGTFITLVGGPEYVHCLLPPLSLATVE 100
h 100	ETVVRDKAVESLRAISHEHSPDLEAHFVPLVKRLAGGDWFTSRTSACGLFSVCYPRVSSAVKAELRQYFRNLCSDDTMMVRAAASKLGEFAKVELEDN 200
m 100	ETVVRDKAVESLRAISHEHSPDLEAHFVPLVKRLAGGDWFTSRTSACGLFSVCYPRVSSAVKAELRQYFRNLCSDDTMMVRAAASKLGEFAKVELEDN 200
h 181	VKSEIIPMFSNLASDEQDSVRLLAVEACVNIAQLLPQEDLEALVMPTLRQAAEDKSWAVRYMVADKFTELQKAVGPEITKTDLVPFAFQNLMDKCEAEVRA 300
m 181	VKSEIIPMFSNLASDEQDSVRLLAVEACVNIAQLLPQEDLEALVMPTLRQAAEDKSWAVRYMVADKFTELQKAVGPEITKTDLVPFAFQNLMDKCEAEVRA 300
h 271	AASHKVKEFCENLSADCRENVIMSQILPCIKELVSDANQHVKSALASVIMGLSPILGKDNTIEHLLPLFLAQLKDECEPEVRLNII SNLDCVNEVIGIRQL 400
m 271	AASHKVKEFCENLSADCRENVIMTQILPCIKELVSDANQHVKSALASVIMGLSPILGKDNTIEHLLPLFLAQLKDECEPEVRLNII SNLDCVNEVIGIRQL 400
h 361	SQSLLPAIVELAEDAKWRVRLAIEYMPLLAGQLGVEFFDEKLNLSLCMAWLVDHVYAIAREAATSNLKKLVEKFGKEWAHATII PKVLAMSGDPNYLHRMT 500
m 361	SQSLLPAIVELAEDAKWRVRLAIEYMPLLAGQLGVEFFDEKLNLSLCMAWLVDHVYAIAREAATSNLKKLVEKFGKEWAHATII PKVLAMSGDPNYLHRMT 500
h 451	TLFCINVLSEVCGQDITTKHMLPTVLRMAGDPVANVRFNVAKSLQKIGPILDNSTLQSEVKPILEKLTQDQDVVKYFAQEALTVLSLA 589
m 451	TLFCINVLSEVCGQDITTKHMLPTVLRMAGDPVANVRFNVAKSLQKIGPILDNSTLQSEVKPILEKLTQDQDVVKYFAQEALTVLSLA 589

Figura IV.20. Secuencias proteicas de las formas humanas y murinas de syntenin-1 y PP2A-A. El alineamiento de las secuencia proteicas de las formas humana (h) y murina (m) de syntenin-1 muestra una similitud del 95,9 % entre ella. La similitud entre las formas h y m de los dominios PDZ de syntenin-1 (encuadrados), aumenta hasta 99,3%. La subunidad reguladora A de PP2A tiene una similitud del 99,8% entre su forma h y m. En gris claro se muestran los cambios aminoacídicos conservativos, y en gris oscuro los no conservativos.

Tabla IV.V. Mapeo de la interacción CD6-PP2A-A

Co-transformación	-TL	-HTL
pPC62-E1213 + pPC86-PP2A-A	+	+
pPC62-E12s + pPC86-PP2A-A	+	+
pPC62-E13s + pPC86-PP2A-A	+	-

Resultado del ensayo de doble-híbrido directo en el que se han co-transformado las construcciones de la región citoplasmática de CD6 aquí mostradas, con el vector pPC86 con el cDNA que codifica para la subunidad reguladora A de la fosfatasa PP2A. Se muestra el control de co-transformación por crecimiento de las levaduras en medios -TL. La interacción positiva entre la región E1213 y E12s de CD6 con PP2A-A se detecta por crecimiento en -HTL.

3.4. El receptor linfocitario CD6 interacciona con la proteína adaptadora syntenin-1, una proteína con dominios PDZ

3.4.1. Interacción específica de syntenin-1 con la región C-terminal de CD6

Para comprobar la especificidad de la interacción de la región C-terminal de CD6 con syntenin-1, realizamos ensayos de doble-híbrido directos. La construcción syntenin.wt, aislada de los ensayos de doble-híbrido, fue co-transformada con las construcciones E8910, E1213 y CD5cy y el resultado analizado por crecimiento en medios deficitarios en H (**Fig. IV.21.**).

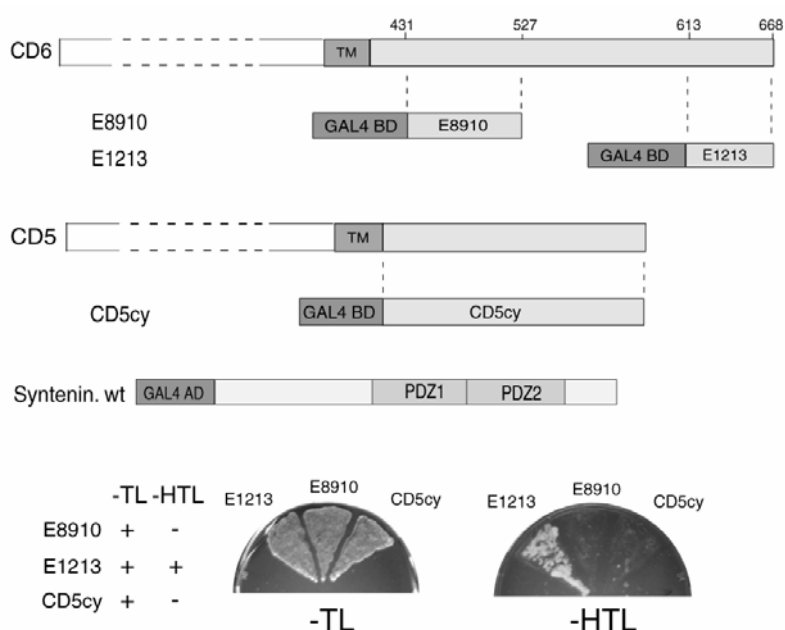


Figura IV.21. La región C-terminal de CD6 interacciona con syntenin-1. pPC86-syntenin.wt fue co-transformada con una de las construcciones siguientes: pPC62-E8910, pP62-E1213 o pPC62-CD5cy. En la parte superior se muestra un esquema de las construcciones utilizadas en los ensayos de doble-híbrido directos. En la parte inferior se muestra el crecimiento en medios restrictivos. -TL, medio deficiente en treonina y leucina; -HTL, medio deficiente en T, L e histidina.

3.4.2. Análisis de la zona de unión entre CD6 y syntenin-1

Se ha demostrado que syntenin-1 se une a través de sus dominios PDZ a los aminoácidos más C-terminal de las proteínas diana (355). La especificidad de estas interacciones está determinada por las características estructurales de los respectivos bolsillos de unión de los dominios PDZ y los aminoácidos más C-terminales de las proteínas (356). Así los dominios PDZ reconocen secuencias C-terminales que pueden ser de tres tipos: tipo I (S/T)-X-Ø, tipo II X-Ø-X-Ø, y tipo III D/E-X-Ø (357, 358), donde X es cualquier aa y Ø un aa aromático. Aunque se ha descrito una cuarta clase que reconocería el motivo X-X-C (359). Los últimos aa de CD6 (-ISAA) forman un consenso de unión que encaja con el tipo I. Para confirmar esto probamos

una construcción truncada en estos últimos aa (1213 Δ 4), junto con syntenin.wt en el sistema de doble-híbrido. El resultado por crecimiento en medios deficitarios, demostró que realmente estos aa forman un dominio de unión para syntenin-1 (**Fig. IV.22A.**).

Un análisis más detallado con construcciones en las que se habían mutado los siete aa más C-terminales a A o S (Y662A, D663A, D664A, I665A, S666A, A667S y A668S) mostró que los cuatro últimos residuos y la Y662 eran imprescindibles para la unión de CD6 a syntenin-1 (**Fig. IV.22B.**). Por el contrario la mutación de D663 y D664 a A no afectaba a la interacción. Así la secuencia -Y-X-X-I-S-A-A está implicada en la unión a syntenin-1.

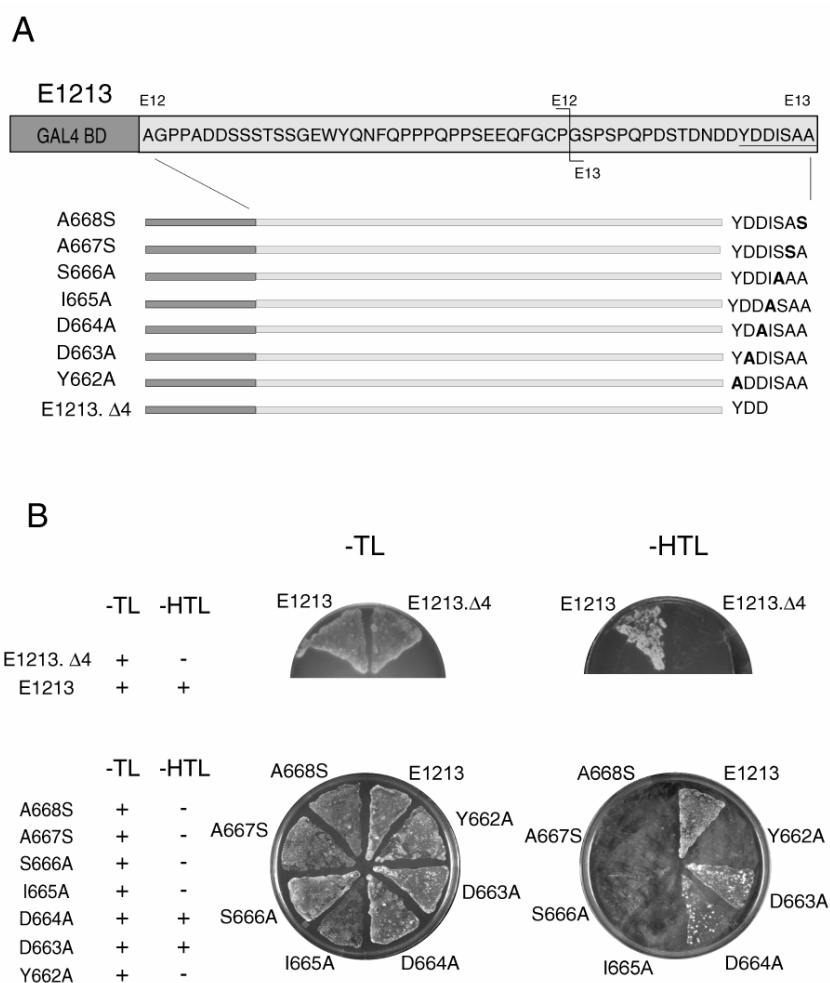


Figura IV.22. Mapeo de la zona del dominio de unión de CD6 a syntenin-1. A, Esquema de las construcciones del fragmento de CD6 llamado E1213, con mutaciones puntuales o deleción de los cuatro últimos residuos. **B,** ensayo de doble-híbrido directo con las diferentes construcciones de E1213 co-transformadas con syntenin.wt. Aquí se muestra el análisis por crecimiento en medios restrictivos.

Seguidamente analizamos si syntenin-1 necesitaba los dos dominios PDZ para unirse a CD6. Así realizamos ensayos de doble-híbrido directos con la construcción E1213 en combinación con syntenin.wt, y las construcciones de syntenin-1 que sólo contienen un dominio PDZ

(syntenin.PDZ1 o syntenin.PDZ2) (**Fig. IV.23A.**). El análisis por crecimiento en medios restrictivos indicó el requerimiento de ambos dominios PDZ (**Fig. IV.23B.**). Estos resultados están en concordancia con otras interacciones reportadas para syntenin-1 (355, 360-363).

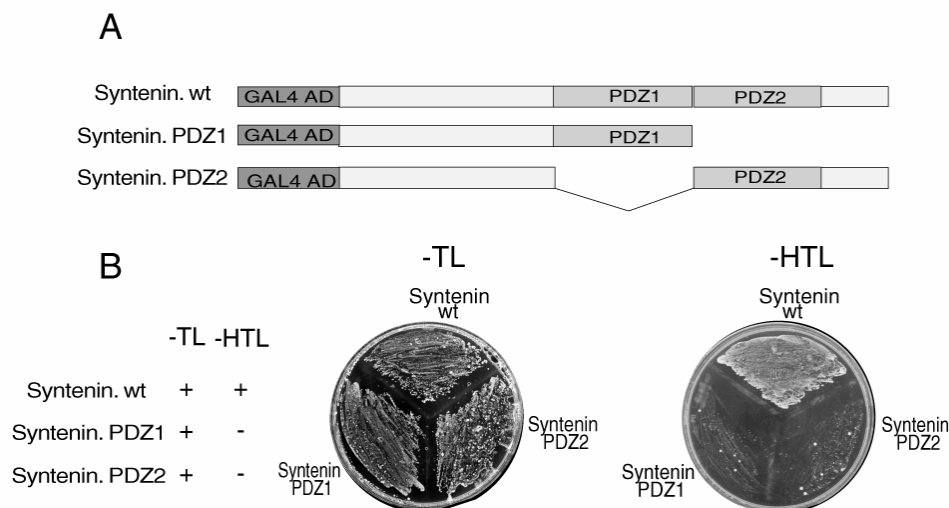


Figura IV.23. Mapeo de la zona de unión de syntenin-1 a la zona C-terminal de CD6. A, Esquema de las construcciones de syntenin-1 utilizadas en el ensayo de doble híbrido directo. **B,** Las diferentes construcciones de syntenin-1 fueron co-transformadas con la construcción pPC62-E1213. Aquí se muestra el análisis por crecimiento en medios restrictivos.

3.4.3. Experimentos de co-transfección en células COS-7

Nuestro siguiente paso fue analizar la interacción CD6/syntenin-1 en un sistema de células de mamífero y demostrar que la proteína CD6 completa era capaz de interactuar con syntenin-1. Así realizamos ensayos de *pull-down* en lisados de células COS-7 transfectadas con pH β -CD6.wt. Los lisados en NP-40 fueron incubados con cantidades iguales de proteína GST o GST-syntenin. Δ Nt, una proteína de fusión compuesta por la forma murina de la proteína syntenin-1 sin su zona N-terminal fusionada a GST. Como se muestra en la **Fig. IV.24A.** la proteína GST-syntenin. Δ Nt se une al CD6 completo en un sistema de células mamarias confirmando nuestros resultados del análisis por doble-híbrido. Además sugería que la zona N-terminal de syntenin-1 es prescindible para esta interacción. Nuestros resultados de doble híbrido indicaban el requerimiento de los dos dominios PDZ en la interacción CD6/syntenin-1. Para confirmar estos datos en un sistema mamario, células COS-7 co-transfectadas con pH β -CD6.wt en combinación con HA-syntenin, HA-PDZ1 o HA-PDZ2 fueron lisadas con tampón de lisis 1% NP40 e inmunoprecipitadas con AcMo anti-CD6. Investigamos la presencia de proteínas marcadas con HA con un AcMo específico. No detectamos co-IP de CD6 con ninguna de las formas de HA-syntenin a las que les faltaba un PDZ detectando solamente co-IP de CD6 con la proteína HA-syntenin completa (**Fig. IV.24B.**).

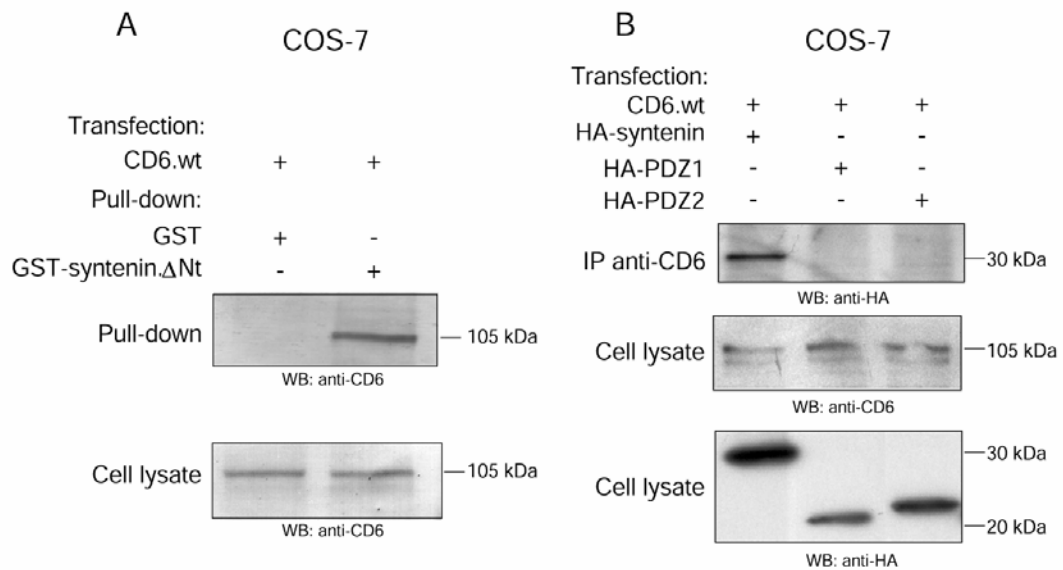


Figura IV.24. Experimentos de co-transfección. **A**, Ensayos de *pull-down*. Células COS-7 fueron transfectadas con pHβ-CD6.wt y lisadas en tampón 1% NP-40. Los lisados fueron incubados con cantidades iguales de proteína GST o GST-syntenin.ΔNt durante 2h a 4 °C. Los IP (superior) y los lisados (inferior) fueron corridos en SDS-PAGE y transferidos a membrana de nitrocelulosa. Las proteínas fueron detectadas con anti-suero anti CD6 **B**, Ensayo de co-IP. Células COS-7 fueron co-transformadas con pHβ-CD6.wt en combinación con una de las proteínas marcadas con HA indicadas. Los IP y los lisados celulares fueron tratados como en el apartado A. Las proteínas fueron detectadas con AcMo anti-HA o anti-suero policlonal anti-CD6 como se indica.

3.4.4. Co-IP de CD6 y syntenin-1 en linfocitos humanos

Los experimentos realizados hasta aquí demuestran que el CD6 humano interacciona, a través de sus cuatro últimos aminoácidos, con los dominios PDZ de la forma murina de syntenin-1. Para corroborar que el hCD6 también interacciona con la forma humana de syntenin-1 realizamos experimentos de co-IP en linfocitos T de sangre periférica. Las PBLs fueron solubilizadas con tampón de lisis 1% NP-40 e IP con AcMo anti-syntenin (4D12), anti-CD6 (161.8) o IgG murinas inespecíficas (m-IgG). Investigamos la presencia de syntenin-1 en los IP con un anti-suero policlonal anti-syntenin y detectamos co-IP de syntenin-1 con CD6 pero no con las m-IgG (**Fig. IV.25.**). En conjunto estos datos indican que la interacción CD6/syntenin-1 también se produce en linfocitos humanos. El hecho de que esta interacción se haya conservado a lo largo de la evolución sugiere su relevancia en el funcionamiento de la célula.

