



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA

Departament de Biologia Cel·lular
i Anatomia Patològica

CINASAS INTRACELULARES Y SEÑALIZACION MEDIADA POR CD5

Tesis presentada por
JOSEP M^a VILÀ DE LAS HERAS

Para optar al grado de
DOCTOR EN BIOQUÍMICA

Director: Dr. Francisco Lozano Soto
Tutor: Prof. Dr. Carles Enrich Bastús

Tesis realizada en el Servei d'Immunologia
de l'Hospital Clínic de Barcelona.

11 de Diciembre del 2001

**Als meus pares, Josep M^a i Matilde,
i als meus germans,
Ignasi, Júlia, Glòria i Cristina.**

**A la memòria
de la Mònica Gudayol Llacuna.**

Els anys que hem passat junts
has estat per a mi la llum,
la llum que ha donat color a la meua vida,
que m'ha guiat pel camí de la felicitat.
Malgrat que ara no et tinc al meu costat,
sé que, per damunt del meu dolor,
la teva llum continua brillant,
i em dóna forces per seguir endavant.



“Porque de ti volví a aprender el nombre de las cosas.

Porque de ti volví a aprender lo necesario:

pan, casa, destino, camino.

*De ti volví a aprender,
del bosque de tu alegría,
del brillo de tus ojos,
a disfrutar del tiempo lento,
a rechazar el tedio y luchar contra él.*

Quedaba mucho por hacer.

*Arreglar la huerta,
pasear por las orillas del otoño,
recoger los sueños.*

Quedaba mucho por hacer.

Quedaba mucho.

...”

Del Bosque de Tu Alegría

Manolo García, 1998

ÍNDICE

Abreviaturas	5
I. INTRODUCCIÓN	8
1. El receptor antigénico de célula T	9
1.1 Estructura del complejo TCR	9
1.2 Señalización intracelular	10
2. Moléculas accesorias en la activación linfocitaria de célula T	13
2.1 Función de las moléculas accesorias en las respuestas inmunitarias de célula T	13
2.2 Distribución de las moléculas accesorias durante la activación linfocitaria T	14
3. El receptor linfocitario humano CD5	16
3.1 Expresión	16
3.2 Estructura proteica	17
3.2.1 Extracelular	17
3.2.2 Intracelular	18
3.3 Estructura génica	18
3.4 Ligando(s)	19
3.5 Función	20
3.6 Señalización intracelular	20
3.6.1 Señalización estimuladora mediada por PTKs	20
3.6.2 Señalización negativa por reclutamiento de proteínas citoplasmáticas	21
3.6.3 Señalización mediada por segundos mensajeros lipídicos	22
3.6.4 Cascadas MAPK de señalización	23
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
1. Reactivos químicos	29
2. Anticuerpos	29
3. Vectores	29

4. Células y transfectantes	30
5. Construcciones de CD5	30
6. Proteínas de fusión GST	31
7. Transformación de levaduras por el procedimiento con acetato de litio (LiAc)	31
8. Sistema del <i>two-hybrid</i> en levaduras	32
9. Co-precipitación <i>in vitro</i> de CKII β y CD5	32
10. Estimulación celular con OKT3 y PV para el estudio de la tirosinfosforilación de CD5	32
11. Estimulación celular con Cris-1 y OKT3 para el estudio de tirosinfosforilación de proteínas adaptadoras	32
12. Marcaje metabólico con fósforo radioactivo ^{23}P y estimulación celular con PMA	33
13. Inmunoprecipitación de CD5, Grb2, c-Cbl y LAT	33
14. Detección de proteínas por análisis de <i>western blot</i>	33
15. Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> de CD5 por CKII y PKC	34
16. Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> de CD5 por Lck y Fyn	34
17. Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> por la cinasa asociada a CD5	34
18. Análisis de la internalización de CD5 inducida por anticuerpo	34
19. Análisis de la generación de DAG	35
IV. RESULTADOS	36
(i) CD5 como sustrato de cinasas	37
1. Fosforilación de CD5 en residuos serina: “ <i>Casein Kinase II</i> se asocia y fosforila CD5”	38
2. Fosforilación de CD5 en residuos treonina: “Papel de dos residuos treonina citoplasmáticos (T410 y T412) en la señalización de CD5”	42
3. Fosforilación de CD5 en residuos tirosina: “Los residuos Y429 e Y463 de CD5 humano son dianas de tirosincinasas”	52
(ii) CD5 como activador de cinasas	62
4. Activador de tirosincinasas intracelulares: “CD5 induce la fosforilación en tirosinas de proteínas adaptadoras”	63

5. Activador de una serin/treonincinasa asociada: “La región citoplasmática de CD5 más proximal a la membrana se asocia y es sustrato de una actividad serin/treonincinasa inducible”	67
V. DISCUSIÓN	72
VI. CONCLUSIONES	84
VII. BIBLIOGRAFÍA	86
VIII. APÉNDICE	102
Agradecimientos	105

Abreviaturas

aa	aminoácido
Ag	antígeno
APC	célula presentadora de antígeno
A-SMasa	esfingomielinasa ácida
ATP	adenosín 5'-trifosfato
BCR	receptor de célula B
BSA	albúmina sérica bovina
CaMK	cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina
CKII	cinasa II de caseína
DAB	3,3'-diaminobencidina
DAG	diacilglicerol
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminoteracético
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GST	glutación-S-transferasa
GDP	guanosina 5' difosfato
HLA	antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad humano
HRP	peroxidasa de rábano
Ig	inmunoglobulinas
IL	interleuquina
ITAM	motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina
ITIM	motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina
kDa	kilodalton
mAb	anticuerpo monoclonal
MBP	proteína básica de mielina
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	tampón fosfato salino
PC	fosfatidilcolina
PLC	fosfolipasa C
PI3-K	cinasa de fosfatidilinositol-3
PKC	proteína cinasa C

PTK proteína tirosincinasa
PMA *phorbol 12-myristate 13-acetate*
PV pervanadato
SDS dodecilsulfato sódico
SH2 dominio 2 de homología con la cinasa Src
SH3 dominio 3 de homología con la cinasa Src
TCR receptor de célula T

I. INTRODUCCIÓN

1. EL RECEPTOR ANTIGÉNICO DE CÉLULA T

Los linfocitos T y B son las células responsables de las respuestas inmunitarias específicas a través de la expresión de receptores de superficie altamente especializados en el reconocimiento de antígenos. Una característica importante de estos receptores es que son clonotípicamente diferentes, por lo que cada linfocito reconoce a un antígeno distinto. En el linaje T, los linfocitos reconocen al antígeno péptido unido a una molécula altamente polimórfica codificada por MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) y expresada en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC) (macrófagos, células dendríticas y células B) [1]. Las células T se activan cuando el receptor clonotípico de célula T se une a su ligando natural péptido/MHC. No obstante, las células T también pueden ser activadas por ligandos solubles como los superantígenos bacterianos [2] o anticuerpos específicos anti-TCR [3, 4]. Uno de los aspectos más sorprendentes de la fisiología de los linfocitos T es la heterogeneidad de respuestas que puede desencadenar la activación del TCR: proliferación, anergia o apoptosis. Aunque la activación de la célula T se inicia cuando el TCR reconoce a su ligando, no todas las interacciones con el ligando, y no todos los ligandos inician la misma respuesta. Esto depende del contexto en que se esté dado la presentación antigénica, así como del estado madurativo del linfocito.

1.1 Estructura del complejo TCR

El TCR es un complejo multiproteico formado por dos grupos funcionalmente distintos de proteínas integrales de membrana. El reconocimiento del complejo péptido/MHC es realizado por una molécula heterodimérica formada por dos cadenas (α y β , y en algunas células T, γ y δ) unidas por un puente disulfuro; mientras que la transducción de señales al interior celular tras el reconocimiento es iniciado por cadenas accesorias invariables CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ y TCR ζ , unidas de forma no covalente al heterodímero (α - β ó γ - δ) [5]. Residuos aspárticos cargados negativamente en la región transmembrana de las cadenas CD3,

interaccionan con residuos lisina cargados positivamente en las cadenas heterodiméricas α - β . A pesar que la estequiometría exacta del complejo del receptor en células T no está establecida definitivamente, parece que cada heterodímero α - β se asocia en la superficie celular con un CD3 γ , un CD3 δ , dos CD3 ϵ y un homodímero TCR ζ (fig. I.1). La expresión de todas las moléculas está muy bien regulada, y es necesaria la presencia de todas ellas para que el complejo receptor llegue a la superficie de la célula, siendo la cadena ζ el factor limitante en este proceso.

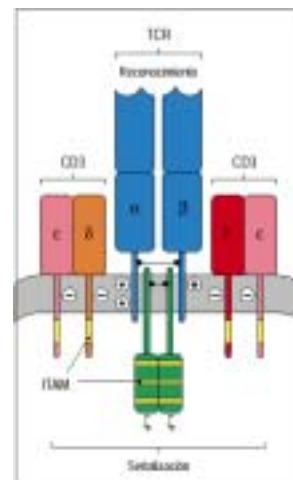


Figura I.1. El receptor de células T se compone de proteínas de reconocimiento de antígeno y de proteínas de señalización invariables (*Inmunobiología. Charles A. Janeway Jr., 2000. Ed. Masson*).

Las regiones intracelulares de las moléculas invariables asociadas al heterodímero α - β presentan residuos tirosina dispuestos en motivos consenso del tipo [Y-X-X-I/L-espacio-Y-X-X-I/L], llamados ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), e implicados en el reclutamiento de moléculas señalizadoras [6]. Las moléculas CD3 presentan un único motivo ITAM en su región citoplasmática, excepto las cadenas ζ que contienen tres (fig. I.1).

Las regiones extracelulares de las cadenas α y β constan de dos dominios inmunoglobulina, uno altamente variable y otro constante. El dominio variable se genera por el reordenamiento de los fragmentos

génicos, V+J en α , y V+D+J en β , que forman las tres regiones hipervariables ó CDRs (*Complementarity Determining Regions*) encargadas del reconocimiento específico del antígeno. El timo, donde el linfocito T inmaduro (timocito) migra tras abandonar la médula ósea, proporciona el microambiente especializado en el que tiene lugar el reordenamiento de los genes [7]. Para cada linfocito T se produce un reordenamiento diferente, generando una gran diversidad de receptores (aproximadamente, 25×10^6 TCRs) [8]. Debido a esta gran diversidad, las células T son sometidas a procesos de selección (positiva y negativa) cuando todavía se encuentran en el timo, con el fin de eliminar las células que presentan receptores que reconocen antígenos propios y aumentar la población de células que responder únicamente a péptidos antigénico foráneos [7]. La selección positiva, que es mediada por células epiteliales del timo exclusivamente, proporciona una señal de supervivencia positiva a los timocitos que presenten restricción a MHC propios. La negativa, que es mediada sobre todo por células dendríticas y macrófagos, genera una señal de apoptosis en las células autoreactivas [9-11]. Al final del proceso, sólo abandona el timo el 3% de los timocitos entrantes, mientras que el resto muere por apoptosis.

1.2 Señalización intracelular

A diferencia de los receptores tirosincinasas (RTK), el TCR no posee ninguna actividad cinasa intrínseca, pero es capaz de reclutar y activar proteínas tirosincinasas (PTK) intracelulares de las familias Src y Syk [12], necesarias para acoplar la estimulación del receptor antigénico a procesos de señalización intracelular y funciones efectores celulares. Lck y Fyn (miembros de la familia Src) son responsables de la fosforilación de los dominios ITAM de la subunidades invariantes del TCR. El primero se ha visto que está asociado a los co-receptores CD4/CD8 [13], y explicaría la rápida fosforilación de los complejos CD3 y TCR ζ tras la estimulación. Diferentes evidencias indican que Lck es esencial para la activación de la célula T: primero, la ausencia de desarrollo de la célula T en ratones deficientes para el gen Lck y, segundo, la incapacidad

de estimulación a través del TCR en células T que expresan moléculas CD4 con una mutación que imposibilita su asociación a Lck [14-16]. La fosforilación de los ITAM permite el reclutamiento de ZAP-70 (miembro de la familia Syk) a través de sus dominios SH2. Posteriormente, ZAP-70 es activado por la fosforilación vía Lck de su tirosina 493 [17-19]. Una vez ZAP-70 es activo, fosforila substratos intracelulares próximos, entre los que hay que destacar por su función señalizadora las proteínas adaptadoras LAT (*linker for activated T cells*) [20] y SLP-76 (*SH2-domain-containing leukocyte-specific phosphoprotein of 76 kDa*) [21]. LAT es una proteína integral de membrana, con una región extracelular muy corta y una larga región intracelular conteniendo múltiples residuos tirosina [20]. LAT funciona como sitio de anclaje para el reclutamiento de moléculas señalizadoras con dominios SH2 tras la estimulación del TCR. Estas proteínas incluyen PLC γ 1, p85-PI3-K, Grb2, Grap, SLP-76, Vav, Cbl [20] y una proteína homóloga a Grb2 (Gads/Grf40/GrpL) [22-24]. A través del reclutamiento de estas proteínas, LAT permite la propagación de la señal desde la membrana de la célula T a dianas inferiores a través de varias cascadas de señalización [25], entre las que se destacan (fig. 1.2): 1) PLC γ 1, una vez reclutada en la membrana plasmática, hidroliza por proximidad a su substrato fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat (PIP $_2$) generando inositol-1,4,5-trifosfato (IP $_3$) y diacilglicerol (DAG) [26, 27]. IP $_3$ se une a receptores del retículo endoplasmático para iniciar la liberación de Ca $^{2+}$ intracelular [28] que, combinado con DAG, activa la familia de serin/treonincinasas PKC [29]. La liberación de Ca $^{2+}$ está coordinada con la apertura de los canales CRAC (*calcium-release activated channels*) que permiten la entrada de Ca $^{2+}$ extracelular. El aumento de Ca $^{2+}$ intracelular favorece la formación de complejos de calcio con la proteína calmodulina (CaM). La serin/treoninfosfatasa calcineurina es activada por los complejos calcio-CaM, y defosforila el factor de transcripción NF-AT (*nuclear factor of activated T cells*) citoplasmático permitiendo su translocación al núcleo y la transcripción de IL-2 y otras citocinas [30].

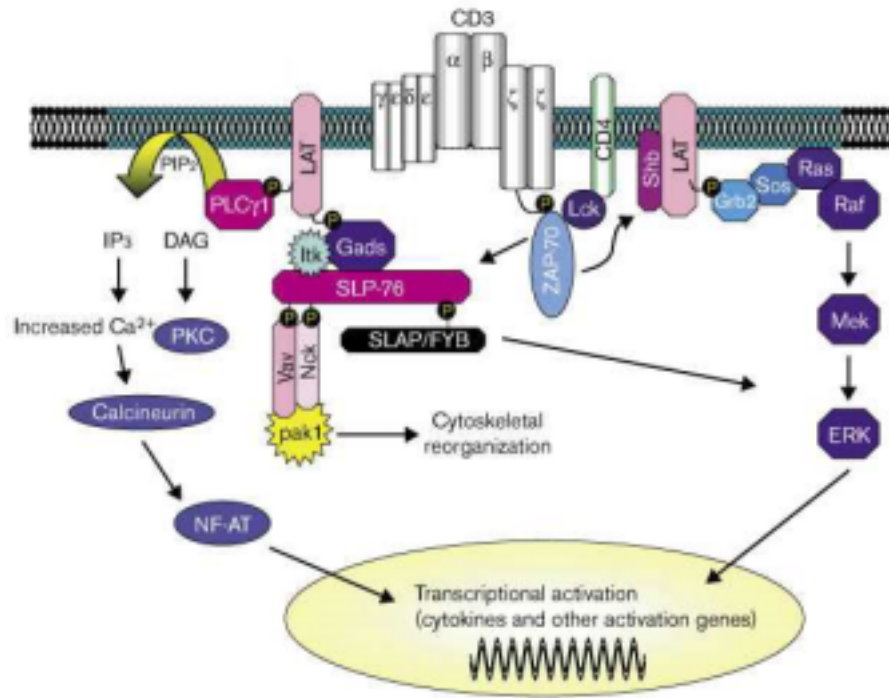


Figura I.2. Modelo para la función de LAT como promotor de la transducción del señal mediada por TCR (*Current Opinion in Immunology*, P.S. Myung, 2000,12: 256).

2) Grb2, a través de sus dominios SH3, recluta a nivel de membrana Sos, una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina (GEF), que activa por proximidad Ras, miembro de la familia de proteínas pequeñas de unión a GTP y con actividad intrínseca GTPasa (proteínas G pequeñas). Sos desplaza el GDP que inactiva a Ras y permite que se una GTP. De esta manera Ras puede activar la cascada de cinasas MAP (*mitogen-activated proteins*), donde Raf, Mek y Erk se activan uno a otro sucesivamente [31, 32]. Tras la fosforilación de Erk, éste se transloca al núcleo donde finalmente fosforila y activa el factor de transcripción E1f que inicia una nueva transcripción génica, en particular la del gen Fos [33].

3) Gads, que une constitutivamente a SLP-76, acerca éste a la membrana tras su reclutamiento por LAT [23], permitiendo que ZAP-70 lo fosfore [21]. Diversos grupos han demostrado que la fosforilación de SLP-76 induce su asociación a los dominios SH2 de Vav

(proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina de la familia Rho) y Nck. La formación del complejo trimolecular Vav/SLP-76/Nck abre la posibilidad de que SLP-76 podría integrar la activación de la GTPasa Rac con la activación de la serin/treonincinasa asociada a Nck Pak (*p21-activated kinase*) [34] y de la proteína WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*) [35]. Ambas proteínas intervienen en la reorganización de la actina y en el *capping* del TCR [36].

Existe también una cascada de señalización iniciada por TCR destinada a regular negativamente la transducción de señales. Una de las proteínas adaptadoras más estudiadas implicadas en la regulación negativa de la señalización del TCR es c-Cbl [37]. Es una proteína de 120 kDa que contiene principalmente un dominio N-terminal de unión a fosfotirosinas (una variante del dominio PTB), un dominio *ring finger*, y un dominio de unión a Grb2 rico en prolina. Tras la estimulación del

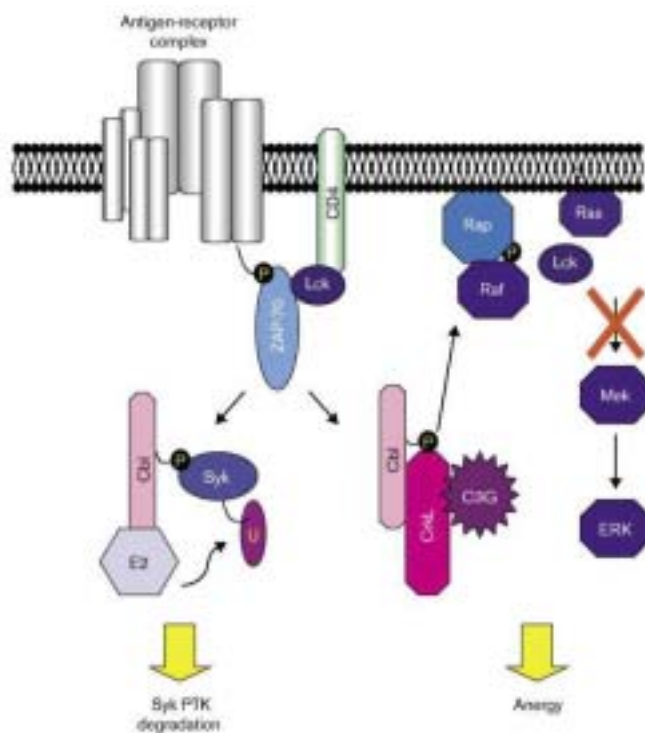


Figura I.3. Modelo de dos mecanismos por los que c-Cbl interfiere con la señalización mediada por el TCR (*Current Opinion in Immunology*, P.S. Myung, 2000, 12: 256).

TCR, c-Cbl es tirosinfosforilado por PTKs de la familia Src y Syk [38, 39], permitiendo su asociación a proteínas con dominios SH2, tales como Vav, p85-PI3K y Crk [37, 40]. C-Cbl ha sido descrito como un regulador negativo de vías de señalización de PTKs, incluidas aquellas iniciadas por receptores de factores de crecimiento, receptores de citocinas y receptores de antígeno. Se ha comprobado que en timocitos de ratones deficientes en c-Cbl existen niveles mayores de fosforilación sobre ZAP-70, LAT y SLP-76 [Murphy, 1998 #355]. Los mecanismos por los cuales c-Cbl inhibe las señales mediadas por el receptor antigénico están empezando a ser esclarecidos, y los más claros son los siguientes:

1) La proteína adaptadora CrkL se asocia, a través de sus dominios SH2, a c-Cbl tras la estimulación del TCR [41]. El dominio SH3 de CrkL se une, entonces, a una molécula adicional, C3G, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina para la GTPasa de peso pequeño, Rap1 [42]. La formación del complejo ternario

c-Cbl/CrkL/C3G se cree que posibilita la activación de Rap1, el cual impide la progresión de la cascada de Ras, secuestrando a Raf. Por lo tanto, Ras es incapaz de activar Raf, la cascada de las MAPK se bloquea, y se establece un estado de anergia [43] (fig. I.3).

2) La asociación constitutiva de del dominio SH3 de Grb2 y el dominio rico en prolina de c-Cbl, se cree que, de forma competitiva, excluye Sos de la unión a Grb2. De esta manera previene el acercamiento de Sos a la membrana para activar Ras [44].

3) Recientemente se ha propuesto un nuevo mecanismo basado en la capacidad de c-Cbl de actuar como una ligasa de ubiquitina (E3). Se ha demostrado que el dominio *ring finger* de c-Cbl puede asociar y activar la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) [45]. Por lo tanto, es posible pensar que la asociación del dominio PTB a proteínas señalizadoras tirosinfosforiladas, como ZAP-70, pueda inducir la poli-ubiquitinación de estas proteínas, y su posterior degradación (fig. I.3).

2. MOLÉCULAS ACCESORIAS EN LA ACTIVACIÓN LINFOCITARIA DE CÉLULA T

2.1 Función de las moléculas accesorias en las respuestas inmunitarias de célula T

En la superficie de los linfocitos T existen, además del receptor antigénico, otras proteínas integrales de membrana no polimórficas, denominadas moléculas accesorias, que desempeñan funciones fundamentales en la regulación de las respuestas inmunitarias frente a la presentación del antígeno. Para la mayoría de las moléculas accesorias, como CD2, CD5, CD6, CD28 y CTLA4, se ha demostrado que pueden generar señales bioquímicas intracelulares capaces de interferir o potenciar aquéllas inducidas a través del TCR. En función del contexto en que se esté dando la presentación antigénica (tipo celular, estadio madurativo,...) las moléculas accesorias pueden actuar como co-estimuladoras o inhibidoras. De esta manera se cree que estas moléculas estarían implicadas en el ajuste fino (sintonización) de las señales del receptor antigénico, tal y como se ha descrito recientemente para CD5 [46]. No obstante, el mecanismo último por el que conduce a la co-estimulación o a la inhibición no está todavía claro.

La molécula co-estimuladora más caracterizada es CD28 [47], que se une a moléculas B7 (B7.1 y B7.2) expresadas en las células APCs. La estimulación de CD28 es crítica para que las células T *naïve* (linfocitos T que todavía no han encontrado su ligando específico) proliferen y se diferencien a células efectoras. Este fenómeno ha sido interpretado como “el modelo de dos señales” y propone que la activación de la célula T *naïve* requiere una primera señal generada por el receptor antigénico tras interactuar con el complejo antígeno/MHC, y una segunda señal proporcionada por moléculas accesorias co-estimuladoras, como CD28, al contactar con su ligando anclado en la superficie de la misma células presentadora de antígeno (APC) [48]. En el caso de CD28, la función más importante de la señal co-estimuladora inducida es promover la síntesis de IL-2, que es esencial para inducir el crecimiento de las células T de una forma autocrina.

La mayoría de las moléculas de membrana, como CTLA4, que contrarrestan las señales de activación liberadas a través de los receptores de antígeno, presentan en su cola citoplasmática un motivo denominado ITIM (motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina). Este motivo recluta la fosfatasa de tirosina SHP-1 o la fosfatasa de inositol SHIP, revertiendo la señalización mediada por el receptor antigénico.

Dentro del grupo de moléculas accesorias también se incluyen las moléculas co-receptoras CD4 y CD8 que cooperan con el receptor T en el reconocimiento de antígeno. CD4 y CD8 se unen a las zonas invariantes de las moléculas MHC, facilitando el reconocimiento antigénico por el TCR [49]. Además, estos co-receptores son críticos para el inicio de la señalización mediada por TCR. La agregación del co-receptor con el receptor de antígeno estimula la activación de la célula T acercando la tirosinasa Lck, asociada a la región citoplasmática del co-receptor [13], junto con los motivos ITAM citoplasmáticos de las moléculas CD3 del complejo receptor de células T.

La mayoría de las moléculas accesorias se unen a ligandos anclados en la superficie de otras células, como células APC, e incrementan la fuerza de adhesión entre la célula T y la APC en el momento del reconocimiento. Esta propiedad ayuda a asegurar que el contacto entre las células T y APC sea lo suficientemente estable como para proporcionar el tiempo necesario al receptor TCR para probar gran número de moléculas MHC en la superficie de la APC en busca del antígeno específico y, en el caso poco frecuente que lo encuentre, permitir la activación de la célula T. Esta función es atribuida sobre todo a las moléculas de adhesión como CD2 (contrarreceptor de LFA-3), LFA-1 (contrarreceptor de ICAM-1,2,3) e ICAM-1,2,3 (contrarreceptor de LFA-1). Otras moléculas accesorias pueden unirse también a componentes de la matriz extracelular o a moléculas expresadas en el endotelio vascular, como las L-selectinas (contrarreceptor de CD34), por lo que podría ser importante para el *homing* y la retención de los linfocitos

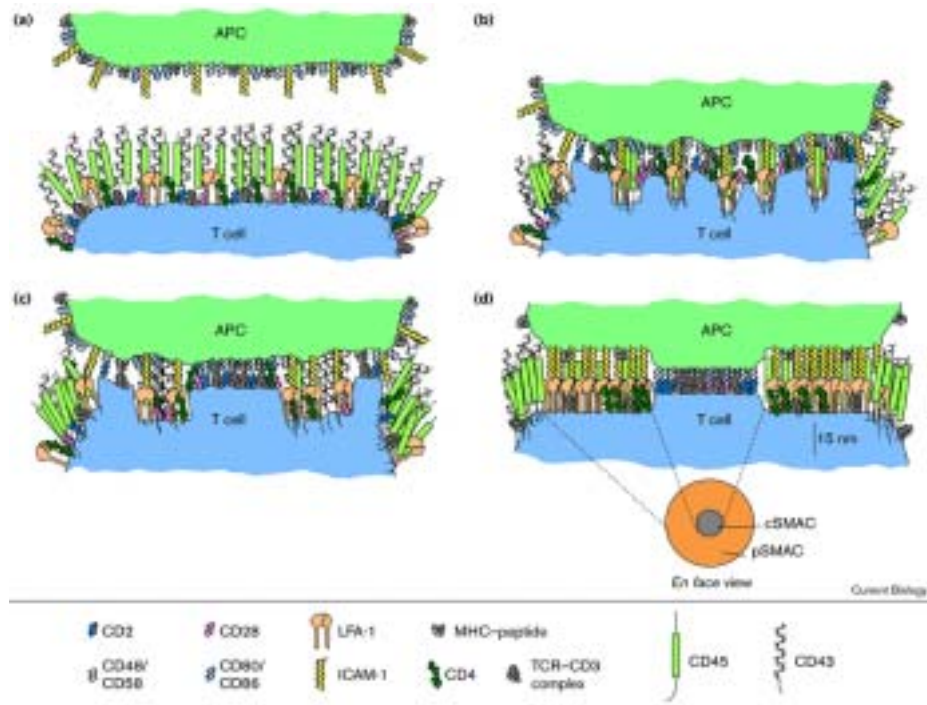


Figura I.4 Sección de la sinapsis inmunológica, presentando la distribución de diferentes proteínas integrales de membrana en 4 etapas temporales distintas. **(a)** Antes del contacto la distribución de las moléculas es homogénea. **(b)** La señalización inicial del TCR ocurre en segundos tras el contacto y se caracteriza por la aparición de clusters de proteínas. **(c)** La activa reorganización a través de movimientos dirigidos por el citoesqueleto lleva a la formación de un inicial SMAC central (cSMAC), el cual requiere minutos para su desarrollo. **(d)** La sinapsis madura con el SMAC periférico (pSMAC) y el cSMAC se observa tras 30 min del contacto célula T-APC (*Current Biology, J. Delon, 2000, 10: R923*).

en sitios periféricos de exposición al antígeno e inflamación.

2.2 Distribución de las moléculas accesorias durante la activación linfocitaria T

El reconocimiento antigénico se acompaña de una rápida polarización de la célula T con respecto la célula presentadora de antígeno [50] y de una marcada redistribución del TCR y las moléculas accesorias en "clusters supramoleculares de activación" (SMACs, *supramolecular activation clusters*) [51], formando una zona de contacto intercelular muy organizado conocido como "sinapsis inmunológica" (fig.1.4) [52]. Experimentos recientes utilizando inmunofluorescencia tri-dimensional, para visualizar las áreas de contacto, indican que los SMACs están organizados en dominios espaciales

distintos: la zona central contiene el TCR, CD3 y las moléculas señalizadoras PKC- θ , Lck y Fyn, mientras que la zona periférica es rica en moléculas de adhesión LFA-1 y proteínas del citoesqueleto como talin [51] (fig. 1.4).

Basándose en el tamaño de las moléculas y sus interacciones, se ha propuesto que los co-receptores CD4 y CD8, las moléculas co-estimuladoras como CD28 y las moléculas de adhesión pequeñas como CD2 contribuyen a formar zonas de contacto íntimo, donde se situarían los complejos TCR/péptido-MHC (~15nm) y donde serían excluidos moléculas de mayor tamaño como las tirosinfosfatasas CD45 y CD148, y las moléculas de adhesión CD43, LFA-1 y ICAM-1 (~28-50 nm) (fig. 1.5) [53, 54].

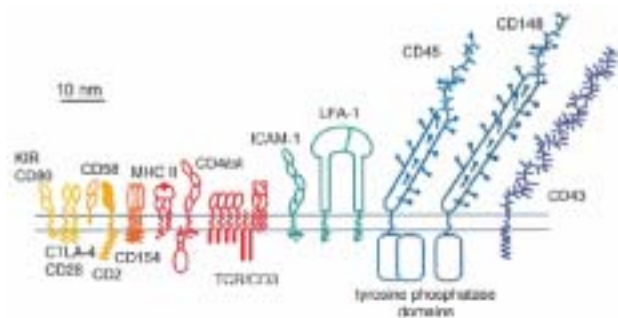


Figura I.5. Dimensiones de las moléculas implicadas en el reconocimiento antigénico de célula T. Los tamaños han sido estimados a partir de estudios de estas moléculas con la excepción de CD148 (*Seminars in Immunology, PA van der Merwe, 2000, 12: 5*).

Esta redistribución molecular tan precisa estabilizaría la interacción del TCR con el complejo péptido-MHC en la zona de contacto y resolvería los problemas de la baja afinidad del TCR por su ligando, del reducido número de copias de moléculas MHC expresados en la superficie

de las APCs y del pequeño tamaño del dominio extracelular del TCR [54]. Esta redistribución molecular podría contribuir a la formación de un entorno único que promovería una óptima señalización del TCR a través de la inclusión y el reclutamiento de moléculas señalizadoras, y la exclusión de reguladores negativos potenciales como las tirosinfosfatasa CD45 y CD148 [54].

En la formación de la sinapsis inmunológica participan de forma activa los *rafts* lipídicos y el citoesqueleto de actina. La membrana plasmática de la mayoría de las células, incluidas las células T, contiene microdominios que están enriquecidos en glicoesfingolípidos y colesterol [55]. Los glicoesfingolípidos se asocian por sus largas cadenas aciladas formando agrupaciones muy compactas estabilizadas por los puentes de hidrógeno que se producen entre sus cabezas azucaradas. El colesterol se intercala entre las cadenas hidrocarbonadas donde provoca una disminución de su

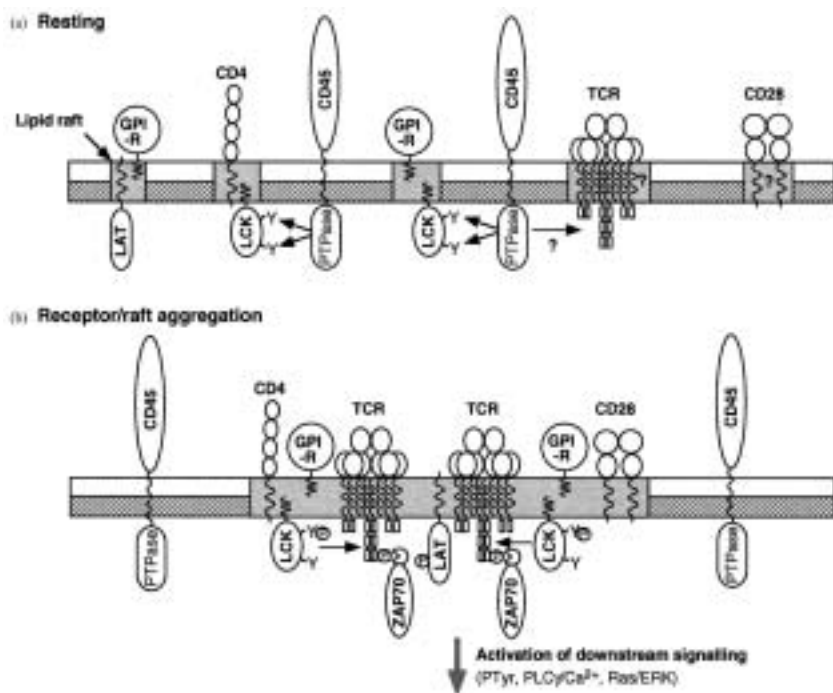


Figura I.6. Modelo para la activación de la célula T a través de la agregación de los rafts lipídicos. (a) La célula T no estimulada contiene pequeños y dinámicos *rafts*, cada uno con un número limitado de moléculas asociadas, probablemente incluyendo TCR y CD28. (b) La ligación de los TCRs por una APC provoca la agregación de los *rafts* y de moléculas señalizadoras asociadas, mientras que CD45 es excluido. Esto promueve la activación de Lck, el reclutamiento de ZAP-70 y la consiguiente fosforilación en tirosinas (*Seminars in Immunology, P.W. Janes, 2000, 12: 23*).

flexibilidad y de esta forma compacta la bicapa lipídica [56]. Este empaquetamiento lateral de los glicoesfingolípidos y el colesterol conduce a la formación de dominios dispersos dentro de la bicapa de las membranas, denominados balsas o *rafts*. Diversas moléculas importantes en la señalización del TCR, como las PTKs Lck y Fyn, la proteína adaptadora LAT, y los co-receptores CD8 y CD4, residen constitutivamente en dominios de membrana enriquecidos en glicoesfingolípidos y colesterol [20, 57-59]; mientras que, moléculas excluidas de la zona de contacto célula T-APC, como CD45, nunca se encuentran en estas estructuras membranales (fig. 1.6) [57, 60]. Por lo tanto, es en estos dominios de membrana dónde el complejo transductor de señales TCR/CD3 es ensamblado y desde dónde se produce la señalización hacia el interior celular. Así, se ha visto que pocos minutos después de la estimulación las formas más activas de TCR ζ (p23; ITAMs bifosforilados) pasan a co-localizar con marcadores de *rafts* [58]. Así mismo, la alteración de la localización de Lck i LAT, mediante la eliminación de sus anclajes acilados, inhibe la transmisión de la señal estimuladora desencadenada por el TCR [20, 61]. Esto sugiere que los *rafts* podrían constituir centros activos de señalización y que podrían contribuir a la redistribución molecular en la sinapsis inmunológica a través de su agregación [62]. No obstante, un papel de los *rafts* en la estimulación fisiológica de las células T por las APCs todavía no se ha demostrado.

Diversas líneas de evidencia implican también al citoesqueleto de actina en la redistribución de las moléculas de superficie en la zona de contacto célula T/APC. Primero, el tratamiento de las células T con inhibidores del citoesqueleto anula la redistribución de ICAM-1 y otras moléculas hacia la zona de contacto [63, 64]. Segundo, un gran número de moléculas de la superficie celular que migran hacia o desde la interfase se han visto asociadas directamente con el citoesqueleto o, indirectamente, a través de moléculas que sí están asociadas a citoesqueleto. Este es el caso de CD2 que interacciona con el citoesqueleto a través de la proteína recientemente identificada CD2AP [65].

3. EL RECEPTOR LINFOCITARIO CD5 HUMANO

CD5 es una molécula accesoria implicada en la modulación de los procesos de activación y diferenciación en las células T y B [66]. La molécula CD5, también conocida como T1, Leu-1 o Tp67 en humanos, y Ly-1 en ratón, es una glicoproteína monomérica tipo I, de 67 kDa, expresada en la superficie de los linfocitos T y en una subpoblación de linfocitos B. Existe también una forma soluble en suero de 52 kDa, que se genera por escisión proteolítica tras la activación linfocitaria [67]. El antígeno CD5 se definió durante el primer estudio colaborativo internacional sobre antígenos de diferenciación leucocitaria ("*First International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens*", 1982). Como otras moléculas accesorias, CD5 se descubrió mediante la obtención de anticuerpos monoclonales contra células mononucleares de sangre periférica, y nuestro laboratorio contribuyó con el Cris-1 mAb (33-1C6) producido por el Dr. R. Vilella.

3.1 Expresión

CD5 se definió con aloantisueros producidos en cepas de ratones híbridos. Cuando fueron depleccionados los linfocitos portadores de Ly-1 con estos antisueros, se pensó que el antígeno CD5 era un marcador de superficie de los linfocitos T cooperadores [68]. Posteriormente, los mAbs y la citometría de flujo demostraron que CD5 está presente en todos los linfocitos T [69, 70]. Simultáneamente, se detectó CD5 en algunos tumores de células B, tanto en ratones [71] como en humanos [72, 73]. Poco después se observó que CD5 también se expresaba en un subgrupo de linfocitos B maduros (llamado B1-a) en ratones [74] y en humanos [75]. Las células B1-a, que representan un 5-10% de los linfocitos B de sangre periférica, son conocidos por secretar anticuerpos IgM que reconocen gran variedad de autoantígenos y se encuentran expandidas en leucemias linfáticas crónicas de célula B [72, 73] y en diversas enfermedades autoinmunes, como artritis reumatoide [76], síndrome de Sjögren [77], tiroiditis autoinmune [78], diabetes mellitus [79, 80], etc.

Los linfocitos T circulantes poseen los niveles de expresión constitutiva más altos de CD5 [68]. En los timocitos la expresión de CD5 empieza en estadios muy tempranos y va aumentando a medida que maduran, de forma paralela al aumento de expresión del complejo TCR [81]. La expresión superficial de CD5 está regulada por la intensidad de la señal vía TCR y por la avidez de la interacción TCR/ligando durante la selección [81]. Interacciones de avidez relativamente altas en la selección positiva resultan en una alta expresión de CD5 en timocitos, mientras que interacciones más bajas inducen menos expresión [81]. Su expresión es susceptible de sufrir regulaciones positivas y negativas también en respuesta a situaciones experimentales y/o patológicas [82-85]. La estimulación linfocitaria con ésteres de forbol (potentes activadores de PKC), con anti-IgM o con anti-TCR hace aumentar los niveles de CD5 superficiales [80, 82]. Curiosamente, al igual que otras moléculas co-estimuladoras (CD28 y CD6), se encuentran niveles reducidos de CD5 en pacientes con infecciones agudas por virus herpes [86]. Los mecanismos de regulación transcripcional de CD5 son todavía mal conocidos. La comparación de las secuencias del promotor de CD5 humano y murino revela sitios de unión a factores de transcripción muy

conservados [87, 88]. Recientemente, se ha demostrado que una región de 43 pb (-172 hasta -215 bp) por encima del codón de iniciación regula la expresión de CD5 murino por asociación al factor de transcripción Ets-1 [89]. También en ratones se ha descrito una región enhancer con secuencias de unión a NFAT responsable del aumento de expresión de CD5 en células B estimuladas vía BCR [90].