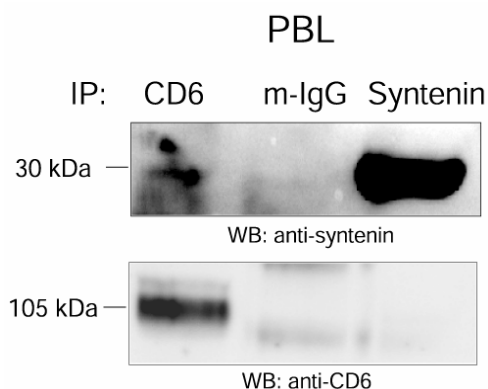


Figura IV.25. Co-IP de CD6 y syntenin-1 en linfocitos humanos. 100 x 10⁶ PBLs fueron lisadas en tampón 1% NP40 e IP con AcMo anti-syntenin (4D12), anti-CD6 (161.8) o Ig murinas inespecíficas (m-IgG) durante 2 h a 4 °C. Los inmunocomplejos y 30 µl del lisado celular fueron corridos en SDS-PAGE al 10 % y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas fueron analizadas con anti-sueros policlonales anti-syntenin o anti-CD6, como se indica.

3.4.5. Co-localización de CD6 y syntenin-1 en linfocitos humanos

Para que una interacción sea biológicamente funcional requiere que las proteínas se co-localicen en la célula. Nuestros resultados de los ensayos de doble-híbrido y co-IP indican que la región citoplasmática de CD6 interacciona con la proteína adaptadora syntenin-1. Así investigamos por técnicas de doble inmunofluorescencia la localización de estas dos proteínas en linfocitos T humanos. Las células fueron teñidas con AcMo anti-CD6 más RAMIg-FITC y anti-suero policlonal anti-syntenin más GARIg-Cy3. Como se observa en la **Fig. IV.26**, CD6 se distribuye casi exclusivamente a lo largo de la membrana citoplasmática mientras que syntenin-1 tiene tanto una distribución citoplasmática como de membrana. Esta distribución muestra una co-localizando parcial de ambas proteínas compatible con su asociación a nivel de la membrana. Para confirma esta posible asociación física entre ambas moléculas investigamos su capacidad de co-modular cuando es inducida la formación de *caps* de CD6. La **Fig. IV.26**, muestra como syntenin-1 co-localiza con CD6 en los *caps*, indicando que al menos parte de las moléculas de syntenin-1 están físicamente unidas al receptor CD6.

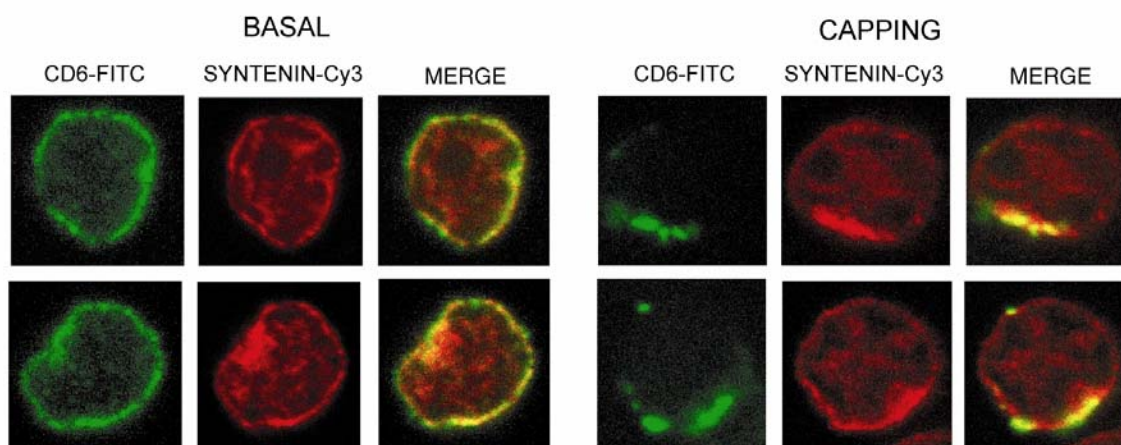


Figura IV.26. Co-localización de CD6 y syntenin-1 en linfocitos T humanos. PBL incubadas con AcMo anti CD6 (161.8) más RAMIg-FITC 30 min a 4 °C (basal) o 37 °C (*capping*). Las células fueron depositadas sobre cubres tratados con PLL, fijadas, permeabilizadas y teñidas para syntenin-1 con un anti-suero específico más GAMIg-Cy3. Se muestran las imágenes de fluorescencia verde (CD6-FITC), roja (Syntenin-Cy3) y combinada (merge).

3.4.6. Localización de Syntenin-1 en el cSMAC.

Nuestros trabajos han demostrado que CD6 se localiza en el cSMAC y que además tienen un papel muy relevante en los procesos de maduración de la SI. El hecho de que syntenin-1 se interaccione con su región citoplasmática, nos llevó a investigar la importancia *in vivo* de esta interacción a través de investigar la presencia de syntenin-1 en la SI. Realizamos conjugados de células Jurkat que expresaban de forma estable GFP-CD3 ζ (J77-EC4) y células Raji en cargadas con superantígeno (SEE). Observamos que cuando la SI está madura la proteína syntenin-1 de la célula T se acumula en la zona de contacto entre las células, co-localizando con CD3 (**Fig. IV.27.**). La presencia de syntenin-1 en esta estructura es compatible con su interacción con CD6. Además también es compatible con su función de proteína adaptadora uniendo CD6 con el citoesqueleto de actina, ya que es sabido que para la formación de la SI es necesario una reestructuración de éste. En este sentido es interesante observar que solamente la proteína syntenin-1 de la célula T se moviliza hacia la SI. Es conocido que la célula T, a diferencia de la célula B (108), moviliza su citoesqueleto durante la maduración de la SI (51). Esta localización de syntenin-1 en la SI apoya una posible implicación de syntenin-1 en el reclutamiento de CD6 a la SI (o quizá también de otros receptores). Esta es la primera descripción de syntenin-1 en la sinapsis inmunitaria, proteína de la que ya se ha descrito su importancia en la sinapsis neuronal (363, 386-388).

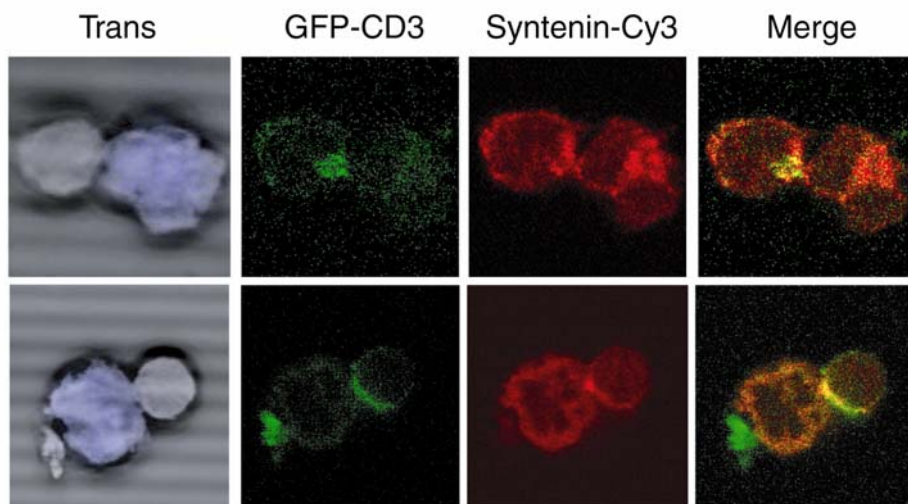


Figura IV.27. Acúmulo de syntenin-1 en el cSMAC. 1×10^6 J77 transfectadas de forma estable con GFP-CD3 ζ y 1×10^6 Raji incubadas con CMAC fueron incubadas 30 min a 37°C en presencia de SEE. Posteriormente fueron depositadas sobre cubres pre-tratados con PLL y fijadas 10 min con paraformaldehído. Para la tinción de syntenin-1 primero las células fueron permeabilizadas con 1% tritón-X-100 1 min, lavadas y incubadas con suero anti-syntenin más sueros anti-conejo marcado con Cy3. Los conjugados fueron analizados con microscopio confocal. Las imágenes de fluorescencia combinadas (merge) muestran como syntenin co-localiza con CD3 en el cSMAC en las células J77 (tinción amarilla). Las imágenes en verde corresponden a CD3 y las rojas a syntenin-1. También se muestran las imágenes de transiluminación y ultravioleta superpuestas donde la célula Raji se ven en azul.

V. DISCUSIÓN

1. ASOCIACIONES MOLECULARES DE CD6 EN LA SUPERFICIE DE LOS LINFOCITOS T

El grado de estimulación de las células T depende de qué receptores son reclutados y de cómo se produce este reclutamiento. Cada receptor tras ser reclutado envía señales, ya sean positivas o negativas, hacia el interior de la célula contribuyendo a su estado final de activación. Tradicionalmente se planteó la hipótesis de que receptores con funciones complementarias o inter-relacionadas podrían estar muy próximos entre sí, formando complejos moleculares funcionales (310, 351). Así, investigaciones en ese sentido describieron la asociación de CD5 a receptores co-estimuladores como CD2, CD9, CD4, CD8 e incluso al propio complejo CD3/TCR en linfocitos T (226) (y al BCR en las células B) (228). Estas asociaciones apoyaban la capacidad de CD5 de modular las señales del complejo CD3/TCR y lo situaban como una molécula muy importante en la regulación de los procesos de activación de la célula T.

CD6 tiene una alta homología con CD5, tanto a nivel de estructura proteica (176-178) como genómica (179), y desde el punto de vista funcional se ha descrito que ambos receptores tienen propiedades co-estimuladoras (158-161). Aunque se había sugerido la participación de CD6 en agrupaciones moleculares junto a otros receptores co-estimuladores en células T (310), no existía ninguna información concreta. Por ello en este trabajo de tesis doctoral nos hemos interesado en buscar posibles asociaciones realizadas por CD6, ya fuera con CD5 o con otros receptores linfocitarios T. Así, por técnicas bioquímicas (co-IP) y de biología celular (FRET y co-modulación), describimos la asociación de CD6 con CD5 y con el complejo CD3/TCR y planteamos una posible asociación a otros receptores linfocitarios como CD44 e ICAM-3.

1.1. Asociación de CD6 con CD5

En este trabajo de tesis doctoral se demuestra la asociación de CD6 con CD5. Esta asociación se produce tanto en linfocitos maduros como inmaduros (timocitos) y sugiere una posible función coordinada de ambas moléculas durante los procesos de diferenciación y activación de las células T, ya sea dando señales similares o complementarias. Las regiones extracelulares de CD5 y CD6 tienen un alta homología estructura, pero sus regiones citoplasmáticas son muy diferentes, tanto a nivel de secuencia como en longitud. A pesar de ello debe existir una gran presión evolutiva para que las dos moléculas hayan preservado u organizado funciones relacionadas. Durante la maduración de los timocitos, la expresión de los dos receptores aumenta a la vez que lo hace la expresión del TCR (205, 238). Así, se ha descrito que CD5 parece participar en la selección positiva de los timocitos inhibiendo la señalización de aquellos TCR con una fuerte avidéz por su ligando (232), mientras que CD6 parecería dar señales positivas sobre aquellos con baja avidéz (238). Por lo tanto, nuestros datos de asociación física entre CD6 y CD5 en timocitos, apoyan el hecho de que actúen conjuntamente durante el desarrollo y la selección en el timo. Esta situación es parecida a otra descrita también para

CD5, teniendo esta vez como pareja CD2. Los receptores CD5 y CD2 están físicamente unidos en la superficie de los linfocitos T, de forma independiente a CD3 (229). Se ha descrito que ambos receptores colaboran en la modulación de la selección positiva de los timocitos (350), donde CD2 potenciaría las señales del TCR y CD5 las disminuiría. Esta redundancia en la existencia de parejas funcionales implicadas en la diferenciación en el timo apunta a la importancia que tiene este proceso para el correcto desarrollo del sistema inmunitario. En este sentido se ha de destacar que los ratones *knock-out* para CD5 (169) no muestran alteraciones cuantitativas o funcionales en ninguna de las poblaciones linfocitarias y pueden montar respuestas inmunitarias normales, aunque sí se ha observado cierta hiperrespuesta a estímulos del complejo CD3/TCR. De igual forma, los primeros análisis del *knock-out* para CD2 no mostraron anomalías en la función de los linfocitos T, y solo posteriores estudios detectaron una menor sensibilidad del complejo CD3/TCR a la presencia del antígeno (62). Esta aparente normalidad del desarrollo linfocitario puede explicarse por la existencia de estas estructuras funcionales redundantes, que permitan un correcto funcionamiento y desarrollo del sistema inmunitario cuando hay un déficit de algún elemento. Para comprobar la existencia de estas parejas de receptores funcionalmente coordinadas sería muy interesante realizar ratones doble *knock-outs*. Así el estudio de los *knock-outs* dobles tanto para CD5 y CD2 como para CD5 y CD6, permitiría comprender mejor la función de estas proteínas y corroborar la hipótesis de una función ligada entre estas parejas de receptores.

Por otro lado, la asociación entre CD6 y CD5 se produce de forma independiente a la presencia de otros receptores linfocitarios, sin ser necesaria la mayor parte de la región citoplasmática de CD5, como demuestran nuestros resultados de co-transfección en células COS-7. De todas formas, estos datos no obvian la existencia de otras posibles interacciones de CD6 con otros receptores linfocitarios. Es interesante destacar que la asociación de CD5 con CD2 se mantiene por la presencia sola de la región intra- o de la región extra-celular (298A), lo cual plantea que entre CD5 y CD6 podría suceder algo parecido. Por ello, son necesarios más experimentos para mapear completamente la zona de unión entre ambos receptores.

El hecho de que la asociación CD5-CD6 se mantenga en situación de *capping* inducida con AcMo anti-CD5 o anti-CD6, y que incluso ambos tengan una internalización coordinada, apoya la hipótesis de la existencia de una posible inter-relación entre sus funciones. Hay que tener en cuenta que a pesar de no tener actividad catalítica intrínseca, sus regiones intracitoplasmáticas poseen motivos consenso de unión para serín/treonín- y tirosín-cinasas. De hecho CD5 y CD6 se fosforilan en Ser/Thr y Tyr (181) tras la activación de la célula T, las cuales sirven de sitio de anclaje para proteínas implicadas en la señalización intracelular. Las regiones citoplasmáticas de CD5 y CD6 son muy diferentes, lo cual contrasta con la alta homología de sus zonas extracelulares, pero sugiere que las vías de señalización que reclutan también pueden diferir pudiendo así realizar funciones complementarias. La vía de señalización de CD5 ha sido bastante estudiada pero la de CD6 continua siendo desconocida, por tanto investigaciones sobre este tema, en las que nuestro grupo está trabajando, ayudarían a comprender la relación

existente entre estas dos moléculas y su implicación en la modulación de la activación mediada por el complejo CD3/TCR y por tanto de la activación de los linfocitos T.

1.2. Asociación de CD6 con el complejo CD3/TCR

La asociación conocida de CD5 con el complejo CD3/TCR (226), junto con nuestro hallazgo de asociación de CD5 con CD6, nos llevaron a investigar la posible existencia de este tipo de interacción entre el complejo CD3/TCR y CD6. Para ello realizamos experimentos de bioquímica (co-IP) y biología celular (FRET y *co-capping*) y demostramos que CD6 y CD3 interactuaban físicamente en la superficie de los linfocitos T y que esta asociación era independiente de CD5 (**Fig.V.1.**). Estos datos no imposibilitan la existencia de otras agrupaciones moleculares en las que se encuentren a la vez CD5 y/o CD6 con otros receptores descritos también asociados al complejo CD3/TCR. Pero indican que al menos una parte de las moléculas de CD6 están directamente asociadas a este complejo. Así CD6 ha entrado a formar parte de ese reducido grupo de moléculas con capacidad de interactuar directamente con el complejo CD3/TCR, como son CD2, CD4, CD8 y también CD5. Esta asociación entre CD6 y el este complejo da una base física para la descrita función co-estimuladora o accesoria de CD6. Por lo tanto, CD6 se ha convertido en un co-receptor capaz de modular las señales de CD3/TCR durante la activación de la célula T. Esta interacción CD6-CD3/TCR la demostramos tanto en linfocitos T maduros como inmaduros. Esto último es compatible con una implicación de este receptor durante el proceso de maduración de los timocitos. A favor de esta hipótesis están los datos de expresión del ligando de CD6, ALCAM, en epitelio tímico, y el hecho de que la expresión de CD6 aumente con el aumento de la expresión de CD3 durante el desarrollo timocítico.

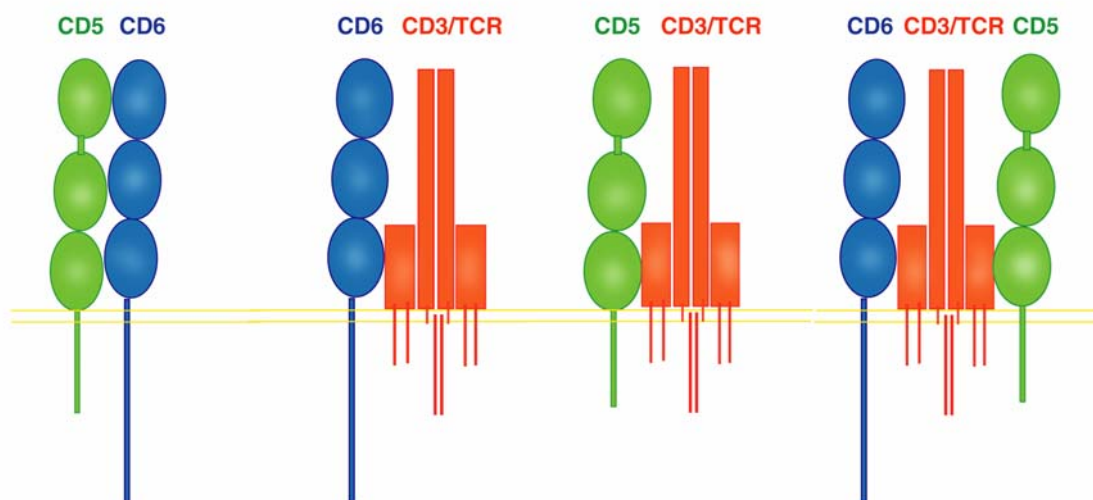


Figura I.1. Representación esquemática de las asociaciones descritas para CD6. En la superficie de los linfocitos T, CD6 se puede asociar directamente y de forma independiente a CD5 o al complejo CD3/TCR. CD5 también se asocia directamente al complejo CD3/TCR. Existe la posibilidad de que pueden existir agrupaciones tri-moleculares. Hay que tener en cuenta que a parte de las aquí dibujadas CD5 se ha descrito que se asocia a otros receptores y nosotros tenemos datos de posibles interacciones de CD6 con otros receptores.