3.2 Estructura proteica

3.2.1 Región extracelular. El aislamiento del cDNA murino [91] y humano [92] que codifican para el antígeno CD5 ha permitido clasificar la molécula dentro del grupo B de la superfamilia de receptores con dominios extracelulares ricos en cisteínas tipo *scavenger* (SRCR) [93, 94]. Este grupo se caracterizan por la presencia de dominios SRCR, de unos 110 aa, codificados por un único exón y conteniendo 8 residuos cisteína (C) muy conservados unidos por puentes disulfuro en un patrón C1-C4, C2-C7, C3-C8 y C5-C6 [94, 95]. La región extracelular de CD5 es de 350 aminoácidos y consiste en tres dominios globulares SRCR (D1, D2 y D3) (fig. 1.7). Mientras que D1 y D3 cumplen perfectamente el consenso aceptado para

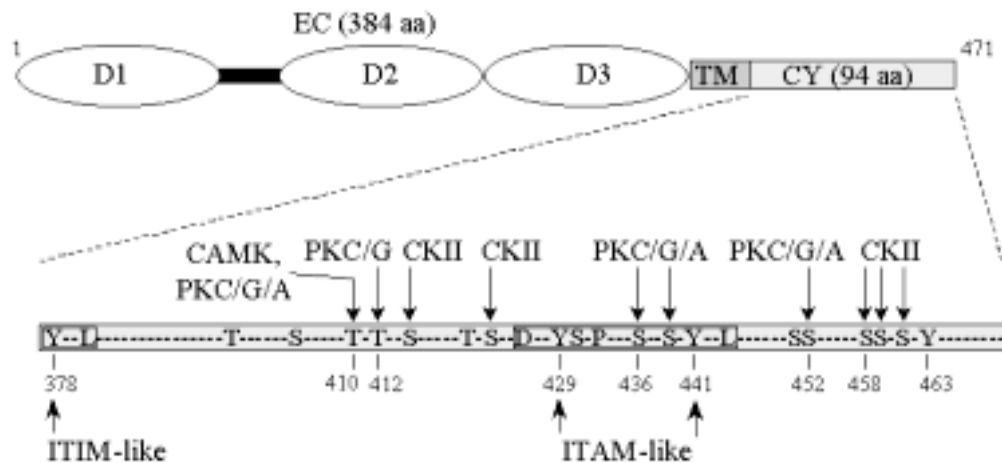


Figura 1.7. Representación esquemática de la molécula de CD5 y de su región citoplasmática. La posición de los sitios consenso de CKII, PKC, PKG, PKA y CaMK se indican con una flecha. Los motivos ITAM-like y ITIM-like están enmarcados. EC, extracelular; TM, transmembrana; CY, citoplasmático. Los números se refieren a la posición aminoacídica en la proteína madura.

dominios SRCR del grupo B, D2 sólo presenta 6 cisteínas (como los miembros del grupo A), pero incluye el puente disulfuro C1-C4 (característico del grupo B). Por lo tanto, D2 debe considerarse como un subtipo especial y único en los dominios del grupo B [95]. La región extracelular de CD5 se ha propuesto que está dispuesta de forma extendida y rígida, dada la presencia de una región rica en prolinas y treoninas, entre los dominios D1 y D2 que impedirían su doblamiento [96]. En los dominios D1 y D2 están presentes sitios de glicosilación en -N, pero no en D3 [96, 97]. D1 es el dominio más inmunogénico y el menos conservado entre los mamíferos (aproximadamente, 25% de homología para D1, 37% para D2 y 44% para D3) [97]. De hecho, se ha descrito la existencia de un polimorfismo bi-alélico en la región extracelular de CD5 de muchas especies diferentes de mamíferos [98, 99]. No obstante, no se han demostrado evidencias de un polimorfismo de CD5 en humanos [67, 100], aves y anfíbios [Calvo, 1999 #46].

3.2.2 Región intracelular. La región intracelular de CD5 está formada por una zona transmembrana de 27 aa y una relativamente larga cola citoplasmática muy bien conservada (78% de homología entre diversas especies de mamíferos) de 94 aa con 11 serinas, 4 treoninas y 4 tirosinas [91, 92]. La región citoplasmática no contiene ninguna actividad catalítica intrínseca, pero en cambio presenta diversos motivos potenciales de fosforilación para serin/treonin y tirosincinasas, y otros motivos estructurales compatibles con una función señalizadora intracelular [91, 92] (fig. I.7). Las tirosinas Y429 y Y441 están integradas en un motivo [E-X₇-D-X₂-Y⁴²⁹-X₂-P-X₈-Y⁴⁴¹-X₂-L] (ITAM-like) muy similar a los ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) de las moléculas señalizadoras como las del complejo receptor antigénico CD3 y TCR ζ [D/E-X₇-D/E-X₂-Y-X₂-L-X₆₋₈-Y-X₂-L] [101]. La tirosina 378 está también integrada en una secuencia [LAY³⁷⁸KKL] (ITIM-like) que recuerda al motivo de inhibición ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) de algunos inmunoreceptores [S/L/I/V-X-Y-X₂-L/I] [102]. Por otro lado, hay 5 serinas (S415, S423, S458, S459 y S461) que están incluidas

en secuencias que cumplen el consenso de fosforilación de CKII (*caseine kinase II*) [S/T-X₂-D/E y S-X₂-S(p)] [103, 104] y otras 3 (S436, S438 y S452) que están incluidas en secuencias que cumplen el motivo de fosforilación de PKC, PKG y PKA (*protein kinase C, G y A*) [R-X-S]. Finalmente, la treonina T410 está inmersa en un motivo de fosforilación compartido por las cinasas CaMK (*Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase*), PKC, PKG y PKA [R-X₂-S/T], y la T412 en otro compartido por PKC y PKG [S/T-X-R/K] [105]. La región citoplasmática de CD5 se encuentra constitutivamente fosforilada por CKII en las serinas carboxiterminales S458, S459 y S461 [106-108] y es rápidamente hiperfosforilada en residuos serina, treonina y/o tirosina tras la activación linfocitaria inducida por agentes tales como PMA [109, 110] anti-CD3 [111-113], o anti-CD5 mAbs [111].

3.3 Estructura génica

El gen CD5 humano se localiza en el brazo largo del cromosoma 11, en la región q13 [114, 115], mientras que el murino lo hace en la región ortóloga del cromosoma 19 [116, 117]. El gen CD5 humano abarca 24,5 kb y está formado por 11 exones conservados en tamaño, número y estructura con su homólogo murino [118] (fig. I.8). Se encuentra situado muy próximo al gen CD6 (82 kb en dirección 3'), en una orientación cola con cabeza idéntica a la encontrada en ratón. Dada la alta similitud estructural y funcional entre ambos genes se cree que CD5 y CD6 surgieron por duplicación de un gen ancestral común [116].

Existe una buena correlación entre la organización exónica/intrónica y los dominios estructurales de la proteína de CD5. Los 3 dominios extracelulares SRCR de CD5 están codificados por un exón cada uno (exones 3, 5 y 6) como es típico del grupo B de la familia SRCR. La región rica en prolinas y treoninas, que conecta los dominios D1 y D2, está codificada por el exón 4. El dominio transmembrana está codificado por el exón 7, y la cola citoplasmática por los exones del 8 al 10 [118] (fig. 9). El péptido señal consta de 24 aa, codificados por los exones 1 (18 aa) y 2 (6 aa). El exón 1 contiene la región 5'-UTR (región no traducida), y los exones 10 y 11 contienen el codón *stop* y la región 3'-UTR [118].

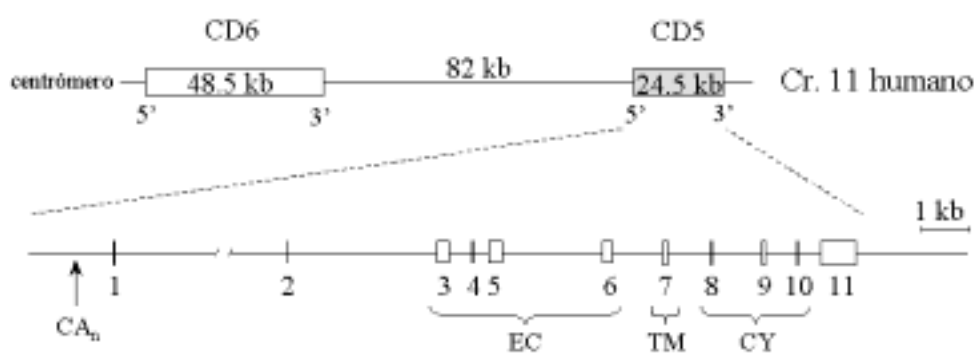


Figura I.8. Situación cromosómica y organización exónica/intrónica del gen de CD5 humano. La posición relativa del microstélite (CA_n) se indica con una flecha. EC, extracelular; TM, transmembrana; CY, citoplasmático.

Existen dos señales de poliadenilación en el exón 11 que podrían explicar la identificación de dos especies de mRNA de CD5 (2,7 kb y 3,6 kb) [92]. Mientras que para CD6 se han descrito diversas isoformas por splicing alternativo, CD5 presenta una única isoforma que codifica para una proteína sin cola citoplasmática [118]. En las regiones 5' flanqueante ortólogas del gen humano y murino de CD5 se ha descrito la existencia de un microsatélite (CA_n) [119] (fig. I.8).

3.4 Ligando(s)

Todavía no se conoce con certeza el(los) ligando(s) de CD5. Se ha descrito que CD5 es el contrarreceptor de varias moléculas expresadas en la superficie de células B (CD72, gp40-80, secuencias en el armazón de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Ig V_H), y p200-CD5L), aunque las evidencias no son del todo concluyentes [66]. El primer ligando identificado fue CD72, una glicoproteína tipo II de 42 kDa que se expresa en todas las células de linaje linfóide B [120, 121]. Actualmente parece haber consenso en que no es un buen candidato, hasta el punto que el mismo grupo que reportó los resultados iniciales ha descrito recientemente que CD72 es en realidad el ligando de CD100 [122]. Posteriormente se reportó que gp40-80, una molécula murina expresada transitoriamente en clones de células T y B activadas por antígeno [98, 100] también era un posible ligando de CD5. No obstante, no han habido más evidencias en

este sentido, así como tampoco de la existencia de una molécula humana con propiedades equivalentes. La interacción de CD5 con secuencias en el armazón de la región variable de las inmunoglobulinas de superficie (Ig V_H) ha sido descrita en humanos [123] y en conejos, donde la mayoría de las células B utilizan un único gen V_H1 para codificar el BCR [99]. No obstante, los dos trabajos procedan de un único grupo haciendo necesaria su validación por otros. Lo mismo sucede con otro ligando recientemente descrito en bóvidos, denominado p200-CD5L, que se expresa en células B activadas [124]. Todas estas interacciones implicarían a CD5 en fenómenos de cooperación celular T-B o B-B, pero no explicarían otros aspectos conocidos de la función de CD5 en células T, como son la maduración de timocitos y la activación de las células T. Recientemente nuestro grupo ha descrito un ligando alternativo llamado gp 150 con una expresión más amplia [125]. Éste se encuentra expresado en monocitos, linfocitos y en varias líneas celulares de origen linfóide (T y B), mielomonocítico y epitelial (incluido epitelio tímico) [125]. Esta interacción recuerda la interacción de CD6 con la molécula de adhesión ALCAM [126]. La interacción de CD5 con gp150 sugiere un papel de CD5 en interacciones celulares T-APC, en la activación de las células T y en la diferenciación tímica.

3.5 Función

Aunque CD5 fue uno de los primeros antígenos linfocitarios de diferenciación descritos, sólo ahora empieza a entenderse su función precisa. La relevancia de CD5 en la función linfocitaria es indudable y ha sido descrita por estudios clínicos-patológicos y experimentales. Así, se ha visto que la utilización de anticuerpos anti-CD5 en modelos de animales es beneficioso como terapia contra algunas enfermedades autoinmunes [127, 128] y en trasplante [129]. Trabajos recientes con animales transgénicos sugieren que CD5 interviene en el ajuste fino de las señales mediadas por TCR [46]. Concretamente estos estudios sugieren que la regulación de la expresión superficial de CD5 durante los procesos de selección en timocitos [81] funciona para ajustar finamente la señalización del TCR, permitiendo la optimización del repertorio de los TCRs expresados en células T maduras [46]. Actualmente se considera que CD5 es un molécula accesoria “dual”, capaz de modular positiva o negativamente las señales de activación y diferenciación mediadas por los receptores específicos de antígeno TCR y BCR [66], a los cuales CD5 se encuentra asociado físicamente [130-132].

Curiosamente, el ligamiento de CD5 genera señales moduladoras distintas dependiendo del tipo celular y de su estado madurativo. Se ha demostrado que induce señales positivas en células T maduras, y negativas en timocitos y células B1-a, probablemente influenciando los procesos de selección y maduración en estas células.

En células T periféricas, CD5 actúa como una molécula co-estimuladora, potenciando las respuestas proliferativas mediadas por el receptor antigénico TCR [133, 134]. Incluso en ausencia de estimulación vía TCR, anticuerpos contra CD5 son mitogénicos en estas células en presencia de monocitos [135, 136], dosis subóptimas de ésteres de forbol [137] y anticuerpos anti-CD28 [138]. Recientemente, se ha sugerido que la co-estimulación de CD5 se debe a su habilidad en incrementar la asociación del TCR a los *rafts* lipídicos [139].

Por el contrario, estudios en ratones *knock-out* para CD5 demuestran que timocitos CD5^{-/-} son hiperreactivos a la estimulación vía TCR, manifestando niveles aumentados de proliferación celular, altas concentraciones de Ca²⁺ intracelular y hiper-fosforilación de moléculas señalizadoras como PLC- γ 1, TCR ζ , LAT y Vav [140]. Igualmente, en células B1-a CD5^{-/-}, el entrecruzamiento de IgM de membrana (BCR) también induce una mayor movilización de Ca²⁺, resistencia a la apoptosis y entrada al ciclo celular [141]. El hecho que la regulación negativa no ocurre en ausencia de la región citoplasmática de CD5 [142] sugiere que este efecto sea dependiente de interacciones intracelulares mediadas por moléculas señalizadoras efectoras.

3.6 Señalización intracelular

Existen numerosos estudios a cerca de los mecanismos de señalización de CD5, pero las bases moleculares que confieren a CD5 la habilidad para modular las señales del TCR y BCR están sólo empezando a ser esclarecidas. A continuación se comentarán los aspectos más relevantes de la señalización de CD5:

3.6.1 Señalización estimuladora mediada por PTKs.

La presencia en la región citoplasmática de CD5 de un motivo basado en tirosinas similar a los ITAMs de los inmunoreceptores CD3 y TCR ζ es de especial interés por ser un sitio susceptible de fosforilación por Src-PTKs y de convertirse en un motivo de anclaje para moléculas señalizadoras con dominios SH2. De acuerdo con esto, se ha comprobado que CD5 está asociado físicamente a los complejos receptores de antígeno (TCR y BCR) [130-132] y es un sustrato temprano de PTKs tras la activación de la célula T y B [112, 113, 132]. Además, se ha visto que el patrón de sustratos celulares tirosinfosforilados es muy similar entre linfocitos estimulados vía TCR/CD3 y vía CD5 [112, 113]. Diversos estudios han demostrado la asociación de CD5 tirosinfosforilado a Lck [143, 144], ZAP-70 [145], p21-TCR ζ (moléculas TCR ζ con sus ITAMs monofosforilados) [145], p85 α -PI3-K [143, 146], y ras GAP (proteína activadora de la GTPase ras) [147] y c-

Cbl [147]. No obstante, y a diferencia de los inmunoreceptores CD3 y TCR ζ , la asociación de ZAP-70 a CD5 no se da directamente a través de los dominios SH2 de la cinasa, sino por interacción con moléculas p21-TCR ζ asociadas a CD5 [145]. Por lo tanto, la secuencia citoplasmática de CD5 basada en tirosinas no actuaría como un ITAM clásico. De todas maneras, estudios de asociación en timocitos estimulados con pervanadato e *in vitro*, utilizando péptidos de CD5 fosforilados en tirosinas, han demostrado que Lck, rasGAP y p85 α -PI3-K podrían asociarse a CD5 a través de sus dominios SH2, posiblemente a nivel de las tirosinas fosforiladas en la secuencia ITAM-like [143, 147].

3.6.2 Señalización negativa por reclutamiento de proteínas citoplasmáticas. Diversas observaciones señalan que CD5 podría regular negativamente la señalización del receptor antigénico reclutando tirosinfosfatasa citoplasmáticas, de una manera análoga a como lo hace CD22 [148]. Primero, CD5 co-inmunoprecipita moléculas TCR ζ de peso p21 (ITAMs monofosforilados) y no de p23 (ITAMs bifosforilados) en timocitos estimulados con pervanadato [145]. Segundo, en ratones CD5^{-/-}, la estimulación del TCR incrementa los niveles de tirosinfosforilación de varias proteínas intracelulares (Vav, ZAP-70, PLC- γ 1, TCR ζ) [140], de una forma similar al fenotipo de ratones *motheaten* (*me*) y *motheaten viable* (*mev*), los cuales han perdido la actividad catalítica de la proteína tirosinfosfatasa SHP-1 [149]. De acuerdo con estos datos, recientemente diversos trabajos han demostrado la asociación de la proteína tirosinfosfatasa SHP-1 con CD5 en timocitos murinos [150], células B1-a murinas [151], células Jurkat humanas [152] y linfoblastos T estimulados con fitohemaglutinina [152]. Concretamente, el motivo ITAM-like de CD5 a nivel de la tirosina Y378 ha sido identificado como responsable de la asociación CD5/SHIP-1 [152]. No obstante, la evidencia que Y378 medie en la acción inhibitoria de CD5 por SHIP-1 es contradicha por estudios recientes. Primero, se ha demostrado que la hipersensibilidad a la estimulación

vía TCR en hibridomas T CD5^{-/-} puede ser eliminada haciendo expresar CD5 nuevamente, pero no una forma truncada de CD5 sin cola citoplasmática, pero que conserva la tirosina Y378 [142]. Segundo, se ha visto que las tirosinas en el motivo ITAM-like de CD5 son necesarias para la inhibición de la señalización del BCR por CD5, mientras que Y378 es totalmente prescindible [153].

Otra molécula señalizadora asociada a CD5 es la proteína adaptadora c-Cbl [147], que se ha implicado en la regulación negativa de la señalización del TCR (ver apartado anterior 1.2). Timocitos de ratones c-Cbl^{-/-} presentan una mayor tirosinfosforilación de las proteínas ZAP-70, LAT y SLP-76, y una mayor actividad de la cinasa MAPK tras la estimulación vía TCR [154, 155]. Se ha demostrado también que c-Cbl se asocia e inhibe las PTKs Syk y ZAP-70 [40, 156]. Además, recientemente c-Cbl ha sido identificada como proteína ligasa de ubiquitina [45], implicada en la ubiquitinación de la molécula TCR ζ [157] y de otras proteínas tirosinfosforiladas, destinándolas así a su degradación en el proteosoma o lisosoma [158, 159]. De hecho se ha descrito que ratones Cbl^{-/-} tienen niveles aumentados de CD3, CD5, CD28 y CD69 [155]. Por lo tanto, el reclutamiento de c-Cbl podría contribuir a la supresión de la señalización del TCR y BCR mediada por CD5.

Recientemente, se ha demostrado la asociación a la región citoplasmática de CD5 más proximal a la membrana de la serin/treonincinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina CaMK II δ [160]. Esta asociación está presumiblemente mediada por la secuencia de CD5 [R-X-W-X₄-G-X₂-Q-N-X₂-F-H-R-X₄-T-V] que mimetiza el motivo de multimerización de la cinasa con ella misma [160]. Tras la agregación del receptor antigénico, CaMKII se activa y fosforila diferentes sustratos como Ets-1 [161], CD20 [162], CREB [163] y Lck [164]. Una consecuencia funcional de la activación de CaMKII es la regulación negativa de la transcripción del gen IL-2 en células T y B [165, 166]. Por lo tanto, la asociación de CaMKII a CD5 podría mediar en la regulación negativa de la señalización del receptor antigénico [161].

3.6.3 Señalización mediada por segundos mensajeros lipídicos. Al principio se creía que CD5 no poseía una vía de señalización propia, puesto que la ligación de CD5 en células periférica T potenciaba las respuestas típicamente mediadas por el receptor antigénico TCR, como el incremento de la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), la secreción de IL-2 y la expresión del receptor para IL-2 (IL-2R) [133, 134, 167, 168]. No obstante, esta idea ha cambiado en los últimos años, y hoy ya se acepta que CD5 es una molécula señalizadora *per se*, aunque dependiente de la expresión del complejo TCR/CD3 [169]. La clave está en que algunos mAbs anti-CD5 son mitogénicos y activan PKC en ausencia de movilización de $[Ca^{2+}]_i$ y de *turnover* de fosfatidilinositol [136]. Recientemente, se ha demostrado que anticuerpos anti-CD5 pueden inducir la activación de PKC por un mecanismo distinto del usado por CD3 (activación de $PCL\gamma 1$) y similar al de otros receptores linfocitarios (CD28, TNFR, IL-4R, etc.). Dicho mecanismo consiste en la generación de DAG y ceramida a través de la activación secuencial de PC-PLC y esfingomielinasa ácida (A-SMasa) [169, 170] (fig.

I.9). La integridad de las serinas carboxiterminales de CD5 responsables de su fosforilación constitutiva se ha demostrado que es crítica para la activación de PC-PLC [169]. DAG generado por PC-PLC vía CD5 se ha implicado en la activación de A-SMasa, que hidroliza la esfingomielina generando ceramida y fosfatidilcolina [170] (fig. I.9). Curiosamente, la ceramida es un mediador importante en diferentes procesos celulares, abarcando desde la proliferación y diferenciación celular hasta la parada celular y apoptosis [171]; por lo que podría ser relevante para las propiedades modulatorias de CD5.

La ceramida generada puede contribuir a la activación de PKC- ζ [172, 173], que es una isoforma atípica de PKC. Consistente con esta posibilidad, la activación de PKC- ζ por CD5 ha sido recientemente reportada [170] (fig. I.10). No obstante, esta activación no es dependiente de ceramida [170] y posiblemente tenga lugar con otros activadores diferentes. Dada la bifuncional modulación de PKC- ζ por segundos mensajeros lipídicos [173-177], se sugiere que esta cinasa actúe como un interruptor molecular entre señales mitogénicas y apoptóticas [173].

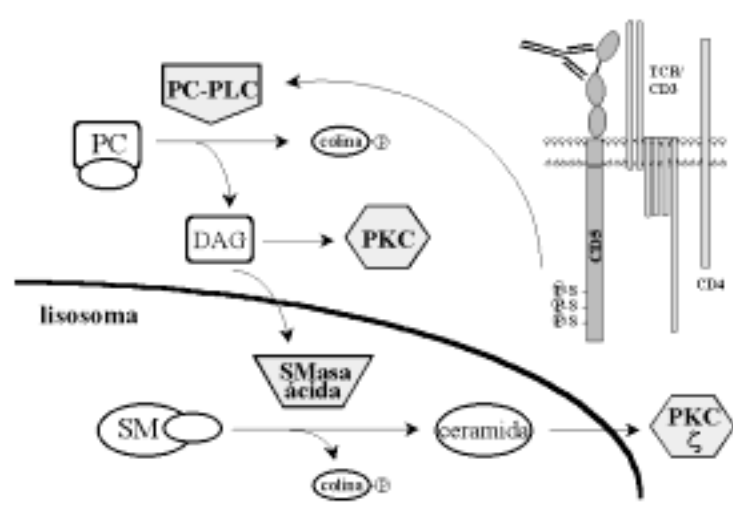


Figura I.9. Representación esquemática de la activación de las enzimas PC-PLC, PKC, A-Smasa y PKC ζ en la vía de señalización de CD5. PC, fosfatidilcolina; DAG, diacilglicerol; SM, esfingomielina; PC-PLC, fosfolipasa C específica de PC; PKC, proteína cinasa C; A-SMasa, esfingomielinasa ácida.

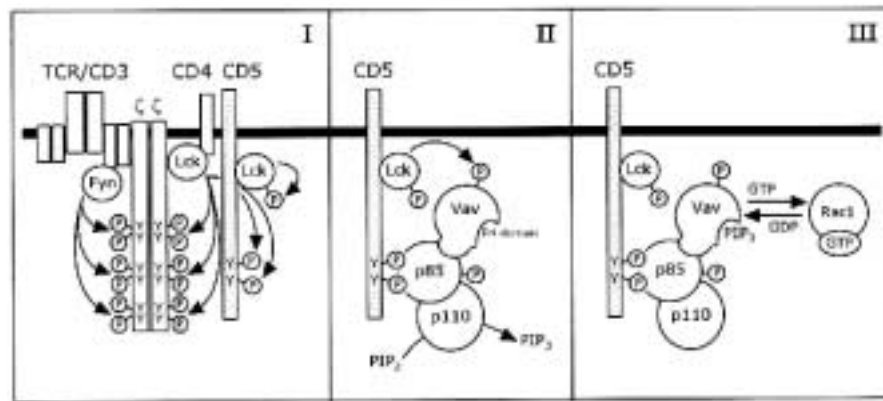


Figura I.10. Modelo para la activación de Rac-1 mediada por PI3K y Vav en la vía de señalización de CD5, y que resulta en. **(I)** Tras la activación del TCR por el ligando, los residuos tirosina en la cola citoplasmática de CD5 son fosforilados por Lck, así como los residuos tirosina de las cadenas del complejo TCR/CD3. Lck se asocia a CD5 y es activado por autofosforilación. **(II)** Los dominios SH2 de la subunidad p85 α de PI3-K se unen a los residuos fosfotirosina de CD5. Vav se asocia con la subunidad p85 α , que le sirve para acercarse al complejo. Tras la ligación de CD5, PI3-K es fosforilada en tirosinas por una PTK, presumiblemente Lck, que activa la actividad cinasa a la subunidad p110. La actividad intercambiadora de nucleótidos de Vav se pre-activa a través de la fosforilación en tirosinas, probablemente por Lck. **(III)** Tras la unión de alguno de los productos lipídicos de PI3-K, como IP 3,4,5-P₃ (PIP₃), a Vav, éste es completamente activado y activará Rac1 a través del intercambio de GDP por GTP (*Molecular and Cell Biology, S.I. Gringhuis, 1998, 18: 1725*).

Aunque algunos estudios demuestran que la activación directa de linfocitos T con anti-CD5 no activa PI3-K [178], otros demuestran la activación de PI3-K en un sistema co-estimulador un poco complejo: fitohemaglutinina (PHA) + anti-CD28 + anti-CD5 [146]. Bajo este tipo de estímulo también demuestran que PI3-K media en la activación de Rac1 (GTPasa pequeña de la familia Rho) a través de Vav (factor intercambiador de nucleótidos de guanina específico de la familia Rho) [146], y demuestran también que la activación de Rac1 y Vav precede a la activación de CaMK IV, la cual se acompaña de un incremento en la actividad transactivadora de AP-1 y en una mayor transcripción y expresión del gen IL-2 [179]. Estos autores proponen un modelo de la vía de señalización de CD5 que se representa en la figura I.10. Tras la estimulación del TCR, CD5 es fosforilado en tirosinas por Lck asociada al complejo receptor antigénico. La subunidad reguladora p85 α de PI3-K se asocia a las tirosinas fosforiladas de CD5 a través de sus dominios SH2. Vav es entonces reclutado por p85 α -PI3-K y pre-activado por la fosforilación mediada por la cinasa Lck asociada a CD5.

Tras el entrecruzamiento de CD5, p85 α es fosforilado en tirosinas, permitiendo la activación de la subunidad catalítica p110, que fosforila fosfatidilinositoles (PI) 3,4-P₂ (PIP₂) generando IP 3,4,5-P₃ (PIP₃). La unión de PIP₃, o de otro producto lipídico de PI3-K, a Vav completa la activación de Vav y permite que éste posteriormente active a Rac1.

3.6.4 Cascadas MAPK de señalización. Se ha descrito que la vía de señalización de CD5 promueve la unión a DNA del factor de transcripción AP-1, pero no de NF-kB [179]. AP-1 es un heterodímero formado por miembros de la familia de Jun y Fos, que pueden unirse al promotor de IL-2 solos o acompañados de NF-AT. La actividad de AP-1 es regulada a nivel transcripcional y post-traduccionales por miembros de la familia MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (JNK, MEK/ERK, y p38), la familia de las cinasas Janus, CaMK y PKA. Curiosamente, el ligamiento de CD5 en células Jurkat resulta en la activación de MEK (MAPKK, cinasa que fosforila MAPK) y JNK (cinasa que fosforila la región N-terminal de c-Jun) [170] (fig. I.11). MEK determina la

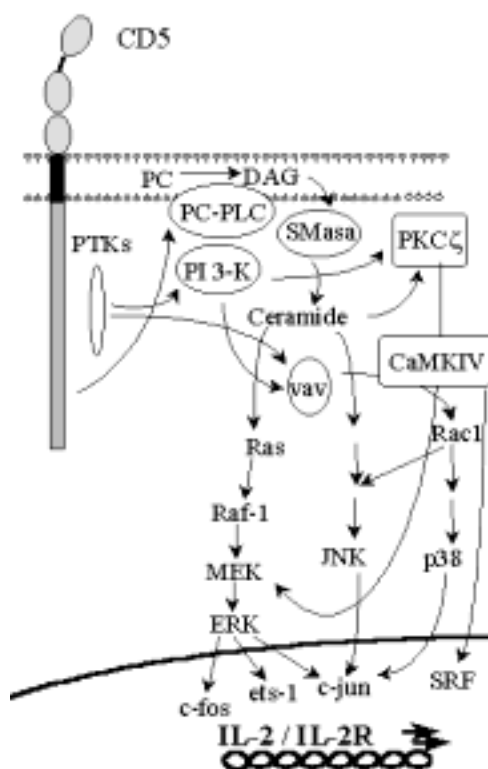


Figura I.11. Representación esquemática de las cascadas MAPK activadas por la estimulación vía CD5.

activación de factores de transcripción y proteínas del ciclo celular implicadas en la promoción del crecimiento, mientras que JNK está implicada en la iniciación y progresión de la apoptosis. Por lo tanto, el balance dinámico entre los efectos opuestos atribuidos a las vías MEK y JNK [180] podría ser la base de los efectos moduladores de CD5 en la activación y diferenciación. MEK es activada principalmente por la proteína de unión a GTP Ras, mientras que JNK es activada por proteínas de unión a GTP de la familia Rho (RhoA, Rac1, Cdc42,...). No obstante, la activación de PKC- ζ y la generación de ceramida se ha descrito que puede también preceder a la activación de MEK [181] y JNK [171], respectivamente, por lo que ambos podrían ser procesos dependientes en la señalización de CD5 (fig. I.11). Además, CaMK IV, que también forma parte de la vía de señalización de CD5 (fig. I.11), es capaz de activar JNK, ERK y p38 [182]. Contradiendo esto, existen, no obstante, estudios que demuestran,

utilizando inhibidores específicos de cinasas, que CamK IV, pero no ERK, JNK y p38, juega un papel en la inducción de la actividad AP-1 mediada por CD5 [179].

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El receptor CD5 humano es una glicoproteína de membrana expresada en todos los linfocitos T y en una subpoblación de linfocitos B. A pesar de no poseer ninguna actividad catalítica intrínseca, CD5 es susceptible de ser fosforilado y de mediar la activación de proteínas señalizadoras intracelulares. Se ha descrito que CD5 es sustrato de cinasas inducibles tras la estimulación del TCR o BCR, por lo que podría ser un elemento clave en la señalización mediada por el receptor antigénico. De hecho, existen evidencias que atribuyen a CD5 un papel modulador, tanto negativo como positivo, sobre las señales transducidas por el receptor antigénico. Por otro lado, la estimulación de CD5 induce la activación de enzimas implicados en la transducción del señal, en los que podrían encontrarse proteínas con actividad cinasa. Con todos estos datos, hipotetizamos que los ciclos de fosforilación-defosforilación están implicados en la regulación de la actividad y la función de CD5. De acuerdo con esta hipótesis nos planteamos el estudio de los mecanismos de fosforilación implicados en la señalización intracelular de CD5 desde dos puntos de vista:

1) CD5 como sustrato de cinasas.

La fosforilación de receptores por cinasas normalmente implica cambios conformacionales en la molécula y la generación sitios de asociación a moléculas citosólicas. Para CD5 se ha visto que estímulos que mimetizan la activación linfocitaria, como ésteres de forbol, anti-CD3 mAb o pervanadato, inducen una importante hiperfosforilación de la molécula. Curiosamente, el análisis detallado de la secuencia aminoacídica de la región citoplasmática de CD5 muestra la presencia de diversos residuos serina, treonina y tirosina, inmersos en motivos consenso de fosforilación para diferentes cinasas intracelulares. Con ello, decidimos localizar los sitios precisos de fosforilación inducible de CD5 y determinar su implicación en la señalización intracelular de la molécula.

2) CD5 como activador de cinasas.

La activación de cinasas es un proceso crítico en el inicio de la transducción de señales para muchos receptores, como el receptor específico de antígeno. Este proceso precede a la fosforilación y activación en el interior celular de moléculas implicadas en la transducción de señales hacia el núcleo. Puesto que cada vez es más consistente la idea que CD5 posee su propia vía de señalización, decidimos analizar la capacidad de CD5 de inducir la activación de cinasas intracelulares.

Aunque tanto células T como B expresan CD5 en membrana, nos planteamos el estudio únicamente en el linaje T. La falta de disponibilidad de líneas linfoides B CD5 positivas estables dificulta los estudios de este receptor en el linaje B. Por el contrario en el linaje T existen numerosas líneas celulares CD5 positivas. Nosotros hemos utilizado concretamente la línea celular Jurkat, porque ha sido ampliamente estudiada y utilizada como modelo para la caracterización de múltiples cascadas de señalización presentes en los linfocitos T.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos químicos

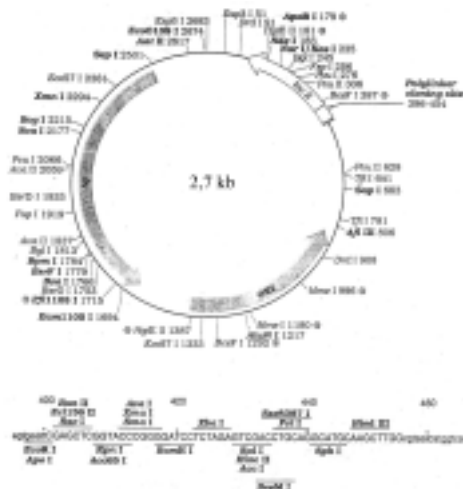
BSA (Merck), PMA (Calbiochem), estaurosporina (Sigma), GF109203X (Calbiochem), [³²P]rtofosfato sódico (Nuclear Ibérica), proteína-A-sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech), glutatión-sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech), [³²P]ATP (Nuclear Ibérica), PKC (Upstate Biotechnology), CKII (Upstate Biotechnology), IPTG (Promega), DAB (Sigma), gel de silicato LK6D (Whatman), membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad), proteína G-HRP (Sigma), *Complete protease inhibitor cocktail tablets* (Boehringer Mannheim), *TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems* (Promega), *ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit* (PE Applied Biosystems), *ZAP-cDNA Synthesis kit* (Stratagene), *SuperSignal West Dura Substrate* (Pierce Chemical Company), *SureClone Ligation kit* (Amersham Pharmacia Biotech).

2. Anticuerpos

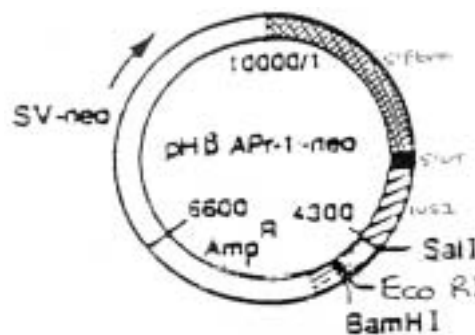
Anticuerpo murino anti-fosfotirosina PY99 (Santa Cruz Biotechnology), mAb murino anti-CD3ε OKT3 (Ortho Biotech Inc.), mAb murino anti-CD5 Cris-1 (producido en nuestro laboratorio por el Dr. Vilella utilizando linfocitos periféricos como células inmunizadoras), antisuero policlonal de conejo contra la región extracelular de CD5 (producido en nuestro laboratorio utilizando el recombinante soluble CD5 como molécula inmunizadora), antisuero policlonal de conejo anti-GST (producido en nuestro laboratorio utilizando GST-CD5cy/YYY como molécula inmunizadora), antisuero policlonal de conejo anti-Grb2 (Santa Cruz Biotechnology), antisuero policlonal de conejo anti-Cbl (Santa Cruz Biotechnology), antisuero policlonal de conejo anti-LAT (Upstate Biotechnology), anticuerpos contra Ig de ratón conjugados a HRP (Amersham Pharmacia Biotech), anticuerpos contra Ig de conejo conjugados a HRP (Amersham Pharmacia Biotech), anticuerpos de conejo contra Ig de ratón conjugados a FITC (Sigma).

3. Vectores

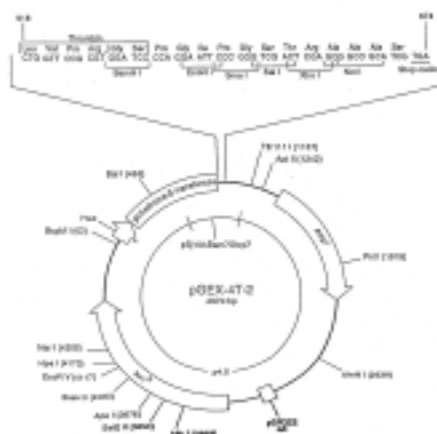
1) pUC 18:



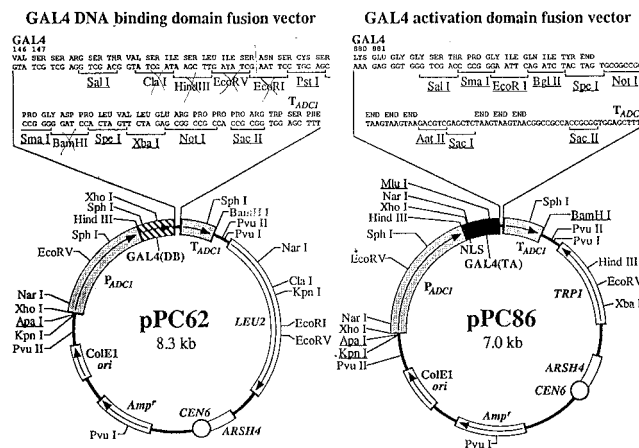
2) pHβApr-1-neo:



3) pGex 4T-2 (Amersham Pharmacia Biotech):



4) pPC62 y pPC86:



4. Células y transfectantes

La línea celular leucémica humana T Jurkat JE6.1 y sus líneas derivadas deficientes en Lck (JCAM1) y en cadenas TCR β (JRT3-T3.5) proceden de la colección ATCC (*American Type Culture Collection*). La subclona Jurkat 2G5, deficiente en la expresión a nivel de membrana de CD5, se obtuvo a partir de células Jurkat JE6.1 seleccionadas negativamente por *cell sorting*, y posteriormente clonadas por dilución al límite de la población CD5⁻. El análisis fenotípico de estas células es CD2⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD5⁻, CD8⁻, CD18⁺, CD45⁺, CD50⁻, y HLA de clase I positivo. Las células Jurkat 2G5 transfectadas con en el vector de expresión pH β Apr-1-neo y que expresan las diferentes construcciones de CD5, se obtuvieron por electroporación (0.2 KV, 960

μ FD) y selección por expresión en membrana de CD5 de las clonas resistentes a neomicina (fig. III.1). Las células se mantienen en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % FCS, L-glutamina y antibióticos.

5. Construcciones de CD5

La secuencia cDNA completa de CD5 se encuentra partida en dos clonas, pUC-T1.1 y pUC-T1.2 [92]. La región extracelular está codificada por la clona pT1.1 y parte de la pT1.2, mientras que la región intracelular está completamente codificada por la clona pT1.2. La construcción WT de CD5 se obtuvo por ligación a tres bandas de fragmentos EcoRI / Kpn I de pT1.1 y pT1.2 en el vector pH β Apr-1-neo restringido por su sitio EcoRI. Las construcciones mutantes para CD5 se obtuvieron de una forma similar, excepto que la clona pT1.2 se sometió a pasos mutacionales previos. Las moléculas K384^{stop} y E418^{stop} se obtuvieron por subclonación de un fragmento EcoRI / EcoRI de la clona pT1.2 en M13mp18 e insertando un sitio nuevo Mse I por mutagénesis *in vitro* dirigida por oligonucleótido (método *Kunkel's*), el cual introduce un codón stop prematuro en K384 y E418, respectivamente. Los mutantes H449^{stop}, Δ (E418-L444), Δ (K384-A417), T410A, T412A, Y429A, Y441A y Y463A se construyeron por mutagénesis dirigida mediante PCR inversa sobre la clona pT1.2, generando mutaciones puntuales y deleciones (fig. III.2). Los restantes mutantes T410A-T412A, E418^{stop} / T410A-T412A, E418^{stop} / T410A, E418^{stop} / T412A, Y429A-Y463, se construyeron también por PCR inversa, pero a partir

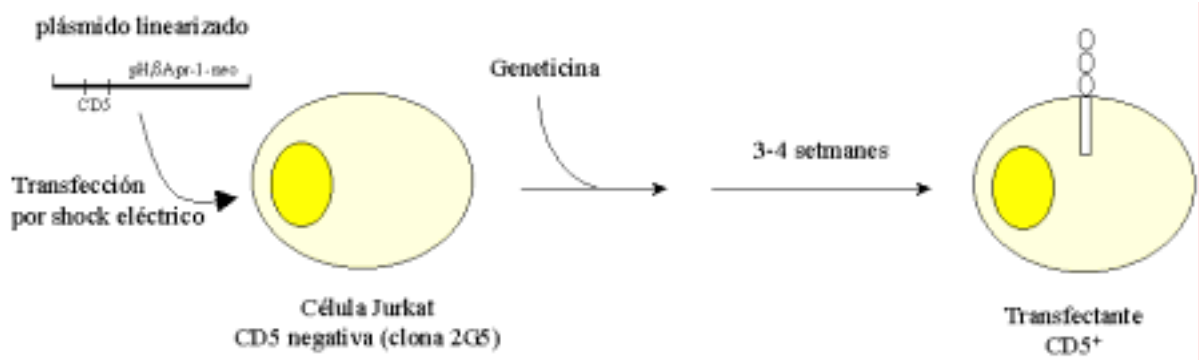


Figura III.1. Esquema de la transfección y posterior expresión de la construcción CD5.WT en células Jurkat 2G5.