El conjunto de asociaciones descritas para CD6, con CD5 y CD3/TCR, recuerdan a las asociaciones descritas para CD5 con CD2 y CD3/TCR, pues también estas asociaciones son independientes entre ellas. En este caso se describe que la activación del LT vía CD2 o CD3 tiene efectos contrarios sobre la fosforilación de CD5 (129), y se propone que el equilibrio de fosforilación de CD5 debe ser muy importante para la transducción de señales en los LT. En el caso de las asociaciones de CD6, se ha descrito que la activación de la célula vía CD3 produce fosforilación de CD6 (315), pero no se conoce el efecto sobre CD6 de la activación de la célula vía CD5, y quizá sería interesante analizarlo.

1.3. Asociación de CD6 con moléculas de adhesión como CD44 y ICAM-3

Nuestras investigaciones sobre posibles asociaciones moleculares establecidas por CD6 en la superficie de los linfocitos T, nos permitió detectar co-IP de CD6 con otros receptores como son ICAM-3 y CD44.

Recientemente se ha descrito que ICAM-3 está implicado en el proceso de *scanning* de la célula T sobre la APC, y que su interacción con LFA-1 es suficiente para mantener la unión entre la célula T y la APC durante este proceso (61). Nuestros resultados, aunque preliminares, sugieren que CD6 podría estar parcialmente asociado a ICAM-3 en la superficie de los linfocitos T, hipotetizando una posible implicación de CD6 en estas primeras fases del contacto célula-célula. De acuerdo con esto, nuestros resultados sobre la capacidad de la proteína rsCD6 de inhibir la maduración de una SI orientan a que CD6 podría estar implicada en las primeras fases del contacto entre la célula T y APC.

CD44 es una glicoproteína de membrana que ha sido implicada en procesos diversos como adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular, *homing* de los linfocitos, metástasis, migración celular, linfopoyesis, activación de los linfocitos T y apoptosis (365-369). Un trabajo reciente propone que tras la primera adhesión de la célula al endotelio mediada por CD44 es necesaria una segunda adhesión, realizada por otra pareja ligando/receptor, para que se pueda producir la extravasación del linfocito T (370). El trabajo también propone que VLA-4 a través de la unión a su ligando, VCAM-1, puede ser la pareja que realice esta segunda adhesión, pero para ello es necesario que VLA-4 esté físicamente asociado a CD44 en la superficie de la célula (370). El hecho de que ALCAM, el ligando de CD6, sea una molécula de adhesión y que se encuentre expresada en endotelios vasculares, sugiere una posible implicación de CD6 en los procesos de *rolling* celular al igual a lo descrito para CD44 y VLA-4.

No obstante son necesario estudios no sólo bioquímicos de las asociaciones de CD6 con CD44 e ICAM-3, y realizar análisis similares a los utilizados en las asociaciones de CD6 a CD5 y CD3, para concluir que realmente estas moléculas están físicamente asociadas en la superficie de los linfocitos T. En conjunto estos datos son compatibles con una implicación de CD6, ya sea a través de su unión a ALCAM o a través de otros receptores linfocitarios, en los procesos de adhesión de la célula T a diferentes tipos celulares (endotelios, epitelios, APC, matriz extracelular, etc.).

2. IMPLICACIÓN DE CD5 Y CD6 EN LOS PROCESOS DE ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T

Durante el proceso de activación de los linfocitos T las moléculas accesorias se organizan en la zona de contacto entre las dos células formando el SMAC. Tanto CD5 como CD6 son moléculas accesorias o co-estimuladoras y por ello nos interesamos en investigar su presencia en esta estructura.

El análisis de conjugados celulares de LT con APC mostró que ambos receptores se acumulaban en la zona de contacto entre los dos tipos de células en presencia de estimulación antigénica (superantígeno). Por tanto, CD5 y CD6 se acumulan en la SI durante la activación de los LT. Un análisis más detallado demostró que estas moléculas co-localizaban con el complejo CD3/TCR en la zona central de la SI o cSMAC. Este hallazgo está en concordancia con trabajos anteriores de asociación física del complejo CD3/TCR a CD5 (226) y con nuestros datos de asociación de CD6 tanto a este complejo como a CD5. Además nuestros resultados coinciden con un trabajo reciente en el que se describe el acúmulo de CD5 en la SI (162). La presencia de CD5 y CD6 en la SI junto a su asociación física al complejo CD3/TCR, sitúa a estas dos proteínas en una posición óptima para modular la señalización mediada por el receptor de las células T, y por tanto participar en los procesos de activación de los linfocitos T.

2.1. Implicación de CD6 y ALCAM en los procesos de activación de los linfocitos T

El ligando de CD6, ALCAM, es una molécula con una amplia expresión tisular, hallándose en linfocitos T y B activados, macrófagos, epitelio tímico, endotelios vasculares y córtex cerebral (296). La unión de CD6 a ALCAM ha sido implicada en los procesos de diferenciación timocítica, pero no había sido analizada su función en las células T maduras. Un trabajo reciente indica que la afinidad de la interacción entre CD6 y ALCAM es baja (309), al igual a lo descrito para otras parejas ligando receptor importantes para la activación de los LT, como CD28/B7 (371) o CD2/CD58 (372). Nuestro trabajo describe que CD6 y su ligando se concentran en el cSMAC, co-localizando con el complejo CD3/TCR, tras la activación de la célula T.

Se ha de destacar que la co-localización de ALCAM con CD3/TCR en el cSMAC es solo parcial, observándose también tinción para ALCAM en la zona pSMAC. Esta última tinción corresponde a la interacción ALCAM-ALCAM realizada entre el ALCAM de la célula Jurkat (LT) y la célula Raji (APC), ya que ambas células son células leucémicas, por tanto activadas, y ambas expresan ALCAM (**Fig. IV.12.**).

No existen trabajos cristalográficos sobre la interacción CD6/ALCAM pero se ha descrito que ALCAM interacciona a través de su dominio Ig-V1 con el dominio SRCR3 de CD6 (322, 323). Así hay un cierto solapamiento entre las dos moléculas, de forma que el espacio entre las dos células que expresan las proteínas es reducido, siendo esto compatible con su cabida en el

cSMAC (**Fig. V.12.**). Esto sugiere que esta pareja ligando/receptor podría participar en los procesos de formación o maduración de la SI.

Para analizar la importancia de la interacción CD6/ALCAM durante la activación de los LT, realizamos conjugados celulares en presencia de la proteína rsCD6. Esta proteína soluble está formada por los tres dominios extracelulares de CD6 y se puede unir a ALCAM, bloqueando así la interacción del CD6 de la superficie del LT al ALCAM de la APC. La presencia de rsCD6 produjo una inhibición significativa del número de conjugados en los que se observaba una reorientación del MTOC hacia la zona de contacto entre las dos células. Esta inhibición de la maduración de la SI sólo se produjo si la proteína rsCD6 estaba presente desde los estadios iniciales del contacto del LT a la APC. En conjunto estos datos indican que la pareja CD6/ALCAM juega un papel muy importante en las primeras fases de dicho contacto, siendo compatible con una implicación en los procesos de adhesión entre las células que permitirán la formación y posterior estabilización de la SI. Sería interesante determinar si tras la activación de la célula T se producen cambios en la afinidad de la interacción CD6/ALCAM, como ha sido descrito para las integrinas (63).

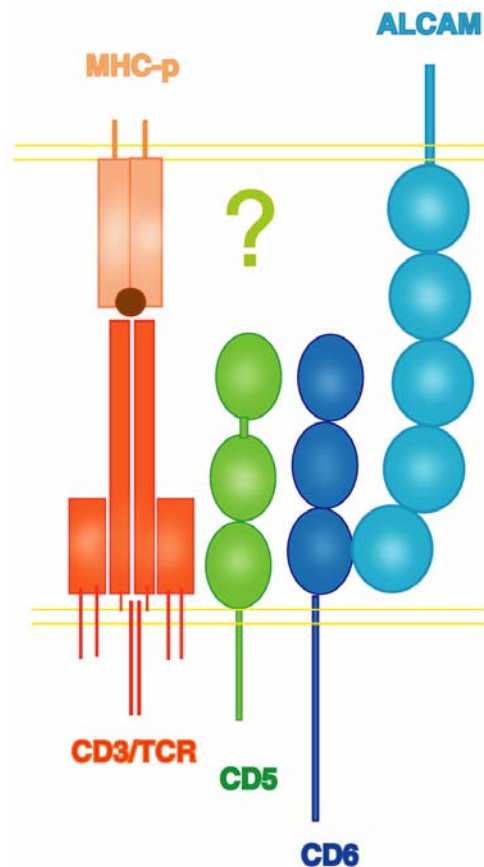


Figura V.2. Esquema de CD5 y CD6 en la SI. El dominio distal de ALCAM (Ig-V1) interacciona con el SRCD3 de CD6 permitiendo que ambas moléculas quepan en el cSMAC. El ligando de CD5 (?) es desconocido y su participación durante la formación y maduración de la SI está en controversia.

La formación y estabilización de la SI es necesaria para una correcta activación de los linfocitos T que conlleve una respuesta biológica (proliferación, apoptosis, diferenciación, etc.). El bloqueo de la maduración de la SI observado en presencia de rsCD6 debía traducirse en una alteración en el proceso de activación del LT y por tanto de la respuesta biológica esperada. Así nuestro siguiente paso fue estudiar el efecto de la presencia de rsCD6 en cultivos linfocitarios bajo diferentes situaciones de estímulo. Observamos que los cultivos estimulados con AcMo anti-CD3 (OKT-3) o PHA eran sensibles a la presencia de rsCD6, produciéndose una inhibición de la proliferación de los linfocitos de forma dosis dependiente. Por el contrario, los cultivos estimulados por PWM, SEA o células alogénicas irradiadas no fueron afectados. De acuerdo con nuestros hallazgos, hay un trabajo reciente en el que la presencia de proteínas quimérica monoméricas de CD6-Fc o ALCAM-Fc demostraron capacidad de inhibir un cultivo estimulado con toxina toxoide (309). En conjunto, estos datos indican que la inhibición realizada por el bloqueo de la interacción de CD6/ALCAM sobre los cultivos de PBLs es estímulos dependiente. Dicha inhibición podría ser debida al bloqueo de la señalización intracelular de CD6. La vía de señalización de CD6 no es conocida, pero se ha descrito su capacidad de modular las señales mediadas por el complejo CD3/TCR, al cual nuestro trabajo demuestra que está físicamente unido. Por tanto, las señales que envía el receptor CD6 tras su unión a su ligando, deben ser necesarias para el correcto funcionamiento de ciertos estímulos proliferativos.

Se ha de tener en cuenta que ALCAM puede realizar interacciones homofílicas (ALCAM-ALCAM), además de heterofílicas (ALCAM-CD6), como se observa en nuestro estudio de microscopia (**Fig IV.12.**), en las que también participa el dominio Ig-V1 (324) de ALCAM. Por ello, parte del efecto inhibitorio sobre la maduración de la SI y la proliferación observado con rsCD6, podría ser debido al bloqueo de la unión del ALCAM de una célula al ALCAM de la otra célula. Pero el hecho de que la afinidad de la interacción homofílica de ALCAM sea 100 veces menor que la heterofílica (309) y que ALCAM sólo se exprese en las células T cuando éstas están activadas, lo hace poco probable.

2.2. Implicación de CD5 y su ligando en los procesos de activación de los linfocitos T

Los mismos experimentos de formación de conjugados celulares y de proliferación fueron realizados en presencia de rsCD5, pues también queríamos estudiar la implicación de la interacción de CD5 a su ligando (CD5L) en los procesos de activación de la célula T. A diferencia de lo observado para rsCD6, la proteína rsCD5 no mostró capacidad de bloquear la maduración de la SI. Una explicación podría ser la baja o nula capacidad de unión de rsCD5 a estas células, como ilustra el trabajo realizado por nuestro grupo en el que se describe un ligando de 150 kDa, llamado gp150, para CD5 (295). De todas maneras nuestros datos están en concordancia con un trabajo en el que se sugiere que, en el timo, CD5 realiza su función inhibitoria de forma independiente a su unión a un posible ligando (233), y con otro trabajo en el

que se describe que CD5 no participa en la formación de la SI, aunque si es necesaria en los estadios tardíos de la transducción de señales (162). Por el contrario, en los ensayos de proliferación, rsCD5 inhibió el estímulo proliferativo sobre PBLs inducido por AcMo anti-CD3, aunque no demostró capacidad para inhibir los otros estímulos proliferativos probados (PHA, PWM, SEA y células alogénicas irradiadas). Por tanto, la implicación de la pareja CD5/CD5L parece ser más específica de la activación directa de la vía del complejo CD3/TCR que la pareja CD6/ALCAM. Existe un síndrome genético en el que el déficit de una proteína del citoesqueleto, WASP o *Wiskott Aldrich Syndrome protein*, produce alteraciones en la función de los linfocitos T (54). Estas alteraciones, en los inicios de la enfermedad, se manifiestan por la no respuesta proliferativa de las células T a AcMo anti-CD3 sin afectar a la respuesta a otros mitógenos. Esta afectación selectiva de estímulos proliferativos remeda a lo que sucede con rsCD5, pues quizá la unión CD5/CD5L activa una cascada necesaria para la proliferación mediada por la estimulación única del complejo CD3/TCR. Estos resultados también sugieren que CD5 y CD6 tienen vías de señalización intracelular total o, al menos, parcialmente deferentes, como ya se deduce de la poca homología de sus regiones citoplasmáticas. Estos datos, lejos de ser incompatibles con la hipótesis de una función coordinada de ambos receptores sobre la modulación de las señales mediadas por el complejo CD3/TCR, apoyan una posible inter-relación entre ellas. A favor de esta hipótesis están los trabajos que indican que CD5 funciona como modulador negativo de las señales mediadas por CD3/TCR durante la diferenciación en el timo (223, 231, 232), mientras que CD6 podría funcionar como un modulador positivo (238, 311).

A pesar de esta función moduladora negativa de CD5 durante el desarrollo timocítico, la función de CD5 en células T maduras todavía está en controversia. Trabajos antiguos habían descrito la capacidad co-estimuladora de AcMo anti-CD5 (219-221), pero trabajos actuales describen que CD5 da señales negativas durante la formación de la SI (162). Además, a diferencia de lo que pasa en el timo, en la periferia la señalización vía CD5 sí parece ser dependiente de su unión a un ligando (240, 241, 249). Un trabajo actual en el que se utiliza una proteína quimérica soluble (CD5-Fc) para inhibir la evolución de una encefalitis autoinmune experimental en ratones, propone que la unión de CD5 a su ligando (CD5L) activaría señales de supervivencia en las células T activadas, y sugiere que estas señales podrían ser mediadas por su unión a CKII (241). Por lo tanto el bloqueo de la interacción de CD5 a CD5L podría inhibir esta señal provocando la muerte de los linfocitos T activados. En concordancia está el hecho de que en sueros de personas con Síndrome de Sjögren, enfermedad que cursa con hiperactividad linfocitaria, existen niveles elevados de CD5 soluble (y también de CD6) (242), quizá como mecanismo de bloqueo del estímulo de supervivencia mediado por CD5.

Es importante destacar que el ligando de CD5 todavía no ha sido caracterizado, aunque diversos grupos han planteado posibles ligandos de diferente peso y distribución (287-290, 295). Nuestro grupo describió una proteína de 150 kDa (gp150) (295) como ligando de CD5, la cual tiene una distribución muy parecida a la del ligando de CD6, y actualmente estamos trabajando en su caracterización.

2.3. rsCD5 y rsCD6 como proteínas inmuno-moduladoras

Las proteínas solubles rsCD5 y, sobretodo, rsCD6 han demostrado tener propiedades inmuno-moduladoras sobre los linfocitos T. Esto abre la posibilidad de su uso terapéutico en enfermedades que cursen con hiperactivación T. A favor de ello está el hecho de que en suero de personas sanas (191), y a niveles más altos en sueros de enfermos de procesos autoinmunitarios (242-244), se ha detectado una forma soluble de CD5, y también en algunos casos ha sido investigada y detectada la presencia de CD6 soluble. Dicho aumento podría ser un intento del organismo, aunque insuficiente, de bloquear la activación de los linfocitos. Además existen varios trabajos donde el tratamiento de ratones con procesos autoinmunes con una proteína de fusión soluble de CD5 (CD5-Fc) es capaz de mejorar, e incluso curar, la enfermedad (240, 241). Actualmente, nuestro grupo está caracterizando un ratón transgénico para la forma soluble del CD5 humano, formada por sus tres dominios SRCR, con la finalidad de estudiar la posible modulación del curso de un proceso autoinmunitario.

2.4. Relación de CD5 y CD6 con los microdominios lipídicos *rafts*

Los *rafts* son microdominios de la membrana insolubles en detergentes no-iónicos y que pueden ser separados por flotación en un gradiente de sacarosa. Es aceptado que estos dominios lipídicos son importantes para la señalización celular y el tráfico de proteínas en la membrana, ya que ciertos receptores de la superficie y moléculas señalizadoras se localizan en ellos (373). El acúmulo de *rafts* en la SI ha sido demostrado por tinción del esfingolípido GM1 con CTX fluorescente (81, 141), aunque el mecanismo de este acúmulo es desconocido. Experimentos con bolas de látex recubiertas de AcMo han sugerido que para la movilización de *rafts* hacia la zona de contacto entre la bola de látex y la célula, son necesarias las señales co-estimuladoras dadas por CD28 (81). Nuestros resultados en este sentido, aunque preliminares, demuestran que CD6, al igual que CD28, es capaz de dar la señal co-estimuladora necesaria para el reclutamiento de *rafts*.

Por otro lado, a diferencia de lo reportado (81), nuestros datos muestran que sólo bolas de látex incubadas con dosis bajas de AcMo anti-CD3 necesitan de segunda señal (señal co-estimuladora), pues bolas de látex incubadas con dosis altas de AcMo anti-CD3 consiguen movilizar *rafts*. En nuestros experimentos utilizamos un Ac anti-CD3 diferente al por ellos utilizado, así las diferentes propiedades de los AcMo anti-CD3 podría ser una explicación a las diferencias halladas. También las diferencias podrían ser debidas a que la eficiencia de unión de los diferentes Ac específicos a las bolas de látex es difícil de medir, sobretodo cuando las bolas son incubadas con una mezcla de Ac. Así la unión de los AcMo anti-CD3 en nuestros experimentos podría ser más eficiente, permitiendo una activación de los LT por bolas de látex dosis incubadas con bajas concentraciones de Ac.

La presencia de CD5 en *rafts* ya había sido reportada (352), y conocida la asociación entre CD5 y CD6, era probable la presencia de CD6 también en estas estructuras. Para analizar esta

hipótesis realizamos técnica de doble inmunofluorescencia, y detectamos cierta co-localización de CD6 con *rafts* en PBLs no estimuladas. Esta co-localización era mayor cuando se inducía la formación de un *cap* de CD6. Esto sugería que, si bien CD6 en situación basal podía estar o no estar en *rafts*, cuando la célula se estimulaba con Ac anti-CD6 esto era más probable. Un posterior estudio bioquímico corroboró esta hipótesis. Así observamos que en las células en reposo CD6 se acumulaba fuera de la zona de *rafts*, pero la estimulación de las células con AcMo anti-CD6 inducía un cambio en la distribución del receptor, produciendo su translocación a *rafts*. Este cambio en la distribución tras la estimulación con Ac específicos, o incluso con el ligando natural, también ha sido observada en otros receptores co-estimuladores como CD28 (144), CD2 (354) e incluso el propio complejo CD3/TCR (143).