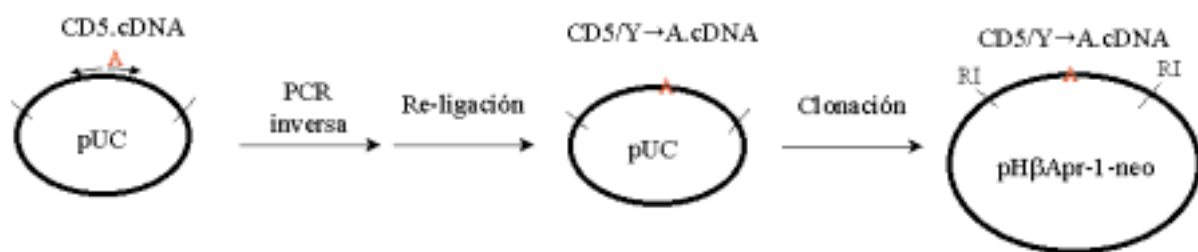


Figura III.2. Mutagénesis dirigida mediante PCR inversa. Aquí se muestra de forma esquemática la generación de una construcción mutante de CD5 a la que se le ha substituido una tirosina por una alanina.

de clonas pT1.2 modificadas previamente. Las mutaciones se comprobaron por secuenciación del DNA. El plásmido se purificó por gradiente de densidad en cloruro de cesio.

6. Proteínas de fusión GST

Las construcciones GST-CD5cy codifican para una proteína de fusión compuesta por la proteína GST en pauta de lectura con los 47 aa más C-terminales de la cola citoplasmática de CD5 (desde H424 hasta el codón *stop* natural). Se obtienen por amplificación del fragmento correspondiente mediante PCR y clonación posterior en el vector pGEX-4T2 restringido a Sal I y NotI. Las construcciones GST-CD5cy conteniendo las substituciones Y→A se obtienen por amplificación por PCR utilizando como molde los mutantes clonados en el vector pHβApr-1-neo antes descritos. Bacterias competentes DH10 se transforman por shock-térmico con el vector de expresión apropiado pGEX y se seleccionan por su capacidad para expresar correctamente las proteínas de fusión. La expresión de las clonas seleccionadas es inducida por IPTG, y posteriormente son rotas por sonicación en un tampón de lisis conteniendo 1 % Tritón-X-100 y una mezcla completa de inhibidores de proteasas. Después de una centrifugación a 12000xg a 4°C durante 10 min, las proteínas de fusión GST se purifican del sobrenadante por adsorción a una matriz de glutatión-sefarosa.

7. Transformación de levaduras por el procedimiento con acetato de litio (LiAc)

Se inoculan 10 ml de medio de cultivo con una clona de levadura y se dejan toda una noche a 30°C con agitación. Al día siguiente, se diluye el cultivo añadiendo 90 ml del mismo medio. Cuando la densidad óptica del cultivo a 600 nm (DO_{600}) llega a 0.8, se centrifugan las células en dos tubos de 50 ml a 3200 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. Luego se descarta el sobrenadante por decantación, se resuspenden los dos pelets en 50 ml de agua destilada y se vuelven a centrifugar en las mismas condiciones. El pelet celular se resuspende en 10 ml de Lisorb (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM LiOAc, 1 mM EDTA, 1 M sorbitol). La mezcla se alícuota en 10 tubos eppendorf de 1.5 ml y se deja incubando 30 min a 30°C con agitación (cada tubo servirá para 1 transformación). Se peletan las células por microcentrifugación durante unos segundos, se resuspenden en 30 μ l tampón LiAc (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM LiAc pH 7.5, 1 mM EDTA) y se añaden 50 μ g DNA *carrier* (esperma de salmón), 0.1 μ g DNA transformante y 300 μ l tampón PEG 4000 (tampón de LiAc conteniendo 40% PEG 4000). Se incuban los tubos a 30°C 30 min con agitación, se pasan a un baño de 42°C y se les añade 40 μ l DMSO. Pasados 10 min, se vuelven a cambiar a un baño a 30°C y se les adiciona 1 ml medio de cultivo selectivo. Después de 45 min, se peletan las levaduras, se resuspenden en 200 μ l del mismo medio selectivo y se plaquean en *Minimal SD agar Base* (Clontech Lab, Inc) suplementado con medio

selectivo (p.ej., *-Trp DO supplement* (Clontech Lab, Inc). Se dejan incubando los placas 2-3 días a 30°C.

8. Sistema del *two-hybrid* en levaduras

Para la detección de interacciones proteína-proteína intracelulares es muy frecuente el uso del sistema del *two-hybrid* en levaduras. En nuestro caso se utilizó el dominio citoplasmático de CD5 como cebo para investigar en una librería de cDNA de origen linfoide. Los cDNAs amplificados por PCR codificantes para el dominio citoplasmático de CD5 silvestre (WT) y el de los mutantes se fusionan con el dominio de unión al DNA de GAL4 en el vector pPC62 [183]. La librería de cDNA de células B murinas construida con el *ZAP-cDNA Synthesis kit* se fusiona con el dominio activador de la transcripción de GAL4 en el vector pPC86 [183] (ver apartado de vectores más arriba reseñado). Se transforman levaduras HF7c de forma secuencial con el plásmido pPC62 conteniendo el “cebo” y posteriormente con el plásmido pPC86 conteniendo la “presa”, utilizando el procedimiento con acetato de litio antes descrito. Las levaduras co-transformantes se seleccionan por crecimiento en medio sin leucina y sin triptófano. Las clonas positivas por interacción “presa-cebo” se aíslan por crecimiento en un medio selectivo para co-transformantes sin histidina y se testan por la actividad del gen testigo LacZ en filtros de ensayo [184]. Se lisan las clonas His⁺LacZ⁺, se recuperan los plásmidos y se transforman bacterias. Después de un *screening* por PCR se secuencian el cDNA del plásmido pPC86 interaccionante. Para los ensayos directos de interacción, levaduras HF7c se co-transforman con las construcciones mutantes de la cola citoplasmática de CD5 clonadas en el vector pPC62 y con CKIIβ clonada en pPC86, siguiendo el mismo protocolo descrito arriba.

9. Co-precipitación *in vitro* de CKIIβ y CD5

La proteína CKIIβ marcada con ³⁵S se obtiene por traducción *in vitro* del producto resultante de la amplificación por PCR de la secuencia completa de CKIIβ, utilizando el sistema de transcripción/traducción *in vitro* acoplada al promotor rápido TNT T7. La proteína

de fusión GST-CD5 se obtiene tal y como se describe arriba. La proteína CKIIβ marcada se incuba toda una noche a 4°C con cantidades equivalentes de GST sola y GST-CD5. Tras la incubación, la proteína CKIIβ no interaccionada con GST-CD5 es eliminada por sucesivos lavados con solución salina conteniendo inhibidores de proteasas. Las muestras se separan por SDS-PAGE al 12 % y el gel es autorradiografiado.

10. Estimulación celular con OKT3 y PV para el estudio de la tirosinfosforilación de CD5

Células Jurkat se lavan y se resuspenden con PBS frío a una densidad final de 2x10⁸ células/ml. Para la estimulación con OKT3, se dejan incubando en hielo 2x10⁷ células (100 µl) durante 10 min en presencia de 2 µg/ml OKT3, y luego se estimulan a 37°C durante 3 min en un baño seco. Para la estimulación con pervanadato (PV), 1x10⁷ células se equilibran primero a 37°C en un baño seco durante 10 min, y posteriormente se estimulan con 200 µM PV durante 15 min a 37°C en el mismo baño. El PV se prepara mezclando 4 mM ortovanadato con 180 mM H₂O₂ durante 10 min a temperatura ambiente. Al final de los períodos de estimulación, las células son lavadas con 1 ml de PBS frío y, después, lisadas en hielo durante 15 min con 500 µl de tampón de lisis (1 % Tritón X-100, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 90 mM NaCl, 10 % glicerol, 2 mM EDTA, 1 mM ortovanadato, 1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina). Los núcleos y los restos celulares se eliminan por microcentrifugación a 4°C durante 15 min.

11. Estimulación celular con Cris-1 y OKT3 para el estudio de tirosinfosforilación de proteínas adaptadoras

5x10⁶ de células Jurkat se lavan una vez con PBS frío, se resuspenden en 50 µl de medio de cultivo frío (1x10⁸ células/ml) y se equilibran a 37°C en un baño húmedo durante 10 min. Para la estimulación vía CD5, se añaden 50 µl Cris-1 (20 µg/ml final), y para la estimulación vía TCR/CD3 se añaden 50 µl OKT3 (10 µg/ml final). En ambos casos, las células se incuban durante 2 min a 37°C en el mismo baño. La estimulación

se para añadiendo 1 ml de PBS frío y lisando las células en 500 μ l tampón de lisis con Tritón-X-100 durante 15 min a 4°C. La fracción insoluble de los lisados se descarta después de 15 min de microcentrifugación a 4°C.

12. Marcaje metabólico con fósforo radioactivo ^{32}P y estimulación celular con PMA

Se lavan las células con medio libre de fosfatos (20 mM HEPES pH 7.2, 10 mM dextrosa, 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mM KCl, 150 mM NaCl, 1 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mM NaHCO_3 , 10% FCS dializado) y se resuspenden en una densidad final de 1×10^7 células/ml. La suspensión celular se divide en alícuotas equivalentes de 1 ml en una placa de 6 pocillos (1×10^7 células/pocillo). Las células se preincuban durante 30 min a 37°C en una atmósfera 5% CO_2 humidificada, se marcan con fósforo radioactivo añadiendo 0,5 mCi de [^{32}P]ortofosfato y se dejan incubando 3 h más a 37°C. Para la estimulación con éster de forbol, se añaden 100 ng/ml de PMA 30 min antes del final del período de marcaje. Para la inhibición de PKC, se añade GF109203X (5 μ M final) o estaurosporina (250 nM final) justo antes de la estimulación con PMA. Al final del período de incubación, las células se lavan una vez con 20 ml PBS frío para eliminar el exceso de fósforo no incorporado y se lisan en 500 μ l tampón de lisis (1% Nonidet P-40, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 140 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 0,4 mM ortovanadato sódico, 10 mM yodoacetamida, 5 mM pirofosfato sódico, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinina, 1 μ g/ml leupetina, 1 μ g/ml pepstatina A, 1 μ g/ml quimostatina, 1 μ g/ml α -1-antitripsina) durante 15 min en hielo. La fracción insoluble de los lisados se descarta después de 15 min de microcentrifugación a 4°C.

13. Inmunoprecipitación de CD5, Grb2, c-Cbl y LAT

Excepto para la inmunoprecipitación de CD5 a partir de lisados de células estimuladas con anti-CD5 mAb Cris-1, todos los lisados son pre-aclarados con 30 μ l proteína-A-sefarosa al 50% durante 1 h a 4°C. La inmunoprecipitación de CD5, Grb2, c-Cbl y LAT, se

consigue añadiendo, juntamente con 15 μ l proteína-A-sefarosa, 0,5 μ g Cris-1, 0,5 μ g anti-Grb2, 0,5 μ g anti-Cbl y 1 μ g anti-LAT, respectivamente, a los lisados celulares previamente preparados, dejándolos en rotación durante 1-2 h a 4°C. Posteriormente, los inmunoprecipitados de Grb2, c-Cbl y LAT se lavan 4 veces con tampón de lisis, y los inmunoprecipitados de CD5 se lavan 2 veces con tampón de lisis, 2 veces con tampón de lisis conteniendo 0,5 M NaCl, 2 veces con tampón de lisis conteniendo 0,1% SDS y 2 veces con tampón de lisis. Los inmunocomplejos copulados a sefarosa son desnaturalizados hirviéndolos 5 min con 30 μ l de tampón de reductor (2x). Luego, se separan por SDS-PAGE y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa.

14. Detección de proteínas por análisis de *western blot*

Para la detección de proteínas tirosinfosforiladas, las membranas de nitrocelulosa se bloquean con solución de bloqueo con BSA (PBS conteniendo 0,1 % Tween-20 y 1 % BSA). Para el resto de *immunoblots*, las membranas se bloquean con solución de bloqueo con leche desnatada en polvo (PBS conteniendo 0,1 % Tween-20 y 5 % leche desnatada). En todos los casos el bloqueo se puede realizar toda una noche a 4°C ó 1 h a temperatura ambiente ó 30 min a 37°C. Para la detección de tirosinas fosforiladas, se utiliza el mAb anti-fosfotirosina PY99 (0,4 μ g/ml) y anticuerpos contra Ig de ratón conjugados a HRP (1/3000), incubados 1h y 30 min, respectivamente. Para la detección de Cbl y LAT se utilizan mAb anti-Cbl (0,5 μ g/ml) y mAb anti-LAT (2 μ g/ml), respectivamente, y anticuerpos contra Ig de conejo conjugados a HRP (1/3000), incubados también 1h y 30 min, respectivamente. En todos estos casos, las membranas se revelaron por quimioluminiscencia con *SuperSignal West Dura Substrate*. Para la detección de CD5, se utilizan anticuerpos policlonales de conejo anti-CD5 soluble (1/200) y proteína G conjugada a HRP (1/800), incubados 30 min y 15 min, respectivamente. Para la detección de proteínas de fusión GST, se utilizan anticuerpos policlonales de conejo anti-GST

(1/200) y proteína G conjugada a HRP (1/800), incubados 30 min y 15 min, respectivamente. En estos casos, las membranas se revelaron por colorimetría utilizando como sustratos de la peroxidasa una pastilla de 3,3'-diaminobencidina (DAB) y 10 μ l H₂O₂, ambos disueltos en 20 ml PBS. Para todos los *immunoblots* las incubaciones de los anticuerpos primario y secundario se realizan a temperatura ambiente y son precedidas de 3 lavados con solución de lavado (PBS conteniendo 0.1 % Tween-20). Para re-analizar una membrana por *western blot*, se eliminan primero los inmunocomplejos con solución de *stripping* (62.5 mM Tris-HCl pH 6.7, 100 mM 2- β mercaptoetanol, 2 % SDS) a 55°C durante 30 min.

15. Ensayos de fosforilación *in vitro* de CD5 por CKII y PKC

Se inmunoprecipita CD5 de lisados NP-40 procedentes de 10x10⁶ de células Jurkat y se resuspenden con 25 μ l de tampón de cinasa (20 mM MOPS pH 7.2, 25 mM β -fosfato de glicerol, 5 mM EGTA, 1 mM vanadato sódico, 1 mM DTT, 1 mM CaCl₂, 15 mM MgCl₂, 100 μ M ATP, 2.5 μ Ci [γ -³²P]ATP). El ensayo de cinasas *in vitro* se lleva a cabo a 30°C durante 10 min en presencia de las enzimas purificadas PKC (10 ng) y CKII (50 ng), con o sin activadores lipídicos de PKC (25 μ g fosfatidilserina y 0.25 μ g diglicérido), respectivamente. La reacción se para añadiendo 500 μ l de tampón de lisis. Posteriormente, los inmunoprecipitados se lavan 2 veces con tampón de lisis y se resuspenden en 30 μ l de tampón reductor (2x) de carga. Las muestras se separan por SDS-PAGE y se transfieren a nitrocelulosa. La incorporación de ³²P se detecta por autorradiografía de las membranas. La detección de CD5 en las membranas se realiza por *western blot* (ver más arriba).

16. Ensayos de fosforilación *in vitro* de CD5 por Lck y Fyn

Se añade 1 μ g de las proteínas de fusión solubles GST-CD5cy a 30 μ l del tampón cinasa (50 mM Hepes pH 7.2, 10 mM MnCl₂, 150 mM NaCl, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM DTT, 0.1 % NP-40, 100 μ M ATP, 10 μ Ci [γ -³²P]ATP). El

ensayo de cinasa *in vitro* se lleva a cabo a 30°C durante 30 min en presencia de las proteínas de fusión GST-Lck (2 μ g) o GST-Fyn (1 μ g) copuladas a glutatión-sefarosa. La proteína bovina MBP (proteína básica de mielina) (1 μ g) se utiliza como control positivo de sustrato. La reacción se para añadiendo 30 μ l de tampón reductor (4x) y hirviendo las muestras 5 min. El volumen total se somete a electroforesis en geles SDS-PAGE. Las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa y la incorporación de ³²P se detecta por autorradiografía. La detección de CD5 en las membranas se realiza por *western blot*.

17. Ensayos de fosforilación *in vitro* por la cinasa asociada a CD5

10x10⁶ de células Jurkat, estimuladas o no con Cris-1 (20 μ g/ml final) o OKT3 (10 μ g/ml final), se lisan durante 30 min a 4°C en 500 μ l de tampón de lisis A (1 % Tritón-X-100, 50 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM pervanadato, 10 μ g/ml leupeptina, 10 μ g/ml aprotinina, 25 μ M p-nitrofenil p-guanidinobenzoato, 1 mM EDTA). De los lisados celulares se obtienen los inmunoprecipitados de CD5 que se lavan 4 veces con el tampón B (tampón A, pero sin EDTA), y se resuspenden en 50 μ l de tampón de cinasa (20 mM Hepes pH 7.5, 100mM NaCl, 5 mM MnCl₂, 5 mM MgCl₂, 1 μ M ATP). El ensayo de cinasa *in vitro* se inicia cuando se añade a la mezcla 2.5 μ Ci [γ -³²P]ATP y se incuba a 4°C durante 15 min. La reacción se termina añadiendo 500 μ l de tampón C (tampón A conteniendo 5 mM EDTA). Los inmunoprecipitados se lavan 4 veces con el tampón A y se resuspenden en 30 μ l de tampón reductor (2x) de carga. Las muestras se separan por SDS-PAGE y se transfieren a nitrocelulosa. La incorporación de ³²P se detecta por autorradiografía de las membranas. La detección de CD5 en las membranas se realiza por *western blot*.

18. Análisis de la internalización de CD5 inducida por anticuerpo

Se dejan en hielo durante 30 min células resuspendidas en medio de cultivo (RPMI 1640 más 10 % FCS)

conteniendo concentraciones saturantes de mAb anti-CD5 Cris-1 ($1-10 \mu\text{g}/10^6$ células). Después de lavarlas 3 veces con PBS frío, las células se ajustan a 1×10^6 células/ml con medio de cultivo, se distribuyen en una placa de 24 pocillos (1 ml/pocillo), y se incuban a 37°C en una atmósfera 5% CO_2 humidificada, en presencia o ausencia de PMA (100 ng/ml final). En los tiempos indicados, se recogen y se lavan 200 μl de los cultivos celulares con solución fría de lavado (PBS pH 7.2 conteniendo 2% FCS y 0,1% azida sódica). Posteriormente, las células se incuban durante 30 min en hielo con 100 μl de una solución 1:100 de anticuerpos contra Ig de ratón conjugados a FITC, se lavan y se fijan con solución de lavado frío conteniendo 0.3% formaldehído. Finalmente, las células se someten a un análisis por citometría de flujo en un FACScan (Becton Dickinson). La intensidad media de fluorescencia (MFI) se utiliza para calcular el porcentaje de unión de anti-CD5: (MFI de células tratadas)/(MFI de células sin tratar) x 100%.

19. Análisis de la generación de DAG

Se incuban células Jurkat toda una noche a 37°C en una atmósfera 5% CO_2 humidificada con el tampón HG (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM Na_2HPO_4 , 2.5 mM glucosa, 20 mM HEPES, 0.1% BSA, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 pH7.4) en presencia del precursor lipídico de fosfatidilcolina [^3H]ácido palmítico (2-4 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$). Después de 2 lavados con el tampón HG, alícuotas de 2×10^6 células se resuspenden en 0.5 ml de tampón HG y se estimulan a 37°C con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-CD5 mAb Cris-1 en los tiempos indicados. Al final del período de estimulación, las células se sedimentan por microcentrifugación a 10000 x g durante 10 s. a 4°C , y se extraen los lípidos del pelet celular [185]. Los diacilgliceroles (DAG) son separados de los triglicéridos, ésteres de colesterol y fosfolípidos en placas en gel de silicato LK6D por cromatografía en capa fina (TLC, *thin layer chromatography*) con *n*-hexano/dietil éter/ácido fórmico (80/20/3). La radioactividad incorporada en los DAG se analiza mediante un *scanner* automático de cromatografía TLC (Berthold Systems Inc.). Los valores

se expresan como un porcentaje sobre células control sin estimular.

IV. RESULTADOS

(i) CD5 COMO SUBSTRATO DE CINASAS

1. FOSFORILACIÓN DE CD5 EN RESIDUOS SERINA
2. FOSFORILACIÓN DE CD5 EN RESIDUOS TREONINA
3. FOSFORILACIÓN DE CD5 EN RESIDUOS TIROSINA

1. FOSFORILACIÓN DE CD5 EN RESIDUOS SERINA:

Casein Kinase II se asocia y fosforila CD5

Resumen. La molécula CD5 se encuentra *in vivo* constitutivamente fosforilada a nivel de un grupo de tres serinas carboxiterminales (S458, S459, S461), incluidas dentro de consensos de fosforilación para CKII. A través de ensayos de fosforilación *in vitro* demostramos en este trabajo que, de todos los sitios potenciales de fosforilación por CKII encontrados en la región citoplasmática de CD5, sólo las serinas carboxiterminales son sustrato accesible para esta cinasa. Mediante la técnica del *yeast two-hybrid* y ensayos de co-precipitación, demostramos además la existencia de una interacción específica entre la subunidad reguladora β de CKII y la región C-terminal de CD5 donde se localizan las serinas antes mencionadas. En conclusión, los datos aquí presentados argumentan a favor de la asociación y fosforilación de CD5 por la serin/treonincinasa CKII.

La altamente conservada región citoplasmática de CD5 [91] no posee ninguna actividad catalítica intrínseca. No obstante, contiene diversos sitios que son dianas potenciales de fosforilación para diversas serin/treonin y tirosincinasas (fig. IV.1.1), que podrían mediar en la interacción con moléculas señalizadoras intracelulares. CD5 está constitutivamente fosforilado [106, 110] y sus niveles de fosforilación se ven considerablemente aumentados tras la estimulación celular [83, 111-113]. La hiperfosforilación en residuos serina tras la ligación con CD3 o CD5 ha sido atribuida a una actividad serin/treonincinasa inducible aún sin caracterizar [111]. La fosforilación constitutiva de CD5 se localiza a nivel de tres serinas carboxiterminales y se inhibe por acción de heparina que es un inhibidor específico de la

serin/treonincinasa CKII [107]. La integridad de estos residuos serina se ha demostrado que es clave para la señalización de CD5, puesto que su mutación inhibe la liberación de diacilglicerol (DAG) mediada por fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC) [107, 169] y la generación de ceramida mediada por esfingomielinasa ácida [170] (fig. I.9). Estos datos indican que la fosforilación de CD5 por CKII es crítica para la función señalizadora de CD5. En este trabajo, hemos utilizado moléculas de CD5 *wild type* y mutantes citoplasmáticos para demostrar que la región C-terminal de la cola citoplasmática de CD5, además de ser sustrato *in vitro* de CKII, representa una zona de anclaje para la misma enzima.

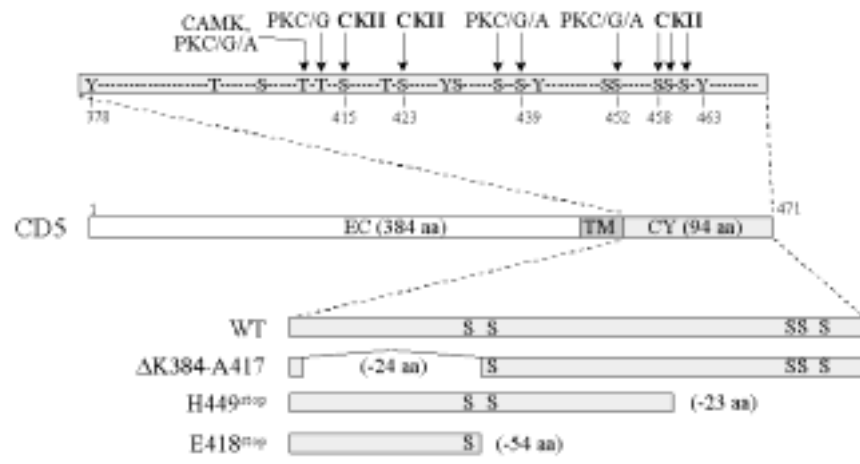


Figura IV.1.1 Representación esquemática de las construcciones de CD5 utilizadas en este estudio. En ellas se indica la posición de los residuos serina que cumplen un motivo consenso de fosforilación para CKII (S/T-(X)₂-D/E) ó (S-(X)₂-S(P)). Los mutantes por deleción del extremo C-terminal de la región citoplasmática (H449^{stop} y E418^{stop}) se nombran con el aminoácido sobre el cual se ha añadido un codón *stop* prematuro, y por su posición en la secuencia completa de CD5. El mutante por deleción interna (ΔK384-A417) se nombra con el primer y último aminoácido delecionado y su posición en la secuencia completa de CD5. La posición de los residuos serina, treonina y tirosina en la secuencia aminoacídica del dominio citoplasmático de CD5 se muestra más arriba. La posición de los residuos en motivos consenso de fosforilación para diferentes cinasas es indicada por flechas. EC, extracelular; CY, citoplasmático; TM, transmembrana.

1.1 CD5 es fosforilado *in vitro* por CKII

La región citoplasmática de CD5 contiene 5 serinas inmersas en 2 motivos consenso de fosforilación para CKII. El motivo S/T-(X)₂-D/E se encuentra en las posiciones S415, S423, S459 y S461, y el motivo S-(X)₂-S(P) únicamente en la posición S458, que es fosforilable siempre y cuando S461 lo esté anteriormente. Para investigar si estas serinas citoplasmáticas son sustrato directo de fosforilación por CKII, decidimos realizar ensayos de fosforilación *in vitro* con preparaciones purificadas de la enzima. Para estos experimentos, generamos una serie de mutantes Jurkat que expresaban moléculas de CD5 truncadas a nivel de su región citoplasmática (fig. IV.1.1).

Los inmunoprecipitados de CD5 de estas células transfectadas se incubaron con CKII humana en presencia de [γ -³²P]ATP. Como se muestra en la figura IV.1.2, la construcción WT es perfectamente fosforilada por CKII, indicando que su región citoplasmática contiene dianas accesibles para CKII. La ausencia de fosforilación en los mutantes que han perdido los sitios consenso más carboxiterminales (H449^{stop} y E418^{stop})

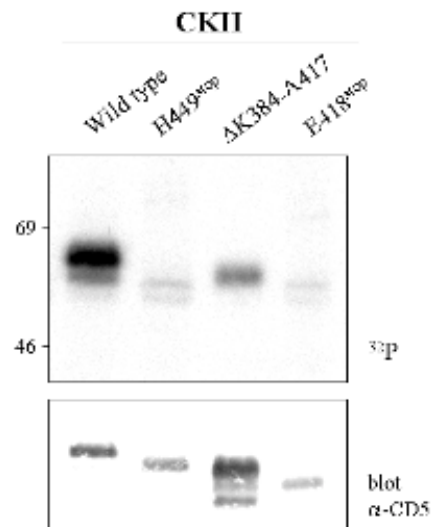


Figura IV.1.2 La región C-terminal de CD5 es diana *in vitro* de fosforilación por CKII. Inmunoprecipitados de CD5 obtenidos a partir de lisados de los transfectantes WT, ΔK384-A417, H449^{stop} y E418^{stop} se incubaron con CKII purificada y [γ -³²P]-ATP durante 10 min a 30°C. Los productos resultantes se resolvieron por SDS-PAGE al 8% y se transfirieron a nitrocelulosa. Las membranas se autorradiografiaron (arriba) y se sometieron a un análisis *Western blot* utilizando suero de conejo contra CD5 como primer anticuerpo (abajo).

apunta que sólo estos sitios son sustrato para CKII. Este hecho es confirmado con el análisis del mutante $\Delta K384-A417$ que pierde el consenso más proximal a la región transmembrana (S415), pero es fosforilado por CKII al mantener intactos las serinas C-terminales. Estos experimentos demuestran que la región citoplasmática de CD5 es un buen sustrato para CKII y que solamente los sitios consenso de fosforilación para CKII más carboxiterminales actuarían como verdaderas dianas. Estos resultados son consistentes con trabajos anteriores realizados por nuestro grupo en los que se describió CKII como la cinasa responsable de la fosforilación constitutiva de CD5 a nivel de las tres serinas carboxiterminales [107].

1.2 La subunidad β de CKII se asocia específicamente con la región citoplasmática de CD5

Para identificar proteínas que interactúan con el dominio citoplasmático del receptor linfocitario humano CD5, empleamos del sistema del doble híbrido (*two-hybrid*). La región citoplasmática completa de CD5 se fusionó al dominio de unión a DNA del factor de transcripción GAL4 (Gal4BD) y se utilizó como cebo en una librería de cDNA procedente de células B murinas, en la cual los cDNAs se encontraban fusionados al dominio activador de la transcripción de GAL4 (Gal4AD). De las 10^6 clonas de levadura co-transformadas aisladas, sólo 7 mostraban un fenotipo His⁺LacZ⁺. El análisis de la secuencia del cDNA procedente de una de estas clonas reveló que contenía un inserto de 0,8kb codificante para la subunidad β de la enzima *Casein Kinase II* (CKII) murina, la cual es 100% idéntica a la humana a nivel de proteína. La clona interactuaba específicamente con el dominio citoplasmático de CD5, puesto que no se detectó ninguna interacción con la región citoplasmática de una proteína no relacionada como ICAM-3 (fig. IV.1.3, porción 1). De la misma manera, CD5 interactuaba específicamente con CKII β al no detectarse crecimiento en medio sin histidina de levaduras co-transformadas con el cebo "Gal4BD-cola

citoplasmática de CD5" y el dominio Gal4AD sin fusionar o fusionado a otras proteínas, como la subunidad p65 del factor de transcripción NF κ B y la fosfatasa PP2A (fig. IV.1.3). Esto descarta la posibilidad de que CKII β y la cola citoplasmática de CD5 contengan una actividad transcripcional latente o que interactúen no-específicamente con otras proteínas.

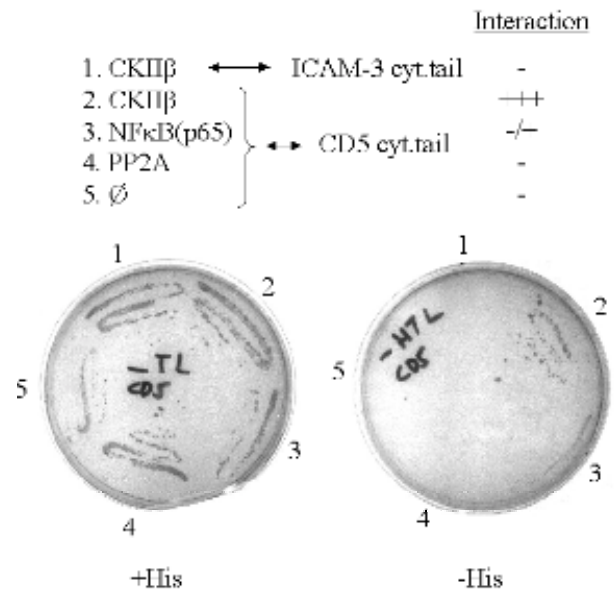


Figura IV.1.3. Interacción específica entre la cola citoplasmática de CD5 y CKII β . Levaduras HF7c se co-transfectaron con el dominio de unión a DNA de Gal4 fusionado a la región citoplasmática de CD5 o a la de ICAM-3, y el dominio activador de la transcripción de Gal4 sin fusionar (\emptyset) o fusionado con CKII β , NF κ B(p65) o PP2A. Las levaduras co-transfectadas se crecieron en un medio con (+His) o sin (-His) histidina. La activación relativa del gen testigo His es proporcional al grado de interacción de las proteínas, y se indica con una escala cualitativa (+++, fuerte; -/+, muy débil; -, no-interacción).

Adicionalmente, validamos la interacción de CD5/CKII β con experimentos de co-precipitación *in vitro*. La subunidad CKII β marcada con 35 S se sintetizó *in vitro*, utilizando un sistema de lisados de reticulocitos. Dicha proteína marcada se incubó con cantidades equivalentes de las proteínas de fusión GST y GST-CD5. Como muestra la figura IV.1.4, la proteína de fusión GST-CD5, que mantiene la mitad C-terminal (47 aa) de la región citoplasmática de CD5, une cantidades significantes de CKII β comparado con la proteína GST control (10 veces mayor). Esto confirma los resultados del *two-hybrid* en levaduras.

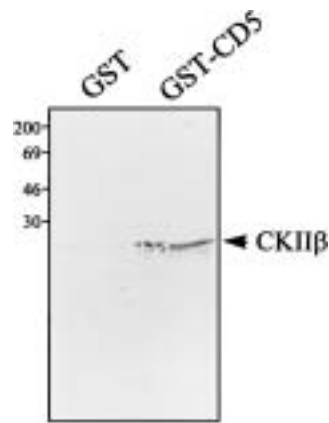


Figura IV.1.4 Co-precipitación de CKII β con CD5. La secuencia completa del dominio regulador de CKII (CKII β) se sintetizó *in vitro* y se marcó metabólicamente con ^{35}S . Posteriormente, se incubó con igual cantidad de proteína inmovilizada GST sola (GST) o GST fusionada a la mitad carboxiterminal de la región citoplasmática de CD5 (GST-CD5). La proteína unida se separó por SDS-PAGE al 12%, y el gel se secó y se autorradiografió.

1.3 La región C-terminal de CKII β interacciona con la región C-terminal de CD5

Con la intención de caracterizar la interacción entre CD5 y CKII β , investigamos las regiones de unión implicadas. Ensayos directos mediante la técnica del *two-hybrid* se realizaron utilizando construcciones de CD5 y CKII β mutados puntualmente o con deleciones (fig. IV.1.5). Ninguno de los mutantes por deleción de CKII β analizados (CKII β .R150^{stop} y CKII β .E73^{stop}) interaccionó con la cola citoplasmática de CD5 (fig. IV.1.5B), sugiriendo que la región más C-terminal de CKII β está implicada en la unión a CD5. La construcción completa de CKII β interaccionó fuertemente con el mutante CD5. Δ E418-L444, pero no con CD5.E418^{stop}, ni CD5.L444^{stop} (fig. IV.1.5A), indicando la relevancia de la región C-terminal de CD5 en la unión a CKII β . Para acotar más la zona de unión, analizamos otras construcciones. Con los mutantes CD5.H449^{stop} y CD5.S458^{stop} se obtuvo una significativa, pero incompleta, pérdida de la interacción (fig. IV.1.5A). Una débil interacción también se observó con CD5.S459A,S461G y CD5.S459A, Δ D460-L465 (fig. IV.1.5A). Por el contrario, la simple mutación de la única

tirosina en esta región (CD5.Y463A) no tuvo ningún efecto en la interacción (fig. IV.1.5A). Estos resultados indican que el extremo C-terminal desde la posición L448 hasta la L471, abarcando los sitios de fosforilación constitutiva, es esencial para la unión a CKII β , y que los sitios de fosforilación por CKII (S459 y S461) son ambos relevantes, pero no esenciales para la unión de CKII β con CD5.

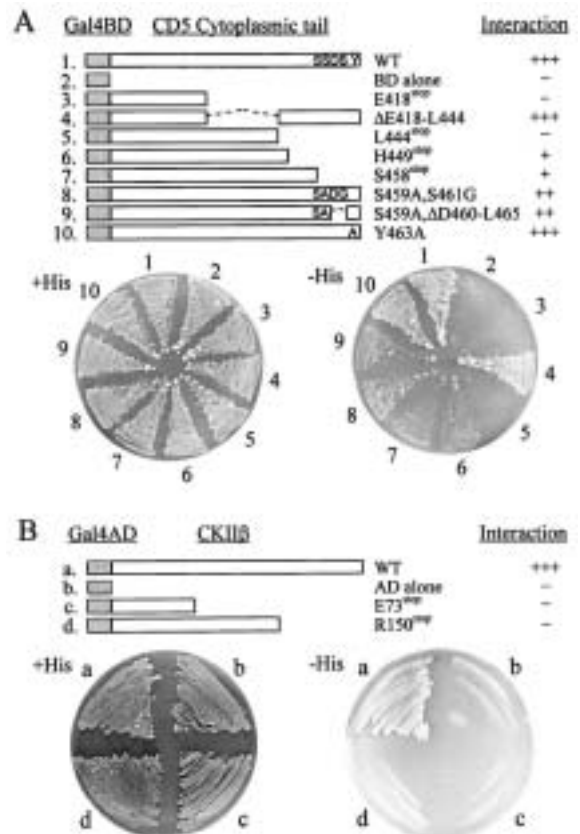


Figura IV.1.5. Localización de la zona de interacción de CKII β con la región citoplasmática de CD5. **(A)** Ensayos directos por *two-hybrid* de interacción entre la secuencia completa de CKII β fusionada al dominio de activación de GAL4 (AD) y diferentes construcciones mutadas de la región citoplasmática de CD5 fusionadas al dominio de unión al DNA de GAL4 (BD). **(B)** Ensayos directos por *two-hybrid* de interacción entre la secuencia completa de la región citoplasmática de CD5 fusionada a GAL4BD y diferentes mutantes por deleción de CKII β fusionados a GAL4AD. La activación relativa del gen testigo His es indicada por una escala cualitativa de crecimiento de la levadura (+++, fuerte; ++, intermedio; +, bajo; -, no-activación). El crecimiento de las levaduras co-transformadas en superficie de agarosa con (+His) o sin (-His) histidina se muestra debajo de cada panel.

2. FOSFORILACIÓN DE CD5 EN RESIDUOS TREONINA:

Papel de dos residuos treonina citoplasmáticos (T410 y T412) en la señalización de CD5

Resumen. Con el fin de localizar sitios de fosforilación en CD5 relevantes para su capacidad transductora de señales, generamos una serie de transfectantes Jurkat que expresaban moléculas de CD5 con deleciones y mutaciones puntuales en su región citoplasmática. El análisis de los mismos, utilizando PMA como estímulo, reveló la existencia de dos residuos treonina (T410 y T412) responsables de la fosforilación *in vivo* de CD5 por la serin/treonincinasa *protein kinase C*. Estudios funcionales demostraron que la integridad de T410 y T412 es crítica para la activación mediada por CD5 de la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC) y para la inhibición por ésteres de forbol de la internalización de CD5 mediada por anticuerpo. Estos resultados argumentan en favor del papel de T410 y T412 en la señalización intracelular de CD5.

Role of Two Conserved Cytoplasmic Threonine Residues (T410 and T412) in CD5 Signaling¹

Josep M. Vilà,* Javier Calvo,^{2*} Lourdes Places,* Olga Padilla,* Mònica Arman,* Idoia Gimferrer,* Claude Aussel,[†] Jordi Vives,* and Francisco Lozano^{3*}

CD5 is a transmembrane coreceptor that modulates activation and differentiation signals mediated by the Ag-specific receptor present on both T and B1a lymphocytes. CD5 lacks intrinsic catalytic activity, and its immunomodulatory properties result from intracellular interactions mediated by the CD5 cytoplasmic tail. The nature of these interactions is currently a matter of investigation. Here, we present a selective mutagenesis analysis of two conserved threonine residues (T410 and T412) located at the membrane-proximal cytoplasmic region of CD5. These residues are contained within consensus phosphorylation motifs for protein kinase C and are shown here to be critical for *in vivo* protein kinase C-mediated phosphorylation of CD5. Functional studies revealed that the integrity of T410 and T412 is also critical for CD5-mediated phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) activation and phorbol ester-mediated inhibition of Ab-induced internalization of CD5. These results strongly argue in favor of a role for T410 and T412 in the signaling mediated by CD5. *The Journal of Immunology*, 2001, 166: 396–402.

Human CD5 is a 67-kDa type-I transmembrane glycoprotein expressed on thymocytes, mature peripheral T cells, and a subpopulation of B cells (B1a) (1, 2). Structurally, it belongs to the family of receptors bearing extracellular domains of the scavenger receptor cysteine-rich type (3, 4). CD5 is physically associated with the Ag-receptor complex present on both T (TCR/CD3) and B1a (B cell receptor (BCR)⁴) cells (5–7), and it promotes the association of TCR/CD3 with rafts (8). The physiological function of CD5 in lymphocytes remains unclear. There is current agreement that CD5 behaves as a dual receptor by modulating either positively or negatively the activation and differentiation signals mediated by the Ag-specific receptor complex (2). The type of modulatory signal depends on the cell type and the maturation stage. On peripheral T lymphocytes, CD5 acts as a costimulatory molecule by sustaining TCR/CD3-mediated proliferative responses (9–11). Contrary to this, recent studies of CD5^{-/-} mice show that CD5 negatively regulates Ag-receptor complex-mediated signals in thymocytes and B1a cells (12, 13). It has been proposed that the Src homology 2 domain-bearing protein tyrosine phosphatase-1 (14, 15), the proto-oncoprotein c-cbl (16),

or casein kinase II (CKII) (17) are key elements for the negative regulation of TCR/CD3 and BCR signaling by CD5. However, the CD5 signaling pathway and the molecular basis for its ability to modulate TCR/CD3 and BCR signals are not completely understood.