Los resultados aquí expuestos no son definitivos y todavía estamos trabajando en ellos. Pero de momento, estos resultados están en concordancia con nuestros datos de acúmulo de CD6 en el cSMAC, pues allí también se acumulan *rafts*, y de implicación de CD6 en la maduración de la SI. El reclutamiento de CD6 a *rafts* permite que físicamente se sitúe cerca de las moléculas señalizadoras localizadas en *rafts*, las cuales están implicadas en los procesos de activación del LT. Por lo tanto, el conjunto de nuestros datos muestra que CD6 es un receptor co-estimulador capaz de dar la 2ª señal (co-estimuladora) necesaria para el reclutamiento de los *raft*, lo cual es importante para la formación y maduración de la SI y para la consecuente activación de la célula T.

3. ASOCIACIONES MOLECULARES MEDIADAS POR LA REGIÓN CITOPASMÁTICA DE CD6

En conjunto, nuestros resultados indican que CD6 es una molécula con función co-estimuladora en las células T, pero la cascada de señalización activada por CD6 no es conocida. La región citoplasmática de CD6 a pesar de carecer de actividad catalítica intrínseca, contiene numerosas secuencias que cumplen consensos de unión a proteínas señalizadoras (181, 300). Con la intención de investigar posibles proteínas conservadas con capacidad de interaccionar con la región intracelular de CD6, realizamos análisis de doble-híbrido de una librería de cDNA de células murinas B activadas. Con este sistema hallamos dos proteínas que se unían a la región C-terminal de CD6; syntenin-1, una proteína con dos dominios PDZ, y la subunidad reguladora A de la fosfatasa PP2A (PP2A-A).

3.1. Interacción de la región citoplasmática de CD6 con PP2A-A

La interacción de CD6 con la fosfatasa PP2A solo la hemos podido demostrada en el sistema de doble-híbrido, y nuestros resultados indican que la subunidad reguladora A de PP2A (PP2A-A) podría unirse a la región de CD6 codificada por el exón 12 (entre los residuos A612 y P627). Nuestros intentos de demostrar esta interacción en un sistema de células de

mamífero, de momento, no han sido exitosos pero estamos interesados en realizar más estudios, quizá tipo FRET.

PP2A es una Ser/Thr fosfatasa que se ha relacionado con la regulación negativa de la transducción de señales, controlando el crecimiento celular y la mitogénesis en respuesta a estímulos extracelulares (374). En las células, la mayoría de la fosfatasa PP2A se encuentra en forma de heterodímero, formado por la subunidad A reguladora y la C catalítica, y una minoría en forma de heterotrímero, por la adición de una subunidad reguladora B variable y tejido específica. Se ha descrito la unión física de PP2A a receptores de membrana como CD28 y CTL-4 (375) o CXCR2 (375A). La importante implicación de CD6 en los procesos de activación de los linfocitos T plantea la hipótesis de que, su unión a PP2A, podría representar un mecanismo de modulación de la transducción de señales intracelulares asociadas con la activación celular. A favor de esto está la descripción de una Ser/Thr cinasa asociada a CD5 (376), por lo que la asociación de CD6 a una Ser/Thr fosfatasa estaría en concordancia con la existencia de una inter-relación entre sus funciones, durante la modulación de la activación de la señalización a través del complejo CD3/TCR.

3.2. Interacción de la región citoplasmática de CD6 con syntenin-1

Syntenin-1 es una proteína citoplasmática de 298 aa, originalmente descrita por su unión a syndecan (355). Inicialmente se propuso que syntenin-1 funcionaba como una proteína adaptadora uniendo syndecan al citoesqueleto de actina (360). Posteriormente se observó que syntenin-1 también tenía un papel en el tráfico de proteínas (361, 377), en la adhesión celular (378), y la activación de factores de transcripción como Sox-4 (379). Por lo que se ha propuesto que la diversidad de funciones biológicas de syntenin-1 son el resultado de su interacción con numerosas proteínas (380).

Syntenin-1 contiene dos dominios PDZ dispuestos en tándem (PDZ1 y PDZ2), precedidos por una región N-terminal y seguidos de 24 aa que forman su zona C-terminal. Los dominios PDZ fueron inicialmente identificados en las proteínas PSD-95 (*Postsynaptic density protein-95*), Dlg (*Discs large*), and ZO-1 (*Zona occludens-1*), pero actualmente se han identificados en gran número de proteínas (381) y se calcula que existen más de 400 copias distintas en el genoma humano (357, 358). Los dominios PDZ median interacciones proteína-proteína y muchas veces funcionan como puentes para el ensamblaje de complejos de señalización. Estos dominios PDZ reconocen péptidos C-terminales en sus proteínas diana y los incluyen en un bolsillo hidrofóbico. Los péptidos pueden ser de tres tipos, el tipo I cumple el consenso (-X-S/T-X-Ø), el tipo II el consenso (-X-Ø-X-Ø) y el tipo III -D/E-X-Ø, donde X es cualquier aa y Ø un aa hidrofóbico o aromático (357, 358). Aunque también se ha descrito un tipo adicional que reconoce el motivo -X-X-C (359). A pesar de lo dicho, existen muchas excepciones y algunos dominios PDZ muestran especificidad degenerada (382). La multitud de interacciones descritas para syntenin-1, las cuales se pueden incluir todos los tipos de interacciones, sugiere que al menos uno de sus dos PDZ tiene esta especificidad degenerada. De hecho, la reciente

cristalización de la estructura de syntenin-1 demuestra que sus interacciones son el resultado de las interacciones independientes de cada uno de sus dominios PDZs y que cada uno tiene predilección por un tipo de interacción (380). La secuencia C-terminal de CD6, -ISAA, puede corresponder a la interacción tipo I. Nuestros resultados de los ensayos de doble híbrido demostraron que los cuatro residuos C-terminales de CD6, junto con la tirosina de la posición -7 (Y662), son importantes para la interacción con syntenin-1, mientras que los dos residuos de ácido aspártico en las posiciones -5 y -6 (D664 y D663) son irrelevantes. La contribución de residuos vecinos a la zona de unión, formada por los aa más C-terminales, no es rara y ha sido demostrada para los aa -6 y -7 de la proteína merlín (380). Además el residuo Y662 es una de las tirosinas de CD6 que se fosforilan tras la activación del LT (315). Esto es compatible con una posible regulación de la interacción CD6-syntenin-1 por fosforilación de esta tirosina, y éste es un dato que estamos interesados en continuar investigando.

Nuestro trabajo también demuestra, por experimentos de doble híbrido y por co-IP en células de mamífero, que la integridad de ambos PDZ es requerida para que se produzca la interacción. Todos estos resultados coinciden con trabajos anteriores que demuestran que syntenin-1 se une a la región más C-terminal de las proteínas diana y que para dicha interacción es necesaria la presencia de los dos dominios PDZ (355, 360-363). Estos trabajos demuestran que tandems de dominios PDZs (PDZ1-PDZ1, PDZ2-PDZ2, PDZ1-PDZ-2) pueden unir las proteínas pero dominios PDZs individuales no, y también demuestran que cada dominio PDZ tiene predilección por unas proteínas determinadas. Esto significa que syntenin-1 puede unir dos proteínas a la vez, cada una por un dominio PDZ. Así, de forma análoga a lo propuesto para syndecan con merlín o PIP2, donde utiliza el PDZ2 para unir syndecan y el PDZ1 para unir merlín (380) o PIP2 (383), syntenin-1 podría unir CD6 de forma simultánea a otras proteínas diana (**Fig V.2**). El hecho de que también se haya reportado que la región N-terminal de syntenin-1 se une a los factores de transcripción Sox-4 y eIF5A (379, 384) plantea que syntenin-1 podría unir CD6 a través del tandem de PDZs y otras proteínas señalizadoras a través de la zona más N-terminal.

Por otro lado se ha descrito que syntenin-1 se acumula en la zona de contacto entre las células epiteliales, co-localizando con F-actina y β -catenina (378). Esto sugiere un papel para syntenin-1 en la adhesión celular, dinámica del citoesqueleto, y polaridad de las células y apunta que syntenin-1 puede actuar como una proteína adaptadora uniendo proteínas de transmembrana con el citoesqueleto de actina, como ha sido propuesto para syndecan (378, 380). Nuestros estudios de formación de *caps* de CD6 en LT humanos y de acúmulo de syntenin-1 en la SI, en los cuales el correcto funcionamiento del citoesqueleto de actina es muy importante (51, 69), están en concordancia con esta hipótesis. Además nuestros datos sobre el acúmulo de CD6 en la SI junto a CD3, sugieren que syntenin-1 podría estar implicado en el reclutamiento de CD6 a esta estructura.

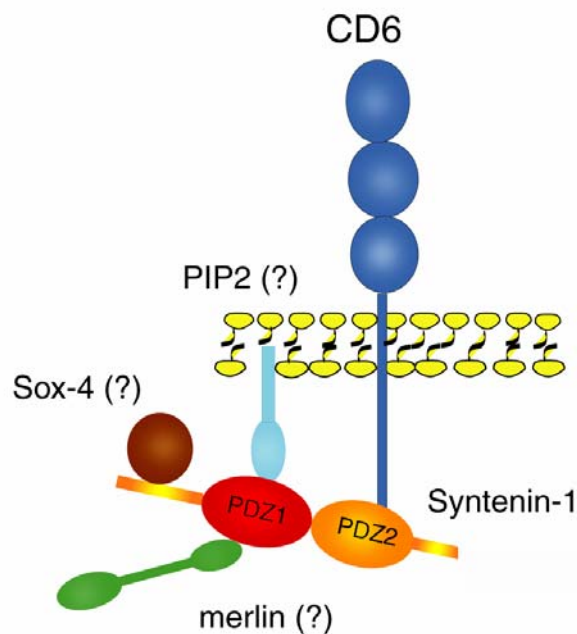


Fig.V.3. Esquema de una posible función de syntenin-1 como puente entre CD6 y otras proteína.

La presencia de syntenin-1 en la SI es un dato novedoso pero no por ello sorprendente dada la cercana relación existente entre la sinapsi neuronal y la inmunitaria (385). Durante los últimos años, syntenin-1 ha surgido como una proteína implicada en la regulación de la sinapsis neuronal a través de su unión a proteínas pre- y post-sinápticas. Entre la multitud de proteínas asociadas a syntenin-1 en neuronas están merlin (386), Ephrins de clase B (387), transportador de glicina 2 (363) y neurofascin (388). Estas asociaciones pueden explicar su amplia distribución en el cerebro y la diversidad de su localización subcelular. Además de syntenin-1 otras proteínas con dominios PDZ, como PICK (*protein interacting with PKC*) (389), CASK (*Calmodulin-associated serine/threonine kinase*) y Dlg (*Discs Large*) (390), son importantes para el funcionamiento de la sinapsis neuronal. Por todo ello, una implicación de syntenin-1 en la regulación de la sinapsis inmunitaria no sería extraña, aunque el único ligando conocido para syntenin-1 en los linfocitos es la fosfatasa PTP η (la homóloga en rata del CD148 humano) (362), la cual es excluida de la SI y tiene la función de inhibir las señales del TCR cuando las células se han separado (364). A favor de la implicación de syntenin-1 durante la formación o maduración de la SI está la reciente descripción del reclutamiento de Dlg (proteína con dominios PDZ) a esta estructura durante la activación de la célula T, donde se ha descrito que da señales negativas (391).

En conclusión nuestro trabajo identifica a syntenin-1 como la primera interacción descrita para la región intracelular de CD6. El hecho de que ambas proteínas se localicen en la SI tras la activación de las células T, junto a la importante implicación de CD6 en este proceso, sugieren

que la interacción CD6/syntenin-1 puede estar implicada en la activación y proliferación de los LT. De todas maneras son necesarias más investigaciones para poder determinar la función última de syntenin-1 en estas células. Su importancia en la función de la sinapsis neuronal hace pensar que en la sinapsis inmunitaria también juegue un papel destacado, y por ello nuestro grupo está interesado en seguir estudiándola. De hecho, estamos realizando construcciones de syntenin-1 en GFP para poder seguir su movilización cuando la célula T se activa y en un futuro queremos realizar estudios con RNA de interferencia.

Nuestro grupo está interesado en continuar investigando otras posibles interacciones de la región citoplasmática de CD6 y para ello estamos utilizando la técnica de triple híbrido. Esta técnica es parecida a la de doble híbrido, pero se añade otra proteína con capacidad de modular las posibles interacciones. En nuestro caso, esta proteína es una forma activa de la cinasa Fyn (de la familia *Src* y que es capaz de fosforilar CD6). La presencia de Fyn nos permitirá detectar aquellas interacciones dependientes de fosforilación, ya sea de CD6 o de la proteína de la librería, además de detectar aquellas interacciones no dependientes de fosforilación, pues la fosforilación no se produce en el total de las moléculas.

VI. CONCLUSIONES

El conjunto de resultados expuestos en este trabajo de tesis permite concluir que el receptor linfocitario CD6 es responsable de interacciones moleculares relevantes para los procesos de activación y diferenciación linfocitaria.

CD6 está físicamente asociado a CD5, otro miembro de su superfamilia SRCR con el que tiene gran homología. La asociación entre CD6 y CD5 sugiere que estos dos receptores pueden formar una unidad funcional, compartiendo señales similares o complementarias.

CD6 está físicamente asociado al complejo CD3/TCR de forma independiente a CD5. Este dato convierte a CD6 en uno de los pocos receptores linfocitarios que se asocian al complejo CD3/TCR, y lo capacita para modular las señales mediadas por dicho complejo.

CD6 se acumula en la zona central de la sinapsis inmunitaria, donde co-localiza con CD5 y el complejo CD3/TCR. Esta localización de CD6 en la sinapsis inmunitaria está de acuerdo con su capacidad potencial de modular la activación linfocitaria.

La región intracelular de CD6 interacciona con syntenin-1, una proteína con dominios PDZ. La demostración de la presencia de syntenin-1 en la zona central de la sinapsis inmunitaria sugiere que esta proteína funciona como una proteína adaptadora, permitiendo la unión de CD6 al citoesqueleto o a proteínas señalizadoras durante la formación y/o maduración de la sinapsis inmunitaria.

La inhibición de la maduración de la sinapsis inmunitaria, así como de ciertas respuestas proliferativas linfocitarias observada con una forma recombinante soluble de CD6 (rsCD6), demuestra la relevancia de este receptor en los procesos de activación linfocitaria. Asimismo, demuestra la capacidad inmunomoduladora de formas solubles circulantes de CD6 y plantea su posible utilidad terapéutica.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Fremont, D. H., W. A. Rees, and H. Kozono. 1996. Biophysical studies of T-cell receptors and their ligands. *Curr Opin Immunol* 8:93.
2. Janeway, C. A., Jr. 1992. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 10:645.
3. van Leeuwen, J. E., L. E. Samelson, J. S. Kennedy, M. Raab, and C. E. Rudd. 1999. T cell antigen-receptor signal transduction. Signaling scaffolds in immune cells. *Curr Opin Immunol* 11:242.
4. Liu, Y., and C. A. Janeway, Jr. 1992. Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3845.
5. Rudd, C. E. 1996. Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity* 4:527.
6. Picker, L. J., and E. C. Butcher. 1992. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 10:561.
7. Hogg, N., and R. C. Landis. 1993. Adhesion molecules in cell interactions. *Curr Opin Immunol* 5:383.
8. Picker, L. J. 1994. Control of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 6:394.
9. Cantrell, D. A. 2002. T-cell antigen receptor signal transduction. *Immunology* 105:369.
10. Myung, P. S., N. J. Boerthe, and G. A. Koretzky. 2000. Adapter proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 12:256.
11. Zhang, H., G. Tomblin, and B. L. Weber. 1998. BRCA1, BRCA2, and DNA damage response: collision or collusion? *Cell* 92:433.
12. Liu, S. K., N. Fang, G. A. Koretzky, and C. J. McGlade. 1999. The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr Biol* 9:67.
13. Yablonski, D., T. Kadlecsek, and A. Weiss. 2001. Identification of a phospholipase C-gamma1 (PLC-gamma1) SH3 domain-binding site in SLP-76 required for T-cell receptor-mediated activation of PLC-gamma1 and NFAT. *Mol Cell Biol* 21:4208.
14. Wu, J., D. G. Motto, G. A. Koretzky, and A. Weiss. 1996. Vav and SLP-76 interact and functionally cooperate in IL-2 gene activation. *Immunity* 4:593.
15. Bunnell, S. C., M. Diehn, M. B. Yaffe, P. R. Findell, L. C. Cantley, and L. J. Berg. 2000. Biochemical interactions integrating Itk with the T cell receptor-initiated signaling cascade. *J Biol Chem* 275:2219.
16. Jordan, M. S., A. L. Singer, and G. A. Koretzky. 2003. Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat Immunol* 4:110.
17. Kennedy, J. S., M. Raab, and C. E. Rudd. 1999. Signaling scaffolds in immune cells. *Cell Calcium* 26:227.
18. Kersh, E. N., A. S. Shaw, and P. M. Allen. 1998. Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation. *Science* 281:572.
19. Monks, C. R., B. A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395:82.
20. Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285:221.
21. Qi, S. Y., J. T. Groves, and A. K. Chakraborty. 2001. Synaptic pattern formation during cellular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6548.
22. Burroughs, N. J., C. Wulfing, H. A. Van Den Berg, and D. A. Rand. 2002. Differential segregation in a cell-cell contact interface: the dynamics of the immunological synapse. Quantifying the strength of ligand antagonism in TCR triggering. *Biophys J* 83:1784.
23. Krummel, M. F., M. D. Sjaastad, C. Wulfing, and M. M. Davis. 2000. Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science* 289:1349.
24. Lee, K. H., A. D. Holdorf, M. L. Dustin, A. C. Chan, P. M. Allen, and A. S. Shaw. 2002. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295:1539.
25. Huppa, J. B., and M. M. Davis. 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 3:973.
26. Irvine, D. J., M. A. Purbhoo, M. Krogsgaard, and M. M. Davis. 2002. Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* 419:845.

27. Harding, C. V., and E. R. Unanue. 1990. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. *Nature* 346:574.
28. Wulfiging, C., and F. Rupp. 2002. Neuropilin-1: another neuronal molecule in the "immunological synapse". *Nat Immunol* 3:418.
29. Schrum, A. G., and L. A. Turka. 2002. The proliferative capacity of individual naive CD4(+) T cells is amplified by prolonged T cell antigen receptor triggering. *J Exp Med* 196:793.
30. Krangel, M. S. 1987. Endocytosis and recycling of the T3-T cell receptor complex. The role of T3 phosphorylation. *J Exp Med* 165:1141.
31. Niedergang, F., A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 1997. Peptide antigen or superantigen-induced down-regulation of TCRs involves both stimulated and unstimulated receptors. *J Immunol* 159:1703.
32. Valitutti, S., S. Muller, M. Salio, and A. Lanzavecchia. 1997. Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med* 185:1859.
33. Huang, J. F., Y. Yang, H. Sepulveda, W. Shi, I. Hwang, P. A. Peterson, M. R. Jackson, J. Sprent, and Z. Cai. 1999. TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science* 286:952.
34. Valitutti, S., S. Muller, M. Cella, E. Padovan, and A. Lanzavecchia. 1995. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375:148.
35. Liu, H., M. Rhodes, D. L. Wiest, and D. A. Vignali. 2000. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* 13:665.
36. Huppa, J. B., M. Gleimer, C. Sumen, and M. M. Davis. 2003. Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nat Immunol* 4:749.
37. Iezzi, G., E. Scotet, D. Scheidegger, and A. Lanzavecchia. 1999. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* 29:4092.
38. Holdorf, A. D., K. H. Lee, W. R. Burack, P. M. Allen, and A. S. Shaw. 2002. Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. *Nat Immunol* 3:259.
39. Zal, T., M. A. Zal, and N. R. Gascoigne. 2002. Inhibition of T cell receptor-coreceptor interactions by antagonist ligands visualized by live FRET imaging of the T-hybridoma immunological synapse. *Immunity* 16:521.
40. Ehrlich, L. I., P. J. Ebert, M. F. Krummel, A. Weiss, and M. M. Davis. 2002. Dynamics of p56lck translocation to the T cell immunological synapse following agonist and antagonist stimulation. *Immunity* 17:809.
41. Blanchard, N., V. Di Bartolo, and C. Hivroz. 2002. In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity* 17:389.
42. Nishizuka, Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607.
43. Newton, A. C. 1997. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* 9:161.
44. Monks, C. R., H. Kupfer, I. Tamir, A. Barlow, and A. Kupfer. 1997. Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation. *Nature* 385:83.
45. Sun, Z., C. W. Arendt, W. Ellmeier, E. M. Schaeffer, M. J. Sunshine, L. Gandhi, J. Annes, D. Petrzilka, A. Kupfer, P. L. Schwartzberg, and D. R. Littman. 2000. PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature* 404:402.
46. Diaz-Flores, E., M. Siliceo, A. C. Martinez, and I. Merida. 2003. Membrane translocation of protein kinase Ctheta during T lymphocyte activation requires phospholipase C-gamma-generated diacylglycerol. *J Biol Chem* 278:29208.
47. Huang, J., P. F. Lo, T. Zal, N. R. Gascoigne, B. A. Smith, S. D. Levin, and H. M. Grey. 2002. CD28 plays a critical role in the segregation of PKC theta within the immunologic synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9369.
48. Bunnell, S. C., D. I. Hong, J. R. Kardon, T. Yamazaki, C. J. McGlade, V. A. Barr, and L. E. Samelson. 2002. T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J Cell Biol* 158:1263.
49. Freiberg, B. A., H. Kupfer, W. Maslanik, J. Delli, J. Kappler, D. M. Zaller, and A. Kupfer. 2002. Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat Immunol* 3:911.
50. Wulfiging, C., and M. M. Davis. 1998. A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* 282:2266.

51. Dustin, M. L., and J. A. Cooper. 2000. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* 1:23.
52. Krawczyk, C., and J. M. Penninger. 2001. Molecular motors involved in T cell receptor clusterings. *J Leukoc Biol* 69:317.
53. Tskvitaria-Fuller, I., A. L. Rozelle, H. L. Yin, and C. Wulfig. 2003. Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization. *J Immunol* 171:2287.
54. Sasahara, Y., R. Rachid, M. J. Byrne, M. A. de la Fuente, R. T. Abraham, N. Ramesh, and R. S. Geha. 2002. Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol Cell* 10:1269.
55. Parsey, M. V., and G. K. Lewis. 1993. Actin polymerization and pseudopod reorganization accompany anti-CD3-induced growth arrest in Jurkat T cells. *J Immunol* 151:1881.
56. Lowin-Kropf, B., V. S. Shapiro, and A. Weiss. 1998. Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J Cell Biol* 140:861.
57. Kaga, S., S. Ragg, K. A. Rogers, and A. Ochi. 1998. Stimulation of CD28 with B7-2 promotes focal adhesion-like cell contacts where Rho family small G proteins accumulate in T cells. *J Immunol* 160:24.
58. Delon, J., N. Bercovici, G. Raposo, R. Liblau, and A. Trautmann. 1998. Antigen-dependent and -independent Ca²⁺ responses triggered in T cells by dendritic cells compared with B cells. *J Exp Med* 188:1473.
59. Delon, J., N. Bercovici, R. Liblau, and A. Trautmann. 1998. Imaging antigen recognition by naive CD4⁺ T cells: compulsory cytoskeletal alterations for the triggering of an intracellular calcium response. *Eur J Immunol* 28:716.
60. Acuto, O., and D. Cantrell. 2000. T cell activation and the cytoskeleton. *Annu Rev Immunol* 18:165.
61. Montoya, M. C., D. Sancho, G. Bonello, Y. Collette, C. Langlet, H. T. He, P. Aparicio, A. Alcover, D. Olive, and F. Sanchez-Madrid. 2002. Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs. *Nat Immunol* 3:159.
62. van der Merwe, P. A. 1999. A subtle role for CD2 in T cell antigen recognition. *J Exp Med* 190:1371.
63. O'Rourke, A. M., and M. F. Mescher. 1992. Cytotoxic T-lymphocyte activation involves a cascade of signalling and adhesion events. *Nature* 358:253.
64. Kupfer, A., and S. J. Singer. 1989. Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples. *Annu Rev Immunol* 7:309.
65. Dustin, M. L., M. W. Olszowy, A. D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P. A. van der Merwe, P. M. Allen, and A. S. Shaw. 1998. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 94:667.
66. Yonemura, S., M. Hirao, Y. Doi, N. Takahashi, T. Kondo, and S. Tsukita. 1998. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol* 140:885.
67. Heiska, L., K. Alftan, M. Gronholm, P. Vilja, A. Vaheri, and O. Carpen. 1998. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol Chem* 273:21893.
68. Serrador, J. M., M. Nieto, J. L. Alonso-Lebrero, M. A. del Pozo, J. Calvo, H. Furthmayr, R. Schwartz-Albiez, F. Lozano, R. Gonzalez-Amaro, P. Sanchez-Mateos, and F. Sanchez-Madrid. 1998. CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood* 91:4632.
69. Penninger, J. M., and G. R. Crabtree. 1999. The actin cytoskeleton and lymphocyte activation. *Cell* 96:9.
70. Das, V., B. Nal, A. Roumier, V. Meas-Yedid, C. Zimmer, J. C. Olivo-Marin, P. Roux, P. Ferrier, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 2002. Membrane-cytoskeleton interactions during the formation of the immunological synapse and subsequent T-cell activation. *Immunol Rev* 189:123.
71. Faure, S., L. I. Salazar-Fontana, M. Semichon, V. L. Tybulewicz, G. Bismuth, A. Trautmann, R. N. Germain, and J. Delon. 2004. ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat Immunol* 5:272.
72. Kupfer, A., S. L. Swain, and S. J. Singer. 1987. The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *J Exp Med* 165:1565.

73. Sedwick, C. E., M. M. Morgan, L. Jusino, J. L. Cannon, J. Miller, and J. K. Burkhardt. 1999. TCR, LFA-1, and CD28 play unique and complementary roles in signaling T cell cytoskeletal reorganization. *J Immunol* 162:1367.
74. Stowers, L., D. Yelon, L. J. Berg, and J. Chant. 1995. Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5027.
75. Bunnell, S. C., V. Kapoor, R. P. Tribble, W. Zhang, and L. E. Samelson. 2001. Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity* 14:315.
76. Kuhne, M. R., J. Lin, D. Yablonski, M. N. Mollenauer, L. I. Ehrlich, J. Huppa, M. M. Davis, and A. Weiss. 2003. Linker for activation of T cells, zeta-associated protein-70, and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein-76 are required for TCR-induced microtubule-organizing center polarization. *J Immunol* 171:860.
77. Piperno, G., M. LeDizet, and X. J. Chang. 1987. Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol* 104:289.
78. Serrador, J. M., J. R. Cabrero, D. Sancho, M. Mittelbrunn, A. Urzainqui, and F. Sanchez-Madrid. 2004. HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity* 20:417.
79. Hubbert, C., A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X. F. Wang, and T. P. Yao. 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417:455.
80. Sancho, D., M. Vicente-Manzanares, M. Mittelbrunn, M. C. Montoya, M. Gordon-Alonso, J. M. Serrador, and F. Sanchez-Madrid. 2002. Regulation of microtubule-organizing center orientation and actomyosin cytoskeleton rearrangement during immune interactions. *Immunol Rev* 189:84.
81. Viola, A., S. Schroeder, Y. Sakakibara, and A. Lanzavecchia. 1999. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 283:680.
82. Wetzel, S. A., T. W. McKeithan, and D. C. Parker. 2002. Live-cell dynamics and the role of costimulation in immunological synapse formation. *J Immunol* 169:6092.
83. van der Merwe, P. A., P. N. McNamee, E. A. Davies, A. N. Barclay, and S. J. Davis. 1995. Topology of the CD2-CD48 cell-adhesion molecule complex: implications for antigen recognition by T cells. *Curr Biol* 5:74.
84. Shaw, A. S., and M. L. Dustin. 1997. Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 6:361.
85. Bromley, S. K., A. Iaboni, S. J. Davis, A. Whitty, J. M. Green, A. S. Shaw, A. Weiss, and M. L. Dustin. 2001. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol* 2:1159.
86. Zaru, R., T. O. Cameron, L. J. Stern, S. Muller, and S. Valitutti. 2002. Cutting edge: TCR engagement and triggering in the absence of large-scale molecular segregation at the T cell-APC contact site. *J Immunol* 168:4287.
87. Abraham, C., J. Griffith, and J. Miller. 1999. The dependence for leukocyte function-associated antigen-1/ICAM-1 interactions in T cell activation cannot be overcome by expression of high density TCR ligand. *J Immunol* 162:4399.
88. Anderson, M. E., and T. J. Sahaan. 2003. Targeting ICAM-1/LFA-1 interaction for controlling autoimmune diseases: designing peptide and small molecule inhibitors. *Peptides* 24:487.
89. Weiss, A., R. Shields, M. Newton, B. Manger, and J. Imboden. 1987. Ligand-receptor interactions required for commitment to the activation of the interleukin 2 gene. *J Immunol* 138:2169.
90. Gunzer, M., A. Schafer, S. Borgmann, S. Grabbe, K. S. Zanker, E. B. Brocker, E. Kampgen, and P. Friedl. 2000. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* 13:323.
91. Bromley, S. K., D. A. Peterson, M. D. Gunn, and M. L. Dustin. 2000. Cutting edge: hierarchy of chemokine receptor and TCR signals regulating T cell migration and proliferation. *J Immunol* 165:15.
92. Mobley, J. L., P. J. Reynolds, and Y. Shimizu. 1993. Regulatory mechanisms underlying T cell integrin receptor function. *Semin Immunol* 5:227.
93. Viola, A., and A. Lanzavecchia. 1996. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 273:104.
94. Iezzi, G., K. Karjalainen, and A. Lanzavecchia. 1998. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8:89.
95. Lee, K. M., E. Chuang, M. Griffin, R. Khattri, D. K. Hong, W. Zhang, D. Straus, L. E. Samelson, C. B. Thompson, and J. A. Bluestone. 1998. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* 282:2263.

96. Hudrisier, D., J. Riond, H. Mazarguil, J. E. Gairin, and E. Joly. 2001. Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner. *J Immunol* 166:3645.
97. Stinchcombe, J. C., G. Bossi, S. Booth, and G. M. Griffiths. 2001. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15:751.
98. Dustin, M. L., P. M. Allen, and A. S. Shaw. 2001. Environmental control of immunological synapse formation and duration. *Trends Immunol* 22:192.
99. Hurez, V., A. Saparov, A. Tousson, M. J. Fuller, T. Kubo, J. Oliver, B. T. Weaver, and C. T. Weaver. 2003. Restricted clonal expression of IL-2 by naive T cells reflects differential dynamic interactions with dendritic cells. *J Exp Med* 198:123.
100. Benvenuti, F., C. Lagaudriere-Gesbert, I. Grandjean, C. Jancic, C. Hivroz, A. Trautmann, O. Lantz, and S. Amigorena. 2004. Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J Immunol* 172:292.
101. Dustin, M. L. 2004. Stop and go traffic to tune T cell responses. *Immunity* 21:305.
102. Mempel, T. R., S. E. Henrickson, and U. H. Von Andrian. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427:154.
103. Miller, M. J., S. H. Wei, I. Parker, and M. D. Cahalan. 2002. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. *Science* 296:1869.
104. Miller, M. J., S. H. Wei, M. D. Cahalan, and I. Parker. 2003. Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital two-photon microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2604.
105. Miller, M. J., A. S. Hejazi, S. H. Wei, M. D. Cahalan, and I. Parker. 2004. T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:998.
106. Bousso, P., and E. A. Robey. 2004. Dynamic behavior of T cells and thymocytes in lymphoid organs as revealed by two-photon microscopy. *Immunity* 21:349.
107. Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk, and C. G. Figdor. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575.
108. Al-Alwan, M. M., G. Rowden, T. D. Lee, and K. A. West. 2001. The dendritic cell cytoskeleton is critical for the formation of the immunological synapse. *J Immunol* 166:1452.
109. Kondo, T., I. Cortese, S. Markovic-Plese, K. P. Wandinger, C. Carter, M. Brown, S. Leitman, and R. Martin. 2001. Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen. *Nat Immunol* 2:932.
110. Revy, P., M. Sospedra, B. Barbour, and A. Trautmann. 2001. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2:925.
111. Bromley, S. K., and M. L. Dustin. 2002. Stimulation of naive T-cell adhesion and immunological synapse formation by chemokine-dependent and -independent mechanisms. *Immunology* 106:289.
112. Garside, P., E. Ingulli, R. R. Merica, J. G. Johnson, R. J. Noelle, and M. K. Jenkins. 1998. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science* 281:96.
113. Bishop, G. A., and B. S. Hostager. 2001. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 13:278.
114. Montoya, M. C., D. Sancho, M. Vicente-Manzanares, and F. Sanchez-Madrid. 2002. Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev* 186:68.
115. Tuosto, L., I. Parolini, S. Schroder, M. Sargiacomo, A. Lanzavecchia, and A. Viola. 2001. Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation. *Eur J Immunol* 31:345.
116. Watson, A. R., and W. T. Lee. 2004. Differences in signaling molecule organization between naive and memory CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 173:33.
117. Bierer, B. E., S. J. Burakoff, and B. R. Smith. 1989. A large proportion of T lymphocytes lack CD5 expression after bone marrow transplantation. *Blood* 73:1359.
118. O'Keefe, J. P., K. Blaine, M. L. Alegre, and T. F. Gajewski. 2004. Formation of a central supramolecular activation cluster is not required for activation of naive CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9351.
119. Bancroft, G. J. 1993. The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Curr Opin Immunol* 5:503.
120. Davis, D. M., I. Chiu, M. Fassett, G. B. Cohen, O. Mandelboim, and J. L. Strominger. 1999. The human natural killer cell immune synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15062.

121. Hildreth, J. E., F. M. Gotch, P. D. Hildreth, and A. J. McMichael. 1983. A human lymphocyte-associated antigen involved in cell-mediated lympholysis. *Eur J Immunol* 13:202.
122. Lanier, L. L. 1998. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16:359.
123. Hailman, E., W. R. Burack, A. S. Shaw, M. L. Dustin, and P. M. Allen. 2002. Immature CD4(+)CD8(+) thymocytes form a multifocal immunological synapse with sustained tyrosine phosphorylation. *Immunity* 16:839.
124. Richie, L. I., P. J. Ebert, L. C. Wu, M. F. Krummel, J. J. Owen, and M. M. Davis. 2002. Imaging synapse formation during thymocyte selection: inability of CD3zeta to form a stable central accumulation during negative selection. *Immunity* 16:595.
125. Hogquist, K. A. 2001. Signal strength in thymic selection and lineage commitment. *Curr Opin Immunol* 13:225.
126. Brown, D. A., and E. London. 1997. Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Biophys Res Commun* 240:1.
127. Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31.
128. Bromley, S. K., W. R. Burack, K. G. Johnson, K. Somersalo, T. N. Sims, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin. 2001. The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 19:375.
129. Brown, D. A., and E. London. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 275:17221.
130. Janes, P. W., S. C. Ley, and A. I. Magee. 1999. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol* 147:447.
131. Edidin, M. 2001. Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol* 11:492.
132. Gri, G., B. Molon, S. Manes, T. Pozzan, and A. Viola. 2004. The inner side of T cell lipid rafts. *Immunol Lett* 94:247.
133. Thomas, S., A. Preda-Pais, S. Casares, and T. D. Brumeanu. 2004. Analysis of lipid rafts in T cells. *Mol Immunol* 41:399.
134. Horejsi, V., K. Drbal, M. Cebecauer, J. Cerny, T. Brdicka, P. Angelisova, and H. Stockinger. 1999. GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors. *Immunol Today* 20:356.
135. Brown, D. A., E. London, S. Arni, S. A. Keilbaugh, and A. G. Ostermeyer. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:111.
136. Gidwani, A., D. Holowka, and B. Baird. 2001. Fluorescence anisotropy measurements of lipid order in plasma membranes and lipid rafts from RBL-2H3 mast cells. *Biochemistry* 40:12422.
137. Varma, R., and S. Mayor. 1998. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 394:798.
138. Pralle, A., P. Keller, E. L. Florin, K. Simons, and J. K. Horber. 2000. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* 148:997.
139. Harder, T., P. Scheiffele, P. Verkade, and K. Simons. 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 141:929.
140. Kabouridis, P. S., J. Janzen, A. L. Magee, and S. C. Ley. 2000. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30:954.
141. Burack, W. R., K. H. Lee, A. D. Holdorf, M. L. Dustin, and A. S. Shaw. 2002. Cutting edge: quantitative imaging of raft accumulation in the immunological synapse. *J Immunol* 169:2837.
142. Drevot, P., C. Langlet, X. J. Guo, A. M. Bernard, O. Colard, J. P. Chauvin, R. Lasserre, and H. T. He. 2002. TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *Embo J* 21:1899.
143. Montixi, C., C. Langlet, A. M. Bernard, J. Thimonier, C. Dubois, M. A. Wurbel, J. P. Chauvin, M. Pierres, and H. T. He. 1998. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *Embo J* 17:5334.
144. Sadra, A., T. Cinek, and J. B. Imboden. 2004. Translocation of CD28 to lipid rafts and costimulation of IL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11422.
145. Resh, M. D. 1994. Myristylation and palmitylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* 76:411.