CD5 is an accessory molecule with its own signaling pathway (18–21) but its dependency on the TCR/CD3 complex has also been reported (22–24). Mitogenic anti-CD5 mAbs activate protein kinase C (PKC) in the absence of intracellular Ca²⁺ mobilization and phosphoinositide turnover (19). This activation is achieved through diacylglycerol (DAG) release after phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) activation and *de novo* phospholipid synthesis (21). PC-PLC-generated DAG can in turn mediate the activation of acidic sphingomyelinase (A-SMase) (25). Other signaling elements involved in the CD5 pathway include the Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase type IV (CaMK IV) (26), the phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) (27), the guanine exchange factor Vav (27), the small Ras-related GTPase Rac 1 (27), PKC- ζ (25), mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) (25), and c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) (25).

The cytoplasmic tail of CD5 is highly conserved and lacks intrinsic catalytic activity. It contains potential targets of intracellular protein kinases and sites of interaction with signaling mediators. In this respect, the association of the CD5 cytoplasmic tail has been shown for p56^{ck} (28), Src homology 2 domain-bearing protein tyrosine phosphatase-1 (15), CKII (29, 30), ras GTPase-activating protein (ras GAP) (16), p116^{cbl} (16), Tctex-1 (31), CaMK II δ (31), PI 3-K (32), and an as yet uncharacterized inducible kinase (33). CD5 is constitutively phosphorylated by CKII at a cluster of three C-terminal serine residues (S458, S459, and S461) (29) and undergoes rapid hyperphosphorylation on serine, threonine, and/or tyrosine residues following cell stimulation by phorbol esters (34), anti-CD3, or anti-CD5 mAbs (33, 35). The exact nature of both the kinases and the residues involved in the inducible hyperphosphorylation of CD5 remains to be fully deciphered. Previous data indicate that CD5 is hyperphosphorylated by the protein tyrosine kinases p59^{fyn} (24), p56^{ck} (24, 28), and ZAP-70 (36), and by the protein serine/threonine kinases PKC (37) and CKII (17). The relevance of the membrane-proximal region of the CD5 cytoplasmic tail for CaMK II δ association and PKC targeting has been shown

*Servei d'Immunologia, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic, Barcelona, Spain; and [†]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 343, Hôpital de l'Archet, Nice, France

Received for publication July 21, 2000. Accepted for publication September 28, 2000.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF 98/045). J.M.V., O.P., and M.A. are recipients of fellowships from Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (330017), Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (1998FI/839), and Ministerio de Educación y Cultura (PN98/46729827), respectively.

² Current address: Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears, Mallorca, Spain.

³ Address correspondence and reprint requests to Dr. Francisco Lozano, Servei d'Immunologia, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail address: lozano@medicina.ub.es

⁴ Abbreviations used in this paper: BCR, B cell receptor; CKII, casein kinase II; A-SMase, acidic sphingomyelinase; CaMK, Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; DAG, 1,2-diacylglycerol; GF109203X, bisindolylmaleimide I; MFI, mean fluorescence intensity; PC-PLC, phosphatidylcholine-specific phospholipase C; PI 3-K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKC, protein kinase C; WT, wild type.

(29, 31). Here we demonstrate that two threonine residues (T410 and T412) within this region are critical for PKC-mediated CD5 hyperphosphorylation *in vivo*. Furthermore, we show that substitution of T410 and T412 by alanine residues blocks the CD5-mediated DAG release as well as the inhibitory effects of phorbol esters on the Ab-induced internalization of CD5. This demonstrates that residues T410 and T412 are critical in lipid second-messenger generation and cytoskeletal interactions.

Materials and Methods

Chemicals and Abs

PMA and bisindolylmaleimide I (GF109203X) were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). Purified rat brain PKC (mixture of α , β , and γ isoforms) and human CKII (recombinant Sf9 cell product) enzymes were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Staurosporine and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). The mouse anti-CD5 mAb Cris-1 (IgG2a) was produced in our laboratory by R. Vilella using PBMC as immunizing cells. Rabbit polyclonal antisera against the extracellular and the intracytoplasmic regions of human CD5 were produced in our laboratory as previously described (38, 39).

Construction and expression of wild-type (WT) and cytoplasmic tail-mutant CD5 molecules

The constructs coding for WT, H449^{STOP}, E418^{STOP}, and K384^{STOP} CD5 molecules were generated and cloned into the pH β APr-1-*neo* expression vector as previously reported (21, 29). The T410A-T412A and E418^{STOP}/T410A-T412A constructions were similarly cloned and obtained by introducing T410 \rightarrow A or T412 \rightarrow A substitutions by inverse PCR mutagenesis with the sense/antisense oligonucleotide pairs 5'-CAACCGTCCGATCCATGCT-3'/5'-CGGCGTGGTTGCGATGGAAAGACA-3' and 5'-CAGCCGTCCGATCCATGCT-3'/5'-CGGTGTGGTTGCGATGGAAAGACA-3', respectively. All oligonucleotide-directed changes were checked by double-stranded DNA sequencing (ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit; PE Applied Biosystems, Warrington, U.K.). Plasmid constructions were purified by cesium-chloride density gradients. The constructions were stably expressed in the CD5-deficient 2G5 Jurkat subclone by cell electroporation and selection for CD5 surface expression of neomycin-resistant cell clones (21).

Metabolic ³²P labeling and PMA stimulation of CD5 transfectants

Cell labeling with [³²P]orthophosphate was performed as previously reported (37). Briefly, cell transfectants were washed with phosphate-free medium (20 mM HEPES, pH 7.2, 10 mM dextrose, 1 mM CaCl₂ · 2H₂O, 5 mM KCl, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ · 6H₂O, 1 mM MgSO₄ · 7H₂O, 20 mM NaHCO₃, 10% dialyzed FCS) and resuspended to a final density of 1 × 10⁷ cells/ml. The cell suspension was then divided into equal aliquots of 1 ml in a six-well plate (1 × 10⁷ cells/well). Cells were preincubated for 30 min at 37°C and labeled with 0.5 mCi of [³²P]orthophosphate for 3 h at 37°C. For phorbol ester stimulation, 100 ng/ml of PMA were added 30 min before the end of the ³²P-labeling period. When needed, PKC-inhibitors GF109203X (5 μ M) and staurosporine (250 nM) were added just prior stimulation with PMA. The radiolabeling was stopped by washing the cells with ice-cold PBS.

Immunoprecipitation and Western blot analysis

Immunoprecipitation was performed as previously described (37). Briefly, cells were disrupted with lysis buffer (1% Nonidet P-40, 10 mM Tris pH 7.6, 140 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM EDTA, 0.4 mM sodium orthovanadate, 10 mM iodoacetamide, 5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin A, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml chymostatin, and 1 μ g/ml α -1-antitrypsin) for 15 min on ice, and the insoluble fraction was discarded after 15 min of microcentrifugation at 4°C. The lysates were precleared with protein A-Sepharose and then immunoprecipitated with 1 μ g/ml Cris-1 mAb plus Protein A-Sepharose for 1–2 h at 4°C. Beads were washed twice with lysis buffer, twice with lysis buffer plus 0.5 M NaCl, twice with lysis buffer plus 0.1% SDS, and twice with lysis buffer. Bound immune complexes were denatured by boiling in 2× reducing sample buffer and subjected to SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Richmond, CA), which were next blocked for 30 min at 37°C with 5% nonfat dry milk powder in wash solution (PBS plus 0.1% Tween 20). Membranes were incubated at room temperature for 30 min with anti-CD5 polyclonal antiserum and, after ex-

tensive washing with wash solution, incubated at room temperature for 15 min with 1:800 peroxidase-conjugated protein G (Sigma). Colorimetric detection was performed by using DAB and H₂O₂ as peroxidase substrates.

In vitro PKC and CKII assays

For direct *in vitro* protein kinase assays, CD5 immunoprecipitates from 10 × 10⁶ cells were suspended with 25 μ l of a kinase buffer containing 20 mM MOPS, pH 7.2, 25 mM β -glycerol phosphate, 5 mM EGTA, 1 mM sodium vanadate, 1 mM DTT, 1 mM CaCl₂, 15 mM MgCl₂, 100 μ M ATP, 2.5 μ Ci [γ -³²P]ATP (Nuclear Iberica, Madrid, Spain). The *in vitro* kinase assays were conducted at 30°C for 10 min in the presence of purified PKC (10 ng) or CKII (50 ng) enzymes, with and without PKC lipid activators (25 μ g phosphatidylserine and 0.25 μ g diglyceride, respectively). The reaction was stopped by adding 500 μ l of lysis buffer. Beads were washed twice with lysis buffer and suspended in 30 μ l of 2× reducing sample buffer. Samples were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. ³²P incorporation was detected by autoradiography of the membranes.

CD5 modulation assays

Monoclonal Ab-induced modulation and immunofluorescence assays were performed as previously reported (40). Cell transfectants were suspended for 30 min at 4°C in 100 μ l of culture medium (RPMI 1640 plus 10% FCS) containing saturating amounts of Cris-1 mAb (1–10 μ g/10⁶ cells). After three washes with ice-cold PBS, cells were adjusted to 1 × 10⁶ cells/ml with culture medium, distributed in a 24-well plate (1 ml/well), and incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere in the presence or absence of 100 ng/ml PMA. At the indicated times (0, 3, and 6 h), 200 μ l of cell cultures were collected and washed in cold washing solution (PBS pH 7.2 containing 2% FCS and 0.1% sodium azide). Next, cells were stained for 30 min with 100 μ l of a 1:100 dilution of FITC-conjugated anti-mouse polyvalent Igs (Sigma). Cells were washed, fixed in washing solution containing 0.3% formaldehyde, and subjected to flow cytometry analysis in a FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Mean fluorescence intensity (MFI) was recorded and used in the calculation of percentage of anti-CD5 binding: (MFI of treated cells)/(MFI of untreated cells) × 100%.

TLC analysis of membrane lipids

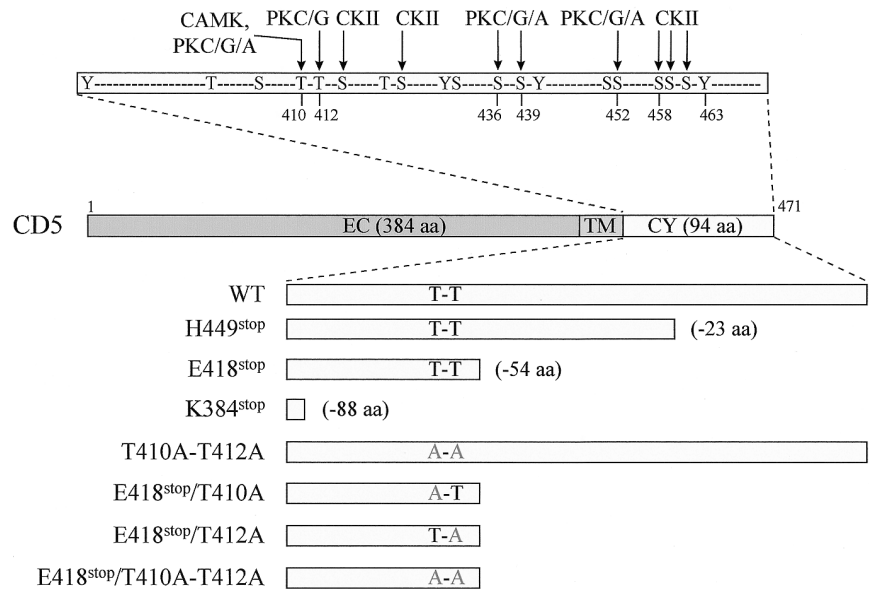
The analysis of DAG production was performed as previously described (21). Briefly, Jurkat cells were isotopically labeled by overnight incubation with [³H]palmitic acid and then stimulated for the indicated times (0, 1, 2, 5, and 10 min). Lipids were extracted from the cell pellets, and DAG was separated from triglycerides, cholesterol esters, and phospholipids on silica gel plates. Radioactive measurements were performed on an automatic linear thin layer radiochromatography scanner.

Results

PKC-dependent phosphorylation of CD5 involves the membrane-proximal region

Protein phosphorylation plays a key role in the regulation of both enzymatic activity and protein-protein interactions. The relevance of constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues (S458, S459, and S461) on the signaling function of human CD5 has been recently reported (29). However, the residues responsible for the inducible phosphorylation of CD5 had not been determined to date. We have analyzed the phosphorylation levels of a series of CD5 cytoplasmic tail mutants (Fig. 1) following cell stimulation with the potent PKC activator PMA, a CD5 hyperphosphorylation inducer (34, 37). All the constructions were stably expressed on a previously reported CD5-deficient 2G5 Jurkat T cell subclone (21). Metabolically ³²P-labeled 2G5 cell transfectants were incubated with or without PMA (100 ng/ml) for 30 min, and then CD5 molecules were immunoprecipitated from detergent-soluble cell fractions. Immune complexes were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and autoradiographed to show relative phosphorylation levels. Membranes were probed with a rabbit anti-CD5 polyclonal antiserum as a loading control. As shown in Fig. 2A, the analysis of WT and mutant human CD5 molecules lacking either 23 aa (H449^{STOP}), 54 aa (E418^{STOP}), or 88 aa (K384^{STOP})

FIGURE 1. Schematic representation of WT and cytoplasmic tail-mutant CD5 molecules. CD5 mutants carrying cytoplasmic tail truncations (H449^{stop}, E418^{stop}, and K384^{stop}) are named according to the position of the amino acid where a premature stop codon was introduced in the WT sequence. Mutants carrying amino acid substitutions (T410A-T412A, E418^{stop}/T410A, E418^{stop}/T412A, E418^{stop}/T410A-T412A) are named after the inserted amino acid. The position of serine, threonine, and tyrosine residues in the cytoplasmic amino acid sequence of CD5 is shown at the top. The residue position in the phosphorylation consensus motifs for different protein kinases (41) are indicated by arrows and labeled as follows: CaMK/PKC/G/A (R-[X]₂-S/T), PKC/G (S/T-X-R/K), PKC/G/A (R-X-S), CKII (S/T-[X]₂-D/E, or S-[X]₂-S(P)). One-letter codes are used for amino acids, with X denoting any amino acid. EC, Extracellular; CY, cytoplasmic; TM, transmembrane. The numbering refers to the amino acid position in the mature protein.



cytoplasmic residues (Fig. 1) confirmed a major constitutive phosphorylation site at the C terminus of CD5 (29) and revealed PMA-inducible phosphorylation sites elsewhere. The most membrane-proximal CD5 cytoplasmic region (from K384 to E418) was the shortest region to undergo PMA-induced phosphorylation (Fig. 2A). This region encompasses two serines and three threonines, of which only two (T410 and T412) are within PKC phosphorylation consensus (41) (Fig. 1). Results in Fig. 2B show the successful inhibition of the PMA-induced phosphorylation of WT, H449^{stop}, and E418^{stop} molecules by the potent PKC inhibitor GF109203X. Similar results were obtained by using the PKC inhibitor staurosporine (data not shown). These observations involve PKC in the PMA-induced phosphorylation of the membrane-proximal CD5 cytoplasmic region.

Residues T410 and T412 are phosphorylated *in vitro* by PKC

To explore whether the membrane-proximal region is a direct substrate of PKC, we conducted *in vitro* kinase assays with purified enzyme preparations. In these experiments, CD5 immunoprecipitates from cell transfectants expressing WT and mutant CD5 molecules were incubated with purified PKC or CKII in the presence of [γ -³²P]ATP. The resulting products were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and autoradiographed. Fig. 3A shows that both WT and truncated CD5 molecules (H449^{stop} and E418^{stop}) can be phosphorylated *in vitro* by PKC. This is in agreement with the presence of consensus PKC phosphorylation sites on the most membrane-proximal cytoplasmic region of CD5 (Fig. 1). The lack of CKII phosphorylation of H449^{stop} and E418^{stop} indicates that the C-terminal region of CD5 is the only CKII substrate. It seems that residues S415 and S423, which are within CKII phosphorylation consensus motifs (Fig. 1), are not accessible residues to CKII-mediated phosphorylation.

To further narrow the region responsible for PKC phosphorylation we analyzed a series of CD5 mutants carrying either single or double amino acid substitutions (T410→A, T412→A) central to the two PKC motifs (Fig. 1). CD5 immunoprecipitates from cell transfectants expressing E418^{stop}/T410A, E418^{stop}/T412A, and E418^{stop}/T410A-T412A were subjected to direct *in vitro* PKC phosphorylation. As shown in Fig. 3B, either of the two single amino acid substitutions (T410→A or T412→A) enable only partial phosphorylation of the membrane-proximal cytoplasmic re-

gion. The phosphorylation of this region was completely abolished in the mutant carrying double amino acid substitutions (Fig. 3B). These results indicate that both T410 and T412 are the only PKC targets within the membrane-proximal region of CD5.

T410A and T412A substitutions completely abrogate *in vivo* PMA-induced phosphorylation of full-length CD5 molecules

The sequence analysis of the CD5 cytoplasmic tail reveals three additional putative PKC phosphorylation motifs at S436, S439, and S452 (Fig. 1). Their contribution on PMA-induced phosphorylation was explored *in vivo* on cell transfectants expressing full-length and truncated molecules carrying double T410→A and T412→A substitutions (T410A-T412A, and E418^{stop}/T410A-T412A, respectively) (Fig. 1). As shown in Fig. 4, the introduction of double T410→A and T412→A substitutions completely abrogated the inducible hyperphosphorylation of both full-length and truncated CD5 molecules. These results parallel those obtained with PKC inhibitors (see Fig. 2B). This demonstrates that T410 and T412 are critical for *in vivo* PMA-induced phosphorylation in addition to good *in vitro* PKC substrates. Interestingly, the mutant T410A-T412A molecules are efficiently phosphorylated in direct *in vitro* PKC assays (data not shown). These apparently conflicting *in vivo* and *in vitro* results indicate either that S436, S439, and S452 are not targets of PKC-dependent PMA-induced phosphorylation *in vivo* or that T410 and T412 phosphorylation must precede that of the serines.

T410 and T412 are relevant to CD5-mediated DAG release

CD5 signaling involves hydrolysis of PC to DAG and phosphocholine by activation of PC-PLC (21). Therefore, we explored the contribution of T410 and T412 to CD5 signaling by analyzing the generation of DAG on cell transfectants expressing WT or T410A-T412A molecules. We used three independent stable clones (21, 25, and 29) expressing T410A-T412A and CD3 molecules at surface levels similar to those of the WT transfectant (data not shown). As seen in Fig. 5, cell stimulation with the anti-CD5 Cris-1 mAb do not induce significant DAG release in any of the T410A-T412A transfectant clones analyzed. Positive CD3 expression of these clones excluded CD3 deficiency as a possible cause. Stimulation of WT transfectants resulted in rapid and transient

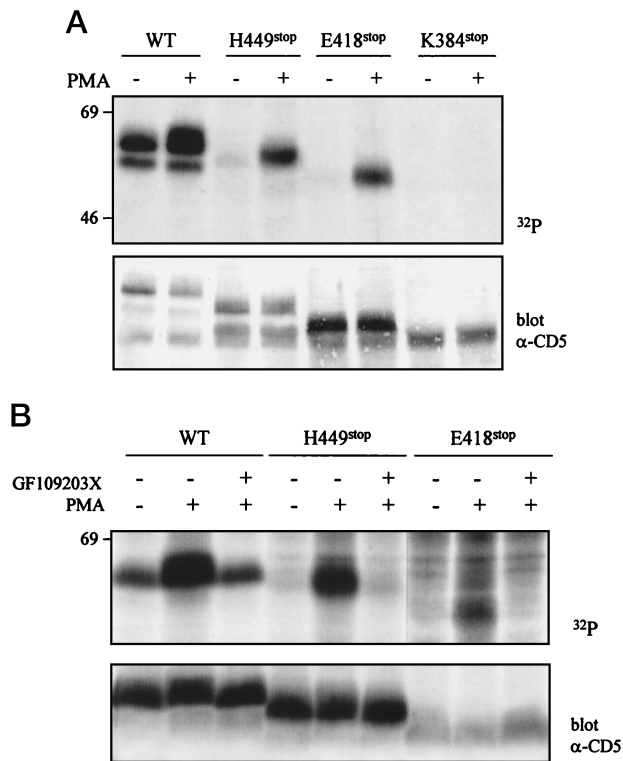


FIGURE 2. In vivo phosphorylation analysis of mutant CD5 molecules. *A*, Equivalent cell samples of ³²P-labeled 2G5 transfectants expressing WT and cytoplasmic tail-truncated (H449^{stop}, E418^{stop}, and K384^{stop}) CD5 molecules were stimulated for 30 min in the presence (+) or absence (-) of 100 ng/ml PMA. Detergent-soluble cell lysates were subjected to CD5 immunoprecipitation with Cris-1 mAb adsorbed to protein A-Sepharose beads. Immune complexes were resolved by 8% SDS/PAGE and transferred to nitrocellulose. The filter was autoradiographed (*top*) and developed with anti-CD5 polyclonal Ab plus peroxidase-labeled protein G and a DAB/metal solution (*bottom*). *B*, Effect of the PKC inhibitor GF109203X on the PMA-induced phosphorylation of CD5 molecules. ³²P-labeled 2G5 transfectants (WT, H449^{stop}, and E418^{stop}) were preincubated for 30 min in the presence (+) or absence (-) of 5 μ M GF109203X immediately before the 30-min PMA stimulation. CD5 was immunoprecipitated from cell lysates and analyzed as above.