146. Zhang, W., R. P. Tribble, and L. E. Samelson. 1998. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9:239.
147. Brdicka, T., D. Pavlistova, A. Leo, E. Bruyns, V. Korinek, P. Angelisova, J. Scherer, A. Shevchenko, I. Hilgert, J. Cerny, K. Drbal, Y. Kuramitsu, B. Kornacker, V. Horejsi, and B. Schraven. 2000. Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation. *J Exp Med* 191:1591.
148. Kawabuchi, M., Y. Satomi, T. Takao, Y. Shimonishi, S. Nada, K. Nagai, A. Tarakhovsky, and M. Okada. 2000. Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature* 404:999.
149. Xavier, R., T. Brennan, Q. Li, C. McCormack, and B. Seed. 1998. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8:723.
150. Pizzo, P., E. Giurisato, A. Bigsten, M. Tassi, R. Tavano, A. Shaw, and A. Viola. 2004. Physiological T cell activation starts and propagates in lipid rafts. *Immunol Lett* 91:3.
151. Pizzo, P., and A. Viola. 2004. Lipid rafts in lymphocyte activation. *Microbes Infect* 6:686.
152. Anderson, H. A., E. M. Hiltbold, and P. A. Roche. 2000. Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat Immunol* 1:156.
153. Hiltbold, E. M., N. J. Poloso, and P. A. Roche. 2003. MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. *J Immunol* 170:1329.
154. Manes, S., R. Ana Lacalle, C. Gomez-Mouton, and A. C. Martinez. 2003. From rafts to crafts: membrane asymmetry in moving cells. *Trends Immunol* 24:320.
155. Gomez-Mouton, C., J. L. Abad, E. Mira, R. A. Lacalle, E. Gallardo, S. Jimenez-Baranda, I. Illa, A. Bernad, S. Manes, and A. C. Martinez. 2001. Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9642.
156. Linsley, P. S., W. Brady, L. Grosmaire, A. Aruffo, N. K. Damle, and J. A. Ledbetter. 1991. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 173:721.
157. Lenschow, D. J., T. L. Walunas, and J. A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233.
158. Ledbetter, J. A., P. J. Martin, C. E. Spooner, D. Wofsy, T. T. Tsu, P. G. Beatty, and P. Gladstone. 1985. Antibodies to Tp67 and Tp44 augment and sustain proliferative responses of activated T cells. *J Immunol* 135:2331.
159. Ceuppens, J. L., and M. L. Baroja. 1986. Monoclonal antibodies to the CD5 antigen can provide the necessary second signal for activation of isolated resting T cells by solid-phase-bound OKT3. *J Immunol* 137:1816.
160. Gangemi, R. M., J. A. Swack, D. M. Gaviria, and P. L. Romain. 1989. Anti-T12, an anti-CD6 monoclonal antibody, can activate human T lymphocytes. *J Immunol* 143:2439.
161. Osorio, L. M., C. A. Garcia, M. Jondal, and S. C. Chow. 1994. The anti-CD6 mAb, IOR-T1, defined a new epitope on the human CD6 molecule that induces greater responsiveness in T cell receptor/CD3-mediated T cell proliferation. *Cell Immunol* 154:123.
162. Brossard, C., M. Semichon, A. Trautmann, and G. Bismuth. 2003. CD5 Inhibits Signaling at the Immunological Synapse Without Impairing Its Formation. *J Immunol* 170:4623.
163. Reinherz, E. L., S. Meuer, K. A. Fitzgerald, R. E. Hussey, H. Levine, and S. F. Schlossman. 1982. Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. *Cell* 30:735.
164. Kamoun, M., M. E. Kadin, P. J. Martin, J. Nettleton, and J. A. Hansen. 1981. A novel human T cell antigen preferentially expressed on mature T cells and shared by both well and poorly differentiated B cell leukemias and lymphomas. *J Immunol* 127:987.
165. Morimoto, C., C. E. Rudd, N. L. Letvin, M. Hagan, and S. F. Schlossman. 1988. 2H1--a novel antigen involved in T lymphocyte triggering. *J Immunol* 140:2165.
166. Hardy, R. R., and K. Hayakawa. 1994. CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol* 55:297.
167. Mayer, B., I. Funke, B. Seed, G. Riethmuller, and E. Weiss. 1990. Expression of the CD6 T lymphocyte differentiation antigen in normal human brain. *J Neuroimmunol* 29:193.
168. Kaplan, D., D. Smith, H. Meyerson, N. Pecora, and K. Lewandowska. 2001. CD5 expression by B lymphocytes and its regulation upon Epstein-Barr virus transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13850.

169. Tarakhovsky, A., W. Muller, and K. Rajewsky. 1994. Lymphocyte populations and immune responses in CD5-deficient mice. *Eur J Immunol* 24:1678.
170. Hippen, K. L., L. E. Tze, and T. W. Behrens. 2000. CD5 maintains tolerance in anergic B cells. *J Exp Med* 191:883.
171. Mackenzie, L. E., P. Y. Youinou, R. Hicks, B. Yuksel, R. A. Mageed, and P. M. Lydyard. 1991. Auto- and polyreactivity of IgM from CD5+ and CD5- cord blood B cells. *Scand J Immunol* 33:329.
172. Smith, H. R., C. L. Hansen, R. Rose, and R. T. Canoso. 1990. Autoimmune MRL-1 pr/1pr mice are an animal model for the secondary antiphospholipid syndrome. *J Rheumatol* 17:911.
173. Dauphinee, M., Z. Tovar, and N. Talal. 1988. B cells expressing CD5 are increased in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 31:642.
174. Munoz, A., T. Gallart, O. Vinas, and R. Gomis. 1991. Increased CD5-positive B lymphocytes in type I diabetes. *Clin Exp Immunol* 83:304.
175. Lydyard, P. M., A. P. Jewell, C. Jamin, and P. Y. Youinou. 1999. CD5 B cells and B-cell malignancies. *Curr Opin Hematol* 6:30.
176. Aruffo, A., M. B. Melnick, P. S. Linsley, and B. Seed. 1991. The lymphocyte glycoprotein CD6 contains a repeated domain structure characteristic of a new family of cell surface and secreted proteins. *J Exp Med* 174:949.
177. Resnick, D., A. Pearson, and M. Krieger. 1994. The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem Sci* 19:5.
178. Aruffo, A., M. A. Bowen, D. D. Patel, B. F. Haynes, G. C. Starling, J. A. Gebe, and J. Bajorath. 1997. CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function? *Immunol Today* 18:498.
179. Lecomte, O., J. B. Bock, B. W. Birren, D. Vollrath, and J. R. Parnes. 1996. Molecular linkage of the mouse CD5 and CD6 genes. *Immunogenetics* 44:385.
180. Bowen, M. A., G. S. Whitney, M. Neubauer, G. C. Starling, D. Palmer, J. Zhang, N. J. Nowak, T. B. Shows, and A. Aruffo. 1997. Structure and chromosomal location of the human CD6 gene: detection of five human CD6 isoforms. *J Immunol* 158:1149.
181. Vilà, J. M., O. Padilla, M. Arman, I. Gimferrer, and F. Lozano. 2000. The scavenger receptor cysteine-rich superfamily (SRCR-SF). Structure and function of group B members. *Inmunología* 19:105.
182. Freeman, M., J. Ashkenas, D. J. Rees, D. M. Kingsley, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and M. Krieger. 1990. An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8810.
183. Pearson, A. M. 1996. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 8:20.
184. Hohenester, E., T. Sasaki, and R. Timpl. 1999. Crystal structure of a scavenger receptor cysteine-rich domain sheds light on an ancient superfamily. *Nat Struct Biol* 6:228.
185. Yu, Q., M. Reichert, T. Brousseau, Y. Cleuter, A. Burny, and R. Kettmann. 1990. Sequence of bovine CD5. *Nucleic Acids Res* 18:5296.
186. Appleyard, G. D., and B. N. Wilkie. 1998. Porcine CD5 gene and gene product identified on the basis of inter-species conserved cytoplasmic domain sequences. *Vet Immunol Immunopathol* 60:275.
187. Jurgens, J. B., L. A. Gartland, L. Du Pasquier, J. D. Horton, T. W. Gobel, and M. D. Cooper. 1995. Identification of a candidate CD5 homologue in the amphibian *Xenopus laevis*. *J Immunol* 155:4218.
188. Huang, H. J., N. H. Jones, J. L. Strominger, and L. A. Herzenberg. 1987. Molecular cloning of Ly-1, a membrane glycoprotein of mouse T lymphocytes and a subset of B cells: molecular homology to its human counterpart Leu-1/T1 (CD5). *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:204.
189. Jones, N. H., M. L. Clabby, D. P. Dialynas, H. J. Huang, L. A. Herzenberg, and J. L. Strominger. 1986. Isolation of complementary DNA clones encoding the human lymphocyte glycoprotein T1/Leu-1. *Nature* 323:346.
190. McAlister, M. S., M. H. Brown, A. C. Willis, P. M. Rudd, D. J. Harvey, R. Aplin, D. M. Shotton, R. A. Dwek, A. N. Barclay, and P. C. Driscoll. 1998. Structural analysis of the CD5 antigen—expression, disulphide bond analysis and physical characterisation of CD5 scavenger receptor superfamily domain 1. *Eur J Biochem* 257:131.
191. Calvo, J., L. Places, G. Espinosa, O. Padilla, J. M. Vila, N. Villamor, M. Ingelmo, T. Gallart, J. Vives, J. Font, and F. Lozano. 1999. Identification of a natural soluble form of human CD5. *Tissue Antigens* 54:128.

192. Berland, R., and H. H. Wortis. 1998. An NFAT-dependent enhancer is necessary for anti-IgM-mediated induction of murine CD5 expression in primary splenic B cells. *J Immunol* 161:277.
193. Berland, R., and H. H. Wortis. 2000. Role of NFAT in the regulation of B-1 cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 252:131.
194. Tung, J. W., S. S. Kunnavatana, and L. A. Herzenberg. 2001. The regulation of CD5 expression in murine T cells. *BMC Mol Biol* 2:5.
195. Calvo, J., J. Sole, M. Simarro, J. Vives, and F. Lozano. 1996. Evolutionarily conserved transcription regulatory elements within the 5'-flanking region of the human CD5 gene. *Tissue Antigens* 47:257.
196. Muthusamy, N., K. Barton, and J. M. Leiden. 1995. Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor. *Nature* 377:639.
197. Bories, J. C., D. M. Willerford, D. Grevin, L. Davidson, A. Camus, P. Martin, D. Stehelin, and F. W. Alt. 1995. Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature* 377:635.
198. Zhuang, Y., P. Cheng, and H. Weintraub. 1996. B-lymphocyte development is regulated by the combined dosage of three basic helix-loop-helix genes, E2A, E2-2, and HEB. *Mol Cell Biol* 16:2898.
199. Arman, M., J. Calvo, M. E. Trojanowska, P. N. Cockerill, M. Santana, M. Lopez-Cabrera, J. Vives, and F. Lozano. 2004. Transcriptional regulation of human CD5: important role of Ets transcription factors in CD5 expression in T cells. *J Immunol* 172:7519.
200. Padilla, O., J. Calvo, J. M. Vila, M. Arman, I. Gimferrer, L. Places, M. T. Arias, M. A. Pujana, J. Vives, and F. Lozano. 2000. Genomic organization of the human CD5 gene. *Immunogenetics* 51:993.
201. Cron, R. Q., T. F. Gajewski, S. O. Sharrow, F. W. Fitch, L. A. Matis, and J. A. Bluestone. 1989. Phenotypic and functional analysis of murine CD3+,CD4-,CD8- TCR-gamma delta-expressing peripheral T cells. *J Immunol* 142:3754.
202. Lozano, F., J. Alberola-Ila, L. Places, T. Gallart, and J. Vives. 1990. Protein kinase C-dependent up-regulation of CD5 surface expression on normal and lymphoblastoid T cells. *Immunology* 70:434.
203. Carrera, A. C., L. Cardenas, A. Tugores, M. Alonso, F. Sanchez-Madrid, and M. O. de Landazuri. 1989. Activators of protein kinase C up-regulate the cell surface expression of CD2 and CD5 T cell glycoproteins. *J Biol Chem* 264:15650.
204. Fowlkes, B. J., L. Edison, B. J. Mathieson, and T. M. Chused. 1985. Early T lymphocytes. Differentiation in vivo of adult intrathymic precursor cells. *J Exp Med* 162:802.
205. Lanier, L. L., J. P. Allison, and J. H. Phillips. 1986. Correlation of cell surface antigen expression on human thymocytes by multi-color flow cytometric analysis: implications for differentiation. *J Immunol* 137:2501.
206. Kearse, K. P., Y. Takahama, J. A. Punt, S. O. Sharrow, and A. Singer. 1995. Early molecular events induced by T cell receptor (TCR) signaling in immature CD4+ CD8+ thymocytes: increased synthesis of TCR-alpha protein is an early response to TCR signaling that compensates for TCR-alpha instability, improves TCR assembly, and parallels other indicators of positive selection. *J Exp Med* 181:193.
207. Richie, E. R., B. McEntire, J. Phillips, and J. P. Allison. 1988. Altered expression of lymphocyte differentiation antigens on phorbol ester-activated CD4+8+ T cells. *J Immunol* 140:4115.
208. Azzam, H. S., A. Grinberg, K. Lui, H. Shen, E. W. Shores, and P. E. Love. 1998. CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J Exp Med* 188:2301.
209. Smith, K., B. Seddon, M. A. Purbhoo, R. Zamoyska, A. G. Fisher, and M. Merckenschlager. 2001. Sensory adaptation in naive peripheral CD4 T cells. *J Exp Med* 194:1253.
210. Stamou, P., J. de Jersey, D. Carmignac, C. Mamalaki, D. Kioussis, and B. Stockinger. 2003. Chronic exposure to low levels of antigen in the periphery causes reversible functional impairment correlating with changes in CD5 levels in monoclonal CD8 T cells. *J Immunol* 171:1278.
211. Barthlott, T., G. Kassiotis, and B. Stockinger. 2003. T cell regulation as a side effect of homeostasis and competition. *J Exp Med* 197:451.
212. Hayakawa, K., M. Asano, S. A. Shinton, M. Gui, L. J. Wen, J. Dashoff, and R. R. Hardy. 2003. Positive selection of anti-thy-1 autoreactive B-1 cells and natural serum autoantibody production independent from bone marrow B cell development. *J Exp Med* 197:87.
213. Teutsch, M., M. Higer, D. Wang, and H. W. Wortis. 1995. Induction of CD5 on B and T cells is suppressed by cyclosporin A, FK-520 and rapamycin. *Int Immunol* 7:381.

214. Wortis, H. H., M. Teutsch, M. Higer, J. Zheng, and D. C. Parker. 1995. B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3348.
215. Bandyopadhyay, R. S., M. R. Teutsch, and H. H. Wortis. 1995. Activation of B-cells by sIgM cross-linking induces accumulation of CD5 mRNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 194:219.
216. Borthwick, N. J., M. Bofill, I. Hassan, P. Panayiotidis, G. Janossy, M. Salmon, and A. N. Akbar. 1996. Factors that influence activated CD8+ T-cell apoptosis in patients with acute herpesvirus infections: loss of costimulatory molecules CD28, CD5 and CD6 but relative maintenance of Bax and Bcl-X expression. *Immunology* 88:508.
217. Vila, J. M., J. Calvo, L. Places, O. Padilla, M. Arman, I. Gimferrer, C. Aussel, J. Vives, and F. Lozano. 2001. Role of two conserved cytoplasmic threonine residues (T410 and T412) in CD5 signaling. *J Immunol* 166:396.
218. Lu, X., R. C. Axtell, J. F. Collawn, A. Gibson, L. B. Justement, and C. Raman. 2002. AP2 adaptor complex-dependent internalization of CD5: differential regulation in T and B cells. *J Immunol* 168:5612.
219. Spertini, F., W. Stohl, N. Ramesh, C. Moody, and R. S. Geha. 1991. Induction of human T cell proliferation by a monoclonal antibody to CD5. *J Immunol* 146:47.
220. Alberola-Ila, J., L. Places, D. A. Cantrell, J. Vives, and F. Lozano. 1992. Intracellular events involved in CD5-induced human T cell activation and proliferation. *J Immunol* 148:1287.
221. Vandenberghe, P., and J. L. Ceuppens. 1991. Immobilized anti-CD5 together with prolonged activation of protein kinase C induce interleukin 2-dependent T cell growth: evidence for signal transduction through CD5. *Eur J Immunol* 21:251.
222. Verwilghen, J., P. Vandenberghe, G. Wallays, M. de Boer, N. Anthony, G. S. Panayi, and J. L. Ceuppens. 1993. Simultaneous ligation of CD5 and CD28 on resting T lymphocytes induces T cell activation in the absence of T cell receptor/CD3 occupancy. *J Immunol* 150:835.
223. Pena-Rossi, C., L. A. Zuckerman, J. Strong, J. Kwan, W. Ferris, S. Chan, A. Tarakhovsky, A. D. Beyers, and N. Killeen. 1999. Negative regulation of CD4 lineage development and responses by CD5. *J Immunol* 163:6494.
224. Jamin, C., P. M. Lydyard, R. Le Corre, and P. Y. Youinou. 1996. CD5+B cells: differential capping and modulation of IgM and CD5. *Scand J Immunol* 43:73.
225. Osman, N., S. C. Ley, and M. J. Crumpton. 1992. Evidence for an association between the T cell receptor/CD3 antigen complex and the CD5 antigen in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 22:2995.
226. Osman, N., A. I. Lazarovits, and M. J. Crumpton. 1993. Physical association of CD5 and the T cell receptor/CD3 antigen complex on the surface of human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 23:1173.
227. Beyers, A. D., L. L. Spruyt, and A. F. Williams. 1992. Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4, or CD8 and CD5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2945.
228. Lankester, A. C., G. M. van Schijndel, J. L. Cordell, C. J. van Noesel, and R. A. van Lier. 1994. CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. *Eur J Immunol* 24:812.
229. Carmo, A. M., M. A. Castro, and F. A. Arosa. 1999. CD2 and CD3 associate independently with CD5 and differentially regulate signaling through CD5 in Jurkat T cells. *J Immunol* 163:4238.
230. Toyo-oka, K., Y. Yashiro-Ohtani, C. S. Park, X. G. Tai, K. Miyake, T. Hamaoka, and H. Fujiwara. 1999. Association of a tetraspanin CD9 with CD5 on the T cell surface: role of particular transmembrane domains in the association. *Int Immunol* 11:2043.
231. Tarakhovsky, A., S. B. Kanner, J. Hombach, J. A. Ledbetter, W. Muller, N. Killeen, and K. Rajewsky. 1995. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* 269:535.
232. Azzam, H. S., J. B. DeJarnette, K. Huang, R. Emmons, C. S. Park, C. L. Sommers, D. El-Khoury, E. W. Shores, and P. E. Love. 2001. Fine tuning of TCR signaling by CD5. *J Immunol* 166:5464.
233. Bhandoola, A., R. Bosselut, Q. Yu, M. L. Cowan, L. Feigenbaum, P. E. Love, and A. Singer. 2002. CD5-mediated inhibition of TCR signaling during intrathymic selection and development does not require the CD5 extracellular domain. *Eur J Immunol* 32:1811.
234. Chan, S., C. Waltzinger, A. Tarakhovsky, C. Benoist, and D. Mathis. 1999. An influence of CD5 on the selection of CD4-lineage T cells. *Eur J Immunol* 29:2916.
235. Kishimoto, H., and J. Sprent. 1999. Several different cell surface molecules control negative selection of medullary thymocytes. *J Exp Med* 190:65.

236. Page, D. M. 1999. Cutting edge: thymic selection and autoreactivity are regulated by multiple coreceptors involved in T cell activation. *J Immunol* 163:3577.
237. Bott, C. M., S. G. Thorneycroft, and C. J. Marshall. 1994. The sevenmaker gain-of-function mutation in p42 MAP kinase leads to enhanced signalling and reduced sensitivity to dual specificity phosphatase action. *FEBS Lett* 352:201.
238. Singer, N. G., D. A. Fox, T. M. Haqqi, L. Beretta, J. S. Endres, S. Prohaska, J. R. Parnes, J. Bromberg, and R. M. Sramkoski. 2002. CD6: expression during development, apoptosis and selection of human and mouse thymocytes. *Int Immunol* 14:585.
239. Bikah, G., J. Carey, J. R. Ciallella, A. Tarakhovsky, and S. Bondada. 1996. CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science* 274:1906.
240. Hawiger, D., R. F. Masilamani, E. Bettelli, V. K. Kuchroo, and M. C. Nussenzweig. 2004. Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity* 20:695.
241. Axtell, R. C., M. S. Webb, S. R. Barnum, and C. Raman. 2004. Cutting edge: critical role for CD5 in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of engagement reverses disease in mice. *J Immunol* 173:2928.
242. Ramos-Casals, M., J. Font, M. Garcia-Carrasco, J. Calvo, L. Places, O. Padilla, R. Cervera, M. A. Bowen, F. Lozano, and M. Ingelmo. 2001. High circulating levels of soluble scavenger receptors (sCD5 and sCD6) in patients with primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 40:1056.
243. Jamin, C., G. Magadur, A. Lamour, L. Mackenzie, P. Lydyard, P. Katsikis, and P. Youinou. 1992. Cell-free CD5 in patients with rheumatic diseases. *Immunol Lett* 31:79.
244. Noh, G. W., K. Y. Lee, H. K. Lee, D. S. Kim, H. S. Kim, H. S. Lee, and S. I. Lee. 1998. Circulating soluble CD5 in atopic dermatitis. Effects of intravenous immune globulin on the peripheral lymphocyte phenotypes in Kawasaki disease. Decreased CD5+ B cells during the acute phase of Kawasaki disease. *Mol Cells* 8:618.
245. Burgess, K. E., M. Yamamoto, K. V. Prasad, and C. E. Rudd. 1992. CD5 acts as a tyrosine kinase substrate within a receptor complex comprising T-cell receptor zeta chain/CD3 and protein-tyrosine kinases p56lck and p59fyn. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9311.
246. Davies, A. A., S. C. Ley, and M. J. Crumpton. 1992. CD5 is phosphorylated on tyrosine after stimulation of the T-cell antigen receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6368.
247. Alberola-Ila, J., L. Places, V. Fabregat, J. Vives, and F. Lozano. 1993. Different mechanisms regulate the monoclonal antibody-induced modulation of CD2, CD3, and CD5 in human lymphocytes. *Cell Immunol* 147:247.
248. Calvo, J., J. M. Vilda, L. Places, M. Simarro, O. Padilla, D. Andreu, K. S. Campbell, C. Aussel, and F. Lozano. 1998. Human CD5 signaling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by casein kinase II. *J Immunol* 161:6022.
249. Raman, C., R. P. Kimberly, A. Kuo, J. Deshane, and D. W. Litchfield. 1998. Differential CD5-dependent regulation of CD5-associated CK2 activity in mature and immature T cells: implication on TCR/CD3-mediated activation. Regulation of casein kinase 2 by direct interaction with cell surface receptor CD5. *J Immunol* 161:5817.
250. Raab, M., M. Yamamoto, and C. E. Rudd. 1994. The T-cell antigen CD5 acts as a receptor and substrate for the protein-tyrosine kinase p56lck. *Mol Cell Biol* 14:2862.
251. Gary-Gouy, H., V. Lang, S. Sarun, L. Boumsell, and G. Bismuth. 1997. In vivo association of CD5 with tyrosine-phosphorylated ZAP-70 and p21 phospho-zeta molecules in human CD3+ thymocytes. *J Immunol* 159:3739.
252. Dennehy, K. M., R. Broszeit, D. Garnett, G. A. Durrheim, L. L. Spruyt, and A. D. Beyers. 1997. Thymocyte activation induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase and pp120 with CD5. *Eur J Immunol* 27:679.
253. Dennehy, K. M., R. Broszeit, W. F. Ferris, A. D. Beyers, D. Garnett, G. A. Durrheim, and L. L. Spruyt. 1998. Thymocyte activation induces the association of the proto-oncoprotein c-cbl and ras GTPase-activating protein with CD5. Thymocyte activation induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase and pp120 with CD5. *Eur J Immunol* 28:1617.
254. Pani, G., K. D. Fischer, I. Mlinaric-Rascan, and K. A. Siminovitch. 1996. Signaling capacity of the T cell antigen receptor is negatively regulated by the PTP1C tyrosine phosphatase. *J Exp Med* 184:839.
255. Sen, G., G. Bikah, C. Venkataraman, and S. Bondada. 1999. Negative regulation of antigen receptor-mediated signaling by constitutive association of CD5 with the SHP-1 protein tyrosine phosphatase in B-1 B cells. *Eur J Immunol* 29:3319.

256. Perez-Villar, J. J., G. S. Whitney, M. A. Bowen, D. H. Hewgill, A. A. Aruffo, and S. B. Kanner. 1999. CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol* 19:2903.
257. Wang, L. L., J. Blasioli, D. R. Plas, M. L. Thomas, and W. M. Yokoyama. 1999. Specificity of the SH2 domains of SHP-1 in the interaction with the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing receptor gp49B. *J Immunol* 162:1318.
258. Gary-Gouy, H., P. Bruhns, C. Schmitt, A. Dalloul, M. Daeron, and G. Bismuth. 2000. The pseudo-immunoreceptor tyrosine-based activation motif of CD5 mediates its inhibitory action on B-cell receptor signaling. *J Biol Chem* 275:548.
259. Murphy, M. A., R. G. Schnall, D. J. Venter, L. Barnett, I. Bertoncello, C. B. Thien, W. Y. Langdon, and D. D. Bowtell. 1998. Tissue hyperplasia and enhanced T-cell signalling via ZAP-70 in c-Cbl-deficient mice. *Mol Cell Biol* 18:4872.
260. Naramura, M., H. K. Kole, R. J. Hu, and H. Gu. 1998. Altered thymic positive selection and intracellular signals in Cbl-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15547.
261. Ota, Y., and L. E. Samelson. 1997. The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science* 276:418.
262. Thien, C. B., D. D. Bowtell, and W. Y. Langdon. 1999. Perturbed regulation of ZAP-70 and sustained tyrosine phosphorylation of LAT and SLP-76 in c-Cbl-deficient thymocytes. *J Immunol* 162:7133.
263. Griffith, L. C., H. Schulman, and M. Tagawa. 1989. In vivo and in vitro phosphorylation of murine lymphocyte differentiation antigen CD5. *Biochem Biophys Res Commun* 159:536.
264. Lozano, F., J. Alberola-Ila, L. Places, T. Gallart, and J. Vives. 1990. Phosphorylation-mediated changes in the electrophoretic mobility of CD5 molecules. *Eur J Biochem* 193:469.
265. Rifkin, I. R., P. L. Channavajhala, H. L. Kiefer, A. J. Carmack, E. Landesman-Bollag, B. C. Beaudette, B. Jersky, D. J. Salant, S. T. Ju, A. Marshak-Rothstein, and D. C. Seldin. 1998. Acceleration of lpr lymphoproliferative and autoimmune disease by transgenic protein kinase CK2 alpha. *J Immunol* 161:5164.
266. Heriche, J. K., F. Lebrin, T. Rabilloud, D. Leroy, E. M. Chambaz, and Y. Goldberg. 1997. Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2alpha. *Science* 276:952.
267. Lin, A., J. Frost, T. Deng, T. Smeal, N. al-Alawi, U. Kikkawa, T. Hunter, D. Brenner, and M. Karin. 1992. Casein kinase II is a negative regulator of c-Jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell* 70:777.
268. Bauch, A., K. S. Campbell, and M. Reth. 1998. Interaction of the CD5 cytoplasmic domain with the Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase IIdelta. *Eur J Immunol* 28:2167.
269. Nghiem, P., T. Ollick, P. Gardner, and H. Schulman. 1994. Interleukin-2 transcriptional block by multifunctional Ca²⁺/calmodulin kinase. *Nature* 371:347.
270. Hama, N., F. Paliogianni, B. J. Fessler, and D. T. Boumpas. 1995. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II downregulates both calcineurin and protein kinase C-mediated pathways for cytokine gene transcription in human T cells. *J Exp Med* 181:1217.
271. Gringhuis, S. I., L. F. de Leij, G. A. Wayman, H. Tokumitsu, and E. Vellenga. 1997. The Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase type IV is involved in the CD5-mediated signaling pathway in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 272:31809.
272. Ledbetter, J. A., L. M. Rose, C. E. Spooner, P. G. Beatty, P. J. Martin, and E. A. Clark. 1985. Antibodies to common leukocyte antigen p220 influence human T cell proliferation by modifying IL 2 receptor expression. *J Immunol* 135:1819.
273. June, C. H., P. S. Rabinovitch, and J. A. Ledbetter. 1987. CD5 antibodies increase intracellular ionized calcium concentration in T cells. *J Immunol* 138:2782.
274. Simarro, M., C. Pelassy, J. Calvo, L. Places, C. Aussel, and F. Lozano. 1997. The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production. *J Immunol* 159:4307.
275. Simarro, M., J. Calvo, J. M. Vila, L. Places, O. Padilla, J. Alberola-Ila, J. Vives, and F. Lozano. 1999. Signaling through CD5 involves acidic sphingomyelinase, protein kinase C-zeta, mitogen-activated protein kinase kinase, and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Immunol* 162:5149.
276. Hannun, Y. A. 1996. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274:1855.
277. Lozano, J., E. Berra, M. M. Municio, M. T. Diaz-Meco, I. Dominguez, L. Sanz, and J. Moscat. 1994. Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J Biol Chem* 269:19200.

278. Muller, G., M. Ayoub, P. Storz, J. Rennecke, D. Fabbro, and K. Pfizenmaier. 1995. PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *Embo J* 14:1961.
279. Nakanishi, H., K. A. Brewer, and J. H. Exton. 1993. Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 268:13.
280. Limatola, C., D. Schaap, W. H. Moolenaar, and W. J. van Blitterswijk. 1994. Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isoforms and other acidic lipids. *Biochem J* 304:1001.
281. Ward, S. G., A. Wilson, L. Turner, J. Westwick, and D. M. Sansom. 1995. Inhibition of CD28-mediated T cell costimulation by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor wortmannin. *Eur J Immunol* 25:526.
282. Pages, F., M. Ragueneau, S. Klasen, M. Battifora, D. Couez, R. Sweet, A. Truneh, S. G. Ward, and D. Olive. 1996. Two distinct intracytoplasmic regions of the T-cell adhesion molecule CD28 participate in phosphatidylinositol 3-kinase association. *J Biol Chem* 271:9403.
283. Schneider, H., K. V. Prasad, S. E. Shoelson, and C. E. Rudd. 1995. CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *J Exp Med* 181:351.
284. Zhou, X. Y., Y. Yashiro-Ohtani, K. Toyo-Oka, C. S. Park, X. G. Tai, T. Hamaoka, and H. Fujiwara. 2000. CD5 costimulation up-regulates the signaling to extracellular signal-regulated kinase activation in CD4+CD8+ thymocytes and supports their differentiation to the CD4 lineage. *J Immunol* 164:1260.
285. Gringhuis, S. I., L. F. de Leij, P. J. Coffey, and E. Vellenga. 1998. Signaling through CD5 activates a pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase, Vav, and Rac1 in human mature T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 18:1725.
286. Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R. J. Davis, and M. E. Greenberg. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326.
287. Van de Velde, H., I. von Hoegen, W. Luo, J. R. Parnes, and K. Thielemans. 1991. The B-cell surface protein CD72/Lyb-2 is the ligand for CD5. *Nature* 351:662.
288. Luo, W., H. Van de Velde, I. von Hoegen, J. R. Parnes, and K. Thielemans. 1992. Ly-1 (CD5), a membrane glycoprotein of mouse T lymphocytes and a subset of B cells, is a natural ligand of the B cell surface protein Lyb-2 (CD72). *J Immunol* 148:1630.
289. Biancone, L., M. A. Bowen, A. Lim, A. Aruffo, G. Andres, and I. Stamenkovic. 1996. Identification of a novel inducible cell-surface ligand of CD5 on activated lymphocytes. *J Exp Med* 184:811.
290. Bikah, G., F. M. Lynd, A. A. Aruffo, J. A. Ledbetter, and S. Bondada. 1998. A role for CD5 in cognate interactions between T cells and B cells, and identification of a novel ligand for CD5. *Int Immunol* 10:1185.
291. Pospisil, R., M. G. Fitts, and R. G. Mage. 1996. CD5 is a potential selecting ligand for B cell surface immunoglobulin framework region sequences. *J Exp Med* 184:1279.
292. Pospisil, R., G. J. Silverman, G. E. Marti, A. Aruffo, M. A. Bowen, and R. G. Mage. 2000. CD5 is a potential selecting ligand for B-cell surface immunoglobulin: a possible role in maintenance and selective expansion of normal and malignant B cells. *Leuk Lymphoma* 36:353.
293. Pospisil, R., and R. G. Mage. 1998. CD5 and other superantigens as 'ticklers' of the B-cell receptor. *Immunol Today* 19:106.
294. Haas, K. M., and D. M. Estes. 2001. The identification and characterization of a ligand for bovine CD5. *J Immunol* 166:3158.
295. Calvo, J., L. Places, O. Padilla, J. M. Vila, J. Vives, M. A. Bowen, and F. Lozano. 1999. Interaction of recombinant and natural soluble CD5 forms with an alternative cell surface ligand. *Eur J Immunol* 29:2119.
296. Bowen, M. A., D. D. Patel, X. Li, B. Modrell, A. R. Malacko, W. C. Wang, H. Marquardt, M. Neubauer, J. M. Pesando, U. Francke, and et al. 1995. Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med* 181:2213.
297. Gobel, T. W., C. H. Chen, and M. D. Cooper. 1996. Expression of an avian CD6 candidate is restricted to alpha beta T cells, splenic CD8+ gamma delta T cells and embryonic natural killer cells. *Eur J Immunol* 26:1743.
298. Castro, M. A., R. J. Nunes, M. I. Oliveira, P. A. Tavares, C. Simoes, J. R. Parnes, A. Moreira, and A. M. Carmo. 2003. OX52 is the rat homologue of CD6: evidence for an effector function in the regulation of CD5 phosphorylation. *J Leukoc Biol* 73:183.
- 298A. Castro, M., P.A. Tavares, M.S. Almeida, R.J. Nunes, M.D. Wright, D. Mason, A. Moreira, and A.M. Carmo. 2002. CD2 physically associates with CD5 in rat T lymphocytes with the involvement of both extracellular and intracellular domains. *Eur. J. Immunol.* 32:1509.

299. Robinson, W. H., S. S. Prohaska, J. C. Santoro, H. L. Robinson, and J. R. Parnes. 1995. Identification of a mouse protein homologous to the human CD6 T cell surface protein and sequence of the corresponding cDNA. *J Immunol* 155:4739.
300. Robinson, W. H., H. E. Neuman de Vegvar, S. S. Prohaska, J. W. Rhee, and J. R. Parnes. 1995. Human CD6 possesses a large, alternatively spliced cytoplasmic domain. *Eur J Immunol* 25:2765.
301. Kobarg, J., G. S. Whitney, D. Palmer, A. Aruffo, and M. A. Bowen. 1997. Analysis of the tyrosine phosphorylation and calcium fluxing of human CD6 isoforms with different cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* 27:2971.
302. Cardenas, L., A. C. Carrera, E. Yague, R. Pulido, F. Sanchez-Madrid, and M. O. de Landazuri. 1990. Phosphorylation-dephosphorylation of the CD6 glycoprotein renders two isoforms of 130 and 105 kilodaltons. Effect of serum and protein kinase C activators. *J Immunol* 145:1450.
303. Rasmussen, R. A., S. L. Counts, J. F. Daley, and S. F. Schlossman. 1994. Isolation and characterization of CD6- T cells from peripheral blood. *J Immunol* 152:527.
304. Osorio, L. M., A. De Santiago, M. Aguilar-Santelises, H. Mellstedt, and M. Jondal. 1997. CD6 ligation modulates the Bcl-2/Bax ratio and protects chronic lymphocytic leukemia B cells from apoptosis induced by anti-IgM. *Blood* 89:2833.
305. Starling, G. C., G. S. Whitney, A. W. Siadak, M. B. Llewellyn, M. A. Bowen, A. G. Farr, and A. A. Aruffo. 1996. Characterization of mouse CD6 with novel monoclonal antibodies which enhance the allogeneic mixed leukocyte reaction. *Eur J Immunol* 26:738.
306. Swack, J. A., R. M. Gangemi, C. E. Rudd, C. Morimoto, S. F. Schlossman, and P. L. Romain. 1989. Structural characterization of CD6: properties of two distinct epitopes involved in T cell activation. *Mol Immunol* 26:1037.
307. Bott, C. M., J. B. Doshi, C. Morimoto, P. L. Romain, and D. A. Fox. 1993. Activation of human T cells through CD6: functional effects of a novel anti-CD6 monoclonal antibody and definition of four epitopes of the CD6 glycoprotein. *Int Immunol* 5:783.
308. Osorio, L. M., M. Rottenberg, M. Jondal, and S. C. Chow. 1998. Simultaneous cross-linking of CD6 and CD28 induces cell proliferation in resting T cells. *Immunology* 93:358.
309. Hassan, N. J., A. N. Barclay, and M. H. Brown. 2004. Optimal T cell activation requires the engagement of CD6 and CD166. *Eur J Immunol* 34:930.
310. Ledbetter, J. A., N. A. Norris, A. Grossmann, L. S. Grosmaire, C. H. June, F. M. Uckun, W. L. Cosand, and P. S. Rabinovitch. 1989. Enhanced transmembrane signalling activity of monoclonal antibody heteroconjugates suggests molecular interactions between receptors on the T cell surface. *Mol Immunol* 26:137.
311. Singer, N. G., B. C. Richardson, D. Powers, F. Hooper, F. Lialios, J. Endres, C. M. Bott, and D. A. Fox. 1996. Role of the CD6 glycoprotein in antigen-specific and autoreactive responses of cloned human T lymphocytes. *Immunology* 88:537.
312. Soiffer, R. J., D. Fairclough, M. Robertson, E. Alyea, K. Anderson, A. Freedman, L. Bartlett-Pandite, D. Fisher, R. L. Schlossman, R. Stone, C. Murray, A. Freeman, K. Marcus, P. Mauch, L. Nadler, and J. Ritz. 1997. CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation for acute leukemia in first complete remission. *Blood* 89:3039.
313. Soiffer, R. J., R. Gonin, C. Murray, M. J. Robertson, K. Cochran, S. Chartier, C. Cameron, J. Daley, H. Levine, L. M. Nadler, and et al. 1993. Prediction of graft-versus-host disease by phenotypic analysis of early immune reconstitution after CD6-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 82:2216.
314. Hale, L. P., and B. F. Haynes. 1992. Bromelain treatment of human T cells removes CD44, CD45RA, E2/MIC2, CD6, CD7, CD8, and Leu 8/LAM1 surface molecules and markedly enhances CD2-mediated T cell activation. *J Immunol* 149:3809.
315. Wee, S., G. L. Schieven, J. M. Kiriara, T. T. Tsu, J. A. Ledbetter, and A. Aruffo. 1993. Tyrosine phosphorylation of CD6 by stimulation of CD3: augmentation by the CD4 and CD2 coreceptors. *J Exp Med* 177:219.
316. Osorio, L. M., C. Ordonez, C. A. Garcia, M. Jondal, and S. C. Chow. 1995. Evidence for protein tyrosine kinase involvement in CD6-induced T cell proliferation. *Cell Immunol* 166:44.
317. Wee, S., W. C. Wang, A. G. Farr, A. J. Nelson, D. D. Patel, B. F. Haynes, P. S. Linsley, A. Aruffo, L. L. Zhao, J. D. Davidson, S. C. Wee, S. I. Roth, T. A. Mustoe, T. Kawai, J. Wong, J. MacLean, A. B. Cosimi, D. M. Stroka, G. D'Souza, T. C. Fuller, D. M. Fitzpatrick, N. Y. Kim, H. S. Oh, M. H. Jung, S. H. Wee, J. H. Choi, K. H. Lee, C. G. Lee, B. S. Kim, H. D. Joo, S. W. Kang, J. M. Dowding, M. J. Nadakavukaren, and B. J. Wilkinson. 1994. Characterization of a CD6 ligand(s) expressed on human- and murine-derived cell lines and murine lymphoid tissues. *Cell Immunol* 158:353.
318. Patel, D. D., S. F. Wee, L. P. Whichard, M. A. Bowen, J. M. Pesando, A. Aruffo, and B. F. Haynes. 1995. Identification and characterization of a 100-kD ligand for CD6 on human thymic epithelial cells. *J Exp Med* 181:1563.

319. Singer, N. G., R. Mitra, F. Lialios, B. C. Richardson, R. M. Marks, J. M. Pesando, D. A. Fox, and B. J. Nickoloff. 1997. CD6 dependent interactions of T cells and keratinocytes: functional evidence for a second CD6 ligand on gamma-interferon activated keratinocytes. *Immunol Lett* 58:9.
320. Joo, Y. S., N. G. Singer, J. L. Endres, S. Sarkar, R. W. Kinne, R. M. Marks, and D. A. Fox. 2000. Evidence for the expression of a second CD6 ligand by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 43:329.
321. Williams, A. F., and A. N. Barclay. 1988. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 6:381.
322. Whitney, G. S., G. C. Starling, M. A. Bowen, B. Modrell, A. W. Siadak, and A. Aruffo. 1995. The membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 contains the activated leukocyte cell adhesion molecule binding site. *J Biol Chem* 270:18187.
323. Bowen, M. A., J. Bajorath, A. W. Siadak, B. Modrell, A. R. Malacko, H. Marquardt, S. G. Nadler, and A. Aruffo. 1996. The amino-terminal immunoglobulin-like domain of activated leukocyte cell adhesion molecule binds specifically to the membrane-proximal scavenger receptor cysteine-rich domain of CD6 with a 1:1 stoichiometry. *J Biol Chem* 271:17390.
324. van Kempen, L. C., J. M. Nelissen, W. G. Degen, R. Torensma, U. H. Weidle, H. P. Bloemers, C. G. Figdor, and G. W. Swart. 2001. Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction. *J Biol Chem* 276:25783.
325. Skonier, J. E., D. L. Bodian, J. Emswiler, M. A. Bowen, A. Aruffo, and J. Bajorath. 1997. Mutational analysis of the CD6 ligand binding domain. *Protein Eng* 10:943.
326. Arulanandam, A. R., J. M. Withka, D. F. Wyss, G. Wagner, A. Kister, P. Pallai, M. A. Recny, and E. L. Reinherz. 1993. The CD58 (LFA-3) binding site is a localized and highly charged surface area on the AGFCC'C" face of the human CD2 adhesion domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11613.
327. van der Merwe, P. A., P. R. Crocker, M. Vinson, A. N. Barclay, R. Schauer, and S. Kelm. 1996. Localization of the putative sialic acid-binding site on the immunoglobulin superfamily cell-surface molecule CD22. *J Biol Chem* 271:9273.
328. Vinson, M., P. A. van der Merwe, S. Kelm, A. May, E. Y. Jones, and P. R. Crocker. 1996. Characterization of the sialic acid-binding site in sialoadhesin by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 271:9267.
329. Bodian, D. L., J. E. Skonier, M. A. Bowen, M. Neubauer, A. W. Siadak, A. Aruffo, and J. Bajorath. 1997. Identification of residues in CD6 which are critical for ligand binding. *Biochemistry* 36:2637.
330. Cortes, F., F. Deschaseaux, N. Uchida, M. C. Labastie, A. M. Frieria, D. He, P. Charbord, and B. Peault. 1999. HCA, an immunoglobulin-like adhesion molecule present on the earliest human hematopoietic precursor cells, is also expressed by stromal cells in blood-forming tissues. *Blood* 93:826.
331. Ohneda, O., K. Ohneda, F. Arai, J. Lee, T. Miyamoto, Y. Fukushima, D. Dowbenko, L. A. Lasky, and T. Suda. 2001. ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development. *Blood* 98:2134.
332. San Jose, E., A. Borroto, F. Niedergang, A. Alcover, and B. Alarcon. 2000. Triggering the TCR complex causes the downregulation of nonengaged receptors by a signal transduction-dependent mechanism. *Immunity* 12:161.
333. Lusciuskas, F. W., G. S. Kansas, H. Ding, P. Pizcueta, B. E. Schleiffenbaum, T. F. Tedder, and M. A. Gimbrone, Jr. 1994. Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2-integrins. *J Cell Biol* 125:1417.
334. Goding, J. W. 1976. Conjugation of antibodies with fluorochromes: modifications to the standard methods. *J Immunol Methods* 13:215.
335. Chevray, P. M., and D. Nathans. 1992. Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5789.
336. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. T. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons.
337. Sorkin, A., M. McClure, F. Huang, and R. Carter. 2000. Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Curr Biol* 10:1395.
338. Gordon, G. W., G. Berry, X. H. Liang, B. Levine, and B. Herman. 1998. Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J* 74:2702.
339. Romani, N., S. Gruner, D. Brang, E. Kampgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P. O. Fritsch, R. M. Steinman, and G. Schuler. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180:83.
340. Sarrias, M. R., O. Padilla, Y. Monreal, M. Carrascal, J. Abian, J. Vives, J. Yelamos, and F. Lozano. 2004. Biochemical characterization of recombinant and circulating human Spalpa. *Tissue Antigens* 63:335.

341. Kohfeldt, E., P. Maurer, C. Vannahme, and R. Timpl. 1997. Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett* 414:557.
342. Nischt, R., J. Pottgiesser, T. Krieg, U. Mayer, M. Aumailley, and R. Timpl. 1991. Recombinant expression and properties of the human calcium-binding extracellular matrix protein BM-40. *Eur J Biochem* 200:529.
343. Feilotter, H. E., G. J. Hannon, C. J. Ruddell, and D. Beach. 1994. Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res* 22:1502.
344. Gietz, D., A. St Jean, R. A. Woods, and R. H. Schiestl. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20:1425.
345. Low, M. G. 1989. Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins. *Faseb J* 3:1600.
346. Brown, D. A., and J. K. Rose. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68:533.
347. Sargiacomo, M., M. Sudol, Z. Tang, and M. P. Lisanti. 1993. Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J Cell Biol* 122:789.
348. Chang, W. J., Y. S. Ying, K. G. Rothberg, N. M. Hooper, A. J. Turner, H. A. Gambliel, J. De Gunzburg, S. M. Mumby, A. G. Gilman, and R. G. Anderson. 1994. Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J Cell Biol* 126:127.
349. Lisanti, M. P., P. E. Scherer, J. Vidugiriene, Z. Tang, A. Hermanowski-Vosatka, Y. H. Tu, R. F. Cook, and M. Sargiacomo. 1994. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 126:111.
350. Teh, S. J., N. Killeen, A. Tarakhovskiy, D. R. Littman, and H. S. Teh. 1997. CD2 regulates the positive selection and function of antigen-specific CD4- CD8+ T cells. *Blood* 89:1308.
351. Cerny, J., H. Stockinger, and V. Horejsi. 1996. Noncovalent associations of T lymphocyte surface proteins. *Eur J Immunol* 26:2335.
352. Yashiro-Ohtani, Y., X. Y. Zhou, K. Toyo-Oka, X. G. Tai, C. S. Park, T. Hamaoka, R. Abe, K. Miyake, and H. Fujiwara. 2000. Non-CD28 costimulatory molecules present in T cell rafts induce T cell costimulation by enhancing the association of TCR with rafts. *J Immunol* 164:1251.
353. Ilangumaran, S., A. Briol, and D. C. Hoessli. 1998. CD44 selectively associates with active Src family protein tyrosine kinases Lck and Fyn in glycosphingolipid-rich plasma membrane domains of human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 91:3901.
354. Yang, H., and E. L. Reinherz. 2001. Dynamic recruitment of human CD2 into lipid rafts. Linkage to T cell signal transduction. *J Biol Chem* 276:18775.
355. Grootjans, J. J., P. Zimmermann, G. Reekmans, A. Smets, G. Degeest, J. Durr, and G. David. 1997. Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13683.
356. Songyang, Z., A. S. Fanning, C. Fu, J. Xu, S. M. Marfatia, A. H. Chishti, A. Crompton, A. C. Chan, J. M. Anderson, and L. C. Cantley. 1997. Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275:73.
357. Sheng, M., and C. Sala. 2001. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* 24:1.
358. Hung, A. Y., and M. Sheng. 2002. PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* 277:5699.
359. Harris, B. Z., and W. A. Lim. 2001. Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* 114:3219.
360. Grootjans, J. J., G. Reekmans, H. Ceulemans, and G. David. 2000. Syntenin-syndecan binding requires syndecan-synteny and the co-operation of both PDZ domains of syntenin. *J Biol Chem* 275:19933.
361. Fernandez-Larrea, J., A. Merlos-Suarez, J. M. Urena, J. Baselga, and J. Arribas. 1999. A role for a PDZ protein in the early secretory pathway for the targeting of proTGF-alpha to the cell surface. *Mol Cell* 3:423.
362. Iuliano, R., F. Trapasso, I. Sama, I. Le Pera, M. L. Martelli, F. Lembo, M. Santoro, G. Viglietto, L. Chiariotti, and A. Fusco. 2001. Rat protein tyrosine phosphatase eta physically interacts with the PDZ domains of syntenin. *FEBS Lett* 500:41.
363. Ohno, K., M. Koroll, O. El Far, P. Scholze, J. Gomez, and H. Betz. 2004. The neuronal glycine transporter 2 interacts with the PDZ domain protein syntenin-1. *Mol Cell Neurosci* 26:518.

364. Lin, J., and A. Weiss. 2003. The tyrosine phosphatase CD148 is excluded from the immunologic synapse and down-regulates prolonged T cell signaling. *J Cell Biol* 162:673.
365. Lesley, J., R. Hyman, and P. W. Kincade. 1993. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol* 54:271.
366. Hammond, D. M., P. S. Nagarkatti, L. R. Gote, A. Seth, M. R. Hassuneh, and M. Nagarkatti. 1993. Double-negative T cells from MRL-lpr/lpr mice mediate cytolytic activity when triggered through adhesion molecules and constitutively express perforin gene. *J Exp Med* 178:2225.
367. Rafi-Janajreh, A. Q., P. S. Nagarkatti, and M. Nagarkatti. 1998. Role of CD44 in CTL and NK cell activity. *Front Biosci* 3:d665.
368. Seth, A., L. Gote, M. Nagarkatti, and P. S. Nagarkatti. 1991. T-cell-receptor-independent activation of cytolytic activity of cytotoxic T lymphocytes mediated through CD44 and gp90MEL-14. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7877.
369. McCallip, R. J., Y. Do, M. T. Fisher, J. L. Robertson, P. S. Nagarkatti, and M. Nagarkatti. 2002. Role of CD44 in activation-induced cell death: CD44-deficient mice exhibit enhanced T cell response to conventional and superantigens. *Int Immunol* 14:1015.
370. Nandi, A., P. Estess, M. Siegelman, M. H. Siegelman, and M. Mohamadzadeh. 2004. Bimolecular complex between rolling and firm adhesion receptors required for cell arrest; CD44 association with VLA-4 in T cell extravasation. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. Interleukin 15 induces endothelial hyaluronan expression in vitro and promotes activated T cell extravasation through a CD44-dependent pathway in vivo. *Immunity* 20:455.
371. van der Merwe, P. A., D. L. Bodian, S. Daenke, P. Linsley, and S. J. Davis. 1997. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med* 185:393.
372. van der Merwe, P. A., A. N. Barclay, D. W. Mason, E. A. Davies, B. P. Morgan, M. Tone, A. K. Krishnam, C. Ianelli, and S. J. Davis. 1994. Human cell-adhesion molecule CD2 binds CD58 (LFA-3) with a very low affinity and an extremely fast dissociation rate but does not bind CD48 or CD59. *Biochemistry* 33:10149.
373. Dykstra, M., A. Cherukuri, H. W. Sohn, S. J. Tzeng, and S. K. Pierce. 2003. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. *Annu Rev Immunol* 21:457.
374. Sontag, E., S. Fedorov, C. Kamibayashi, D. Robbins, M. Cobb, and M. Mumby. 1993. The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* 75:887.
375. Chuang, E., T. S. Fisher, R. W. Morgan, M. D. Robbins, J. M. Duerr, M. G. Vander Heiden, J. P. Gardner, J. E. Hambor, M. J. Neveu, and C. B. Thompson. 2000. The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity* 13:313.
- 375A. Fan, GH., Sai, J., and A. Richmand. 2001. Phosphorylation-independent association of CXCR2 with the protein phosphatase 2A core enzyme. *J Biol. Chem.* 18:276.
376. Alberola-Ila, J., L. Places, F. Lozano, and J. Vives. 1993. Association of an activation inducible serine kinase activity with CD5. *J Immunol* 151:4423.
377. Fialka, I., P. Steinlein, H. Ahorn, G. Bock, P. D. Burbelo, M. Haberkeller, F. Lottspeich, K. Paiha, C. Pasquali, and L. A. Huber. 1999. Identification of syntenin as a protein of the apical early endocytic compartment in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 274:26233.
378. Zimmermann, P., D. Tomatis, M. Rosas, J. Grootjans, I. Leenaerts, G. Degeest, G. Reekmans, C. Coomans, and G. David. 2001. Characterization of syntenin, a syndecan-binding PDZ protein, as a component of cell adhesion sites and microfilaments. *Mol Biol Cell* 12:339.
379. Geijsen, N., I. J. Uings, C. Pals, J. Armstrong, M. McKinnon, J. A. Raaijmakers, J. W. Lammers, L. Koenderman, and P. J. Coffey. 2001. Cytokine-specific transcriptional regulation through an IL-5Ralpha interacting protein. *Science* 293:1136.
380. Kang, B. S., D. R. Cooper, F. Jelen, Y. Devedjiev, U. Derewenda, Z. Dauter, J. Otlewski, and Z. S. Derewenda. 2003. PDZ tandem of human syntenin: crystal structure and functional properties. *Structure (Camb)* 11:459.
381. Fanning, A. S., and J. M. Anderson. 1999. PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. Protein-protein interactions: PDZ domain networks. *J Clin Invest* 103:767.
382. Bezprozvanny, I., and A. Maximov. 2001. Classification of PDZ domains. *FEBS Lett* 509:457.
383. Zimmermann, P., K. Meerschaert, G. Reekmans, I. Leenaerts, J. V. Small, J. Vandekerckhove, G. David, and J. Gettemans. 2002. PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane. *Mol Cell* 9:1215.

384. Li, A. L., H. Y. Li, B. F. Jin, Q. N. Ye, T. Zhou, X. D. Yu, X. Pan, J. H. Man, K. He, M. Yu, M. R. Hu, J. Wang, S. C. Yang, B. F. Shen, and X. M. Zhang. 2004. A novel eIF5A complex functions as a regulator of p53 and p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 14:14.
385. Dustin, M. L., and D. R. Colman. 2002. Neural and immunological synaptic relations. *Science* 298:785.
386. Jannatipour, M., P. Dion, S. Khan, H. Jindal, X. Fan, J. Laganriere, A. H. Chishti, and G. A. Rouleau. 2001. Schwannomin isoform-1 interacts with syntenin via PDZ domains. *J Biol Chem* 276:33093.
387. Lin, D., G. D. Gish, Z. Songyang, and T. Pawson. 1999. The carboxyl terminus of B class ephrins constitutes a PDZ domain binding motif. *J Biol Chem* 274:3726.
388. Koroll, M., F. G. Rathjen, and H. Volkmer. 2001. The neural cell recognition molecule neurofascin interacts with syntenin-1 but not with syntenin-2, both of which reveal self-associating activity. *J Biol Chem* 276:10646.
389. Enz, R., and C. Croci. 2003. Different binding motifs in metabotropic glutamate receptor type 7b for filamin A, protein phosphatase 1C, protein interacting with protein kinase C (PICK) 1 and syntenin allow the formation of multimeric protein complexes. *Biochem J* 372:183.
390. Sanford, J. L., T. A. Mays, and J. A. Rafael-Fortney. 2004. CASK and Dlg form a PDZ protein complex at the mammalian neuromuscular junction. *Muscle Nerve* 30:164.
391. Xavier, R., S. Rabizadeh, K. Ishiguro, N. Andre, J. B. Ortiz, H. Wachtel, D. G. Morris, M. Lopez-Illasaca, A. C. Shaw, W. Swat, and B. Seed. 2004. Discs large (Dlg1) complexes in lymphocyte activation. *J Cell Biol* 166:173.

VIII. PUBLICACIONES

Este trabajo de tesis doctoral ha originado las siguientes publicaciones:

Gimferrer I., Farnós M., Calvo M., Mittelbrunn M., Enrich E., Sánchez-Madrid F., Vives J. y Lozano F. 2003. "The accessory molecules CD5 y CD6 associate on the membrane of lymphoid T cells". J. Biol. Chem. vol. 278 nº. 10 pp. 8564-8571.

Gimferrer I., Calvo M., Mittelbrunn M., Farnós M., Sarrias M.R., Enrich E., Vives J., Sánchez-Madrid F., y Lozano F. 2004. "Relevance of CD6-mediated inteeractions in T cell activation and proliferation". J.Immunol. vol.173. pp.2262-2270.

Gimferrer I., Ibañez A., Farnós M., Sarrias M.R., Vives J., Serra-Pagès C., y Lozano F. "The lymphocyte receptor CD6 interacts with syntenin-1, a scaffolding protein containing PDZ domains" Enviado para su publicación al Journal of Immunology.