DAG production, as previously reported (21). These results indicate that the membrane-proximal residues T410 and T412 are required for early biochemical events induced by ligation of the CD5 receptor, such as lipid second messenger generation.

T410 and T412 are potential regulatory sites of mAb-induced CD5 internalization

Ab-induced internalization of CD5 is regulated by mechanisms involving actin microfilament polymerization and PKC activation (40, 42). Given that T410 and T412 are PKC phosphorylated we investigated their involvement on the PMA-mediated inhibition of CD5 modulation. WT or mutant CD5 cell transfectants were incubated at 4°C with saturating concentrations of anti-CD5 mAb, washed, and then left at 37°C for different periods of time, either in the presence or absence of PMA. A secondary FITC-conjugated anti-mouse serum was used to monitor mAb-bound CD5 levels at each time point (0, 3, and 6 h). As shown in Fig. 6, PMA inhibited mAb-induced CD5 modulation of transfectants expressing WT and cytoplasmic tail truncated CD5 molecules lacking 23 aa (H449^{stop}) and 54 aa (E418^{stop}) from its C terminus. PMA had no inhibitory effects on the modulation of "almost tailless" CD5 molecules (K384^{stop}) (Fig. 6). These results confirmed the membrane-proxi-

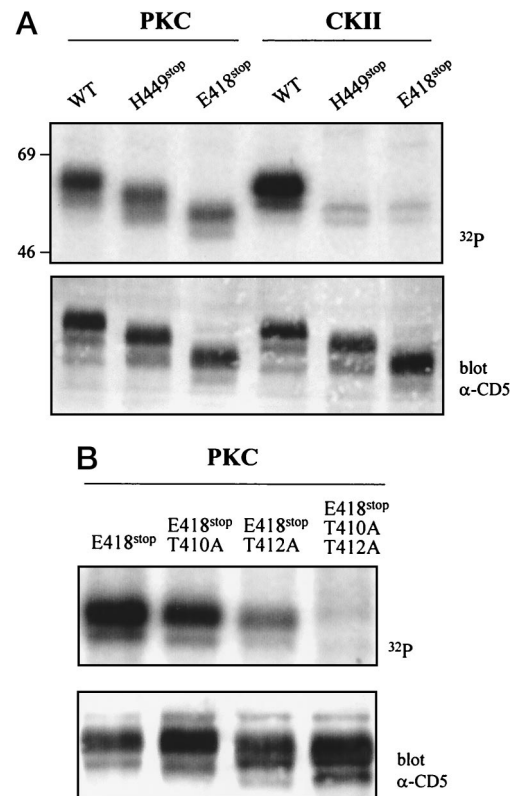


FIGURE 3. In vitro PKC and CKII assays of CD5 molecules. *A*, The membrane-proximal and the C-terminal regions of CD5 are targets of in vitro PKC- and CKII-mediated phosphorylation, respectively. CD5 immunoprecipitates from WT or cytoplasmic tail-truncated (H449^{stop} and E418^{stop}) CD5 transfectants were assayed in vitro for phosphorylation with purified PKC and CKII for 10 min at 30°C under conditions described in *Materials and Methods*. The resulting products were resolved by 8% SDS/PAGE and transferred to nitrocellulose. The filters were autoradiographed (*top*) and subjected to Western blot analysis with an anti-CD5 rabbit polyclonal serum (*bottom*). *B*, Residues T410 and T412 are substrates of in vitro PKC-mediated phosphorylation. CD5 immunoprecipitates from cytoplasmic tail-truncated CD5 transfectants (E418^{stop}) carrying either single (E418^{stop}/T410A, E418^{stop}/T412A) or double (E418^{stop}/T410A-T412A) threonine to alanine substitutions were assayed in vitro for phosphorylation with purified PKC and analyzed as above.

mal cytoplasmic segment as a regulatory region for CD5 internalization. Our results also describe the first nine cytoplasmic residues (K384^{stop}) as sufficient for mAb-induced internalization of CD5. Interestingly, this region contains a tyrosine-based motif (Y³⁷⁸XXL) that has been involved in endocytosis and sorting of some membrane receptors (43–45).

Proof of T410 and T412 as regulatory sites for mAb-induced CD5 down-modulation came from the analysis of E418^{stop}/T410A-T412A molecules. As shown in Fig. 6, the introduction of T410→A and T412→A substitutions rendered the CD5.E418^{stop} molecule insensitive to the inhibitory effects of PMA on CD5 down-modulation. This indicates that the cytoskeleton reorganization induced by PMA interferes with CD5 down-modulation through residues T410 and T412 at the CD5 cytoplasmic tail.

Discussion

Lymphocyte activation is controlled by symbiotic interactions between the cytoskeleton and signaling pathways initiated by Ag receptors and costimulatory molecules (46). One such molecule is CD5, which has its own signaling pathway and modulates the activation and differentiation signals mediated by the Ag-specific receptor complex (2). The molecular basis of the immunomodulatory

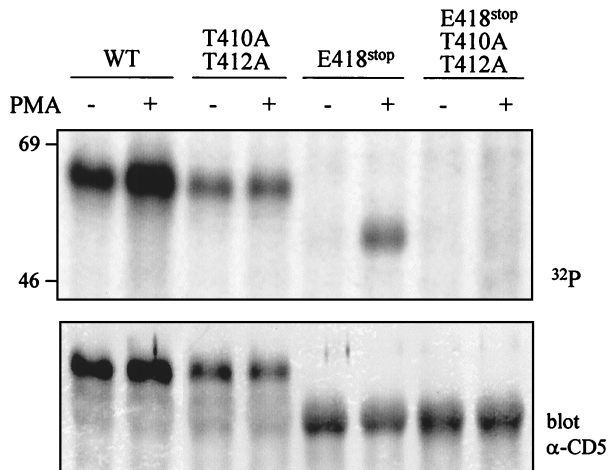


FIGURE 4. In vivo PMA-induced phosphorylation of CD5 is abolished by T410→A and T412→A double substitutions. Equivalent cell samples of ³²P-labeled 2G5 unmutated or doubly mutated full-length (WT and T410A-T412A, respectively) and cytoplasmic tail-truncated (E418^{stop} and E418^{stop}/T410A-T412A, respectively) CD5 transfectants were stimulated for 30 min in the presence (+) or absence (-) of 100 ng/ml PMA. Detergent-soluble cell lysates were subjected to CD5 immunoprecipitation with Cris-1 mAb adsorbed to protein A-Sepharose beads. Immune complexes were resolved by 8% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. The filter was autoradiographed (*top*) and developed with anti-CD5 polyclonal Ab plus peroxidase-labeled protein G and a DAB/metal solution (*bottom*).

properties of CD5 remains ill defined. The present work illustrates the functional relevance of the membrane-proximal cytoplasmic region of CD5, particularly residues T410 and T412, in intracellular signaling. Our results show that the integrity of these two residues is critical in at least three CD5-related signaling events: PKC-dependent hyperphosphorylation, lipid second messenger generation, and cytoskeletal interactions.

The whole cytoplasmic domain of CD5 is evolutionarily highly conserved among mammalian species (78% aa sequence homology), and this is specially true for its membrane-proximal region (82%). The functional relevance of this region is further supported by the recent identification of two intracellular proteins, namely, Tctex-1 and CaMK II δ (31), which interact with a 33-aa peptide region containing T410 and T412. Tctex-1 is a dynein motor complex component (47), and CaMK II δ is a serine/threonine kinase involved in IL-2 down-regulation (48), implying a role in CD5 internalization and negative signaling, respectively. Should these interactions be confirmed experimentally, it would be interesting to explore the role of the two threonines in the binding to Tctex-1 and CaMK II δ (31). Indeed, T410 is itself in a CaMK II consensus phosphorylation site (Fig. 1).

The PKC family of serine-threonine kinases are important signal transducers participating in many different agonist-induced signaling cascades (46, 49). One such cascade is that induced by Ag receptor triggering (50). Most PKC isoforms are activated by DAG increases upon translocation to the plasma membrane, where they modify various cell functions through phosphorylation of target substrates (49). The association with, and/or phosphorylation of, a wide range of cytoskeletal components has supported the idea that PKC is an important regulator of cytoskeletal function (49). Previous reports have shown that CD5 is a good PKC substrate (34, 37, 51) and that PKC-dependent mechanisms regulate CD5 internalization (40, 42). Here we have mapped these events to T410 and T412. Interestingly, the fact that double T410A and T412A substitutions completely abolish in vivo PMA-induced phosphoryla-

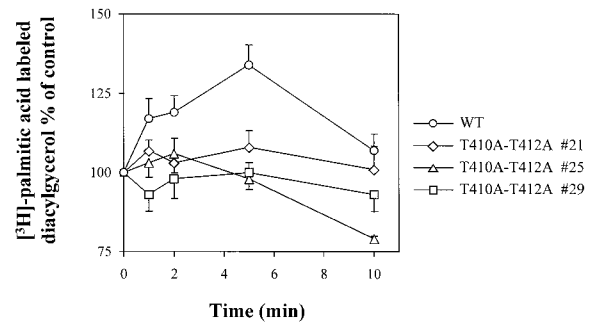


FIGURE 5. Relevance of T410 and T412 in CD5-mediated DAG release. [³H]Palmitic acid-labeled Jurkat 2G5 cell unmutated or doubly mutated full-length CD5 transfectants (WT and T410A-T412A, respectively) were stimulated with 10 μ g/ml of the anti-CD5 Cris-1 mAb for the indicated times. Following cell extraction, phospholipids were analyzed by TLC, and the radioactivity incorporated into DAG was analyzed. Values are expressed as percent change from unstimulated control cells. Each point is the mean \pm SD of triplicate determinations.

tion suggests that T410 and T412 are the only PKC substrates in vivo. This would mean that other serine residues present in PKC consensus motifs are not functional (Fig. 1). However, mutant CD5 molecules containing double threonine substitutions (T410A-T412A) are efficiently phosphorylated in vitro by PKC (data not shown). The latter is in agreement with reported serine phosphorylation following PMA stimulation by phosphoamino acid analyses (37, 51). Therefore, the possibility exists that early phosphorylation of T410 and T412 could induce conformational changes on CD5, making serine residues accessible to PKC phosphorylation. In fact, phosphorylation-dependent changes in the electrophoretic mobility of CD5 appear following PMA stimulation (37).

We previously reported that CD5 triggering activates signaling including the generation of lipid second messengers, namely DAG and ceramide (21, 25). This is achieved through the coordinated activation of PC-PLC and A-SMase, respectively (21, 25). In this work, we show that T410→A and T412→A double substitution prevents CD5-mediated DAG release. Similar deleterious effects on DAG production have been reported for CD5 mutants carrying alanine substitutions at the C-terminal S459 and S461 residues (29). Contrary to this, an alanine substitution of the C-terminal Y463 was neutral to PC-PLC activation (29). Therefore, the integrity of residues responsible for the constitutive (S458, S459, and S461) and the inducible (T410 and T412) phosphorylation of CD5 is necessary for CD5-mediated lipid second messenger generation. This indicates that phosphorylation-related events may play an important role in coupling CD5 to the PC-PLC/A-SMase signaling pathway. Additionally, binding of Tctex-1 to CD5 may also assist in this pathway. A-SMase hydrolyzes sphingomyelin exclusively in acidic environments such as the endo/lysosomal compartment. Thus, attachment to the dynein complex through Tctex-1 may result in the rapid intracellular transport of CD5-containing vesicles to lysosomes.

In addition to Tctex-1 binding, current evidence for the interaction between CD5 and the cytoskeleton is only indirect. First, CD5 resides, at least in part, in the detergent-insoluble glycolipid-enriched/raft membrane fraction, and its coligation with CD3 enhances the association of the Ag receptor with rafts (8). Rafts serve as platforms for signal transduction and membrane trafficking as they are enriched in signal transduction molecules, actin, and actin-binding proteins (52). Second, signaling through CD5 activates a pathway involving PI 3-K, vav, and Rac1 (27). The products of

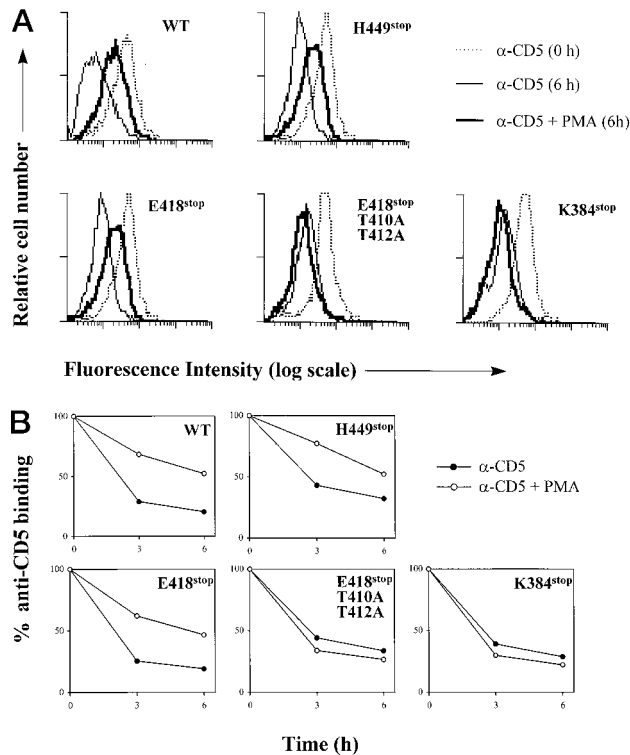


FIGURE 6. Effect of PMA on the Ab-induced down-modulation of CD5 molecules. Jurkat 2G5 WT or cytoplasmic tail-mutant (H449^{stop}, E418^{stop}, E418^{stop}/T410A-T412A, and K384^{stop}) CD5 transfectants were incubated in ice with saturating amounts of the anti-CD5 Cris-1 mAb. After removing excess mAb, cells were left at 37°C in the presence or absence of PMA (100 ng/ml). At the indicated times, cells were stained with FITC-labeled anti-mouse Ig and analyzed by flow cytometry. *A*, Fluorescence histograms showing CD5 cell surface expression following a 6-h incubation with anti-CD5 mAb, either alone (thin solid line) or in the presence of PMA (thick solid line). The dotted line represents basal CD5 surface expression. *B*, Time course experiments on anti-CD5 Ab-modulated cell transfectants. The MFI was determined by flow cytometry analysis and used to calculate the percentage of anti-CD5 binding as described in *Materials and Methods*. The experiment shown is representative of three performed.

PI 3-K, together with tyrosine phosphorylation, activate vav, resulting in activation of Rho family GTPases such as Rac1, Rho, and Cdc42 (46). These GTPases control the dynamic organization of the actin cytoskeleton (46). Third, cytoskeleton associations exist between some leukocyte surface Ags after specific ligand binding or cross-linking by bivalent Abs (53). Accordingly, Ab-induced CD5 internalization does not proceed in the presence of agents interfering with formation of clathrin-coated pits (our unpublished results) and of agents interfering with correct actin microfilament polymerization (cytochalasin D and phorbol esters) (40, 42). A similar situation applies for the Ab-induced internalization of CD2 (40). Here we show that T410A and T412A substitutions reverse the inhibitory effects of the potent PKC activator PMA on CD5 internalization. Hence, these residues are strong candidates for PKC-dependent cytoskeletal interactions, which modulate CD5 internalization efficiency. Enabling controlled regulation of the internalization of costimulatory molecules such as CD2 and CD5 may well be biologically important. The existence of regulated receptor internalization leading to enhanced adhesion and/or signal transduction of activated cells could underlie an amplification mechanism in lymphocyte activation.

Acknowledgments

We thank M. Isamat, M. Simarro, and J. Alberola-Ila for critical review of the manuscript.

References

- Hardy, R. R., and K. Hayakawa. 1994. CD5 B cells, a fetal B-cell lineage. *Adv. Immunol.* 55:297.
- Lozano, F., M. Simarro, J. Calvo, J. M. Vilà, O. Padilla, M. J. Bowen, and K. S. Campbell. 2000. CD5 signal transduction: positive or negative modulation of antigen receptor signalling. *Crit. Rev. Immunol.* 20:347.
- Resnick, D., A. Pearson, and M. Krieger. 1994. The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 19:5.
- 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.
- 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. USA* 89:2945.
- 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.
- Lankester, A. C., G. M. van Schijndel, J. L. Cordell, C. J. M. van Noesel, and R. A. van Lier. 1994. CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. *Eur. J. Immunol.* 24:812.
- 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.
- 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.
- 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.
- Imboden, J. B., C. H. June, M. A. McCutcheon, and J. A. Ledbetter. 1990. Stimulation of CD5 enhances signal transduction by the T cell antigen receptor. *J. Clin. Invest.* 85:130.
- Tarakhovskiy, A., S. B. Kanner, J. Hombach, J. A. Ledbetter, W. Müller, N. Killeen, and K. Rajewsky. 1995. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* 269:535.
- Bikah, G., J. Carey, J. R. Ciallella, A. Tarakhovskiy, and S. Bondada. 1996. CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science* 274:1906.
- Pani, G., K. D. Fischer, Y. Mlinaric-Rascan, and K. A. Siminovich. 1996. Signaling capacity of the T cell antigen receptor is negatively regulated by the PTP1C tyrosine phosphatase. *J. Exp. Med.* 184:839.
- Pérez-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.
- Dennehy, K. M., R. Broszeit, W. F. Ferris, and A. D. Beyers. 1998. Thymocyte activation induces the association of the proto-oncoprotein c-Cbl and Ras GTPase-activating protein with CD5. *Eur. J. Immunol.* 28:1617.
- Raman, C., and R. P. Kimberly. 1998. Differential CD5-dependent regulation of CD5-associated CK2 activity in mature and immature T cells: implication on TCR/CD3-mediated activation. *J. Immunol.* 161:5817.
- Vandenbergh, 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.
- 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.
- Verwilghen, J., P. Vandenbergh, 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.
- 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.
- June, C. H., P. S. Rabinovich, and J. A. Ledbetter. 1987. CD5 antibodies increase intracellular ionized calcium concentration in T cells. *J. Immunol.* 138:2782.
- 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.
- Burgess, K. E., M. Yamamoto, K. V. S. Prasad, and C. E. Rudd. 1992. CD5 acts as a tyrosine kinase substrate within a receptor comprising T-cell receptor ζ chain/CD3 and protein-tyrosine kinases p56^{lck} and p59^{lyn}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9311.
- Simarro, M., J. Calvo, J. M. Vilà, L. Places, O. Padilla, J. Alberola-Ila, J. Vives, and F. Lozano. 1999. Signaling through CD5 involves acidic sphingomyelinase, protein kinase C- ζ , mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) and c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK). *J. Immunol.* 162:5149.
- 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 signalling pathway in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 272:31809.

27. Gringhuis, S. I., L. F. de Leij, P. J. Coffey, and E. Vellenga. 1998. Signalling through CD5 activates a pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase, Vav, and Rac1 in human mature T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 18:1725.
28. 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 p56^{lck}. *Mol. Cell. Biol.* 14:2862.
29. Calvo, J., J. M. Vilà, L. Places, M. Simarro, O. Padilla, D. Andreu, K. S. Campbell, C. Aussel, and F. Lozano. 1998. Human CD5 signalling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by casein kinase II. *J. Immunol.* 161:6022.
30. Raman, C., A. Kuo, J. Deshane, D. W. Litchfield, and R. P. Kimberly. 1998. Regulation of casein kinase 2 by direct interaction with cell surface receptor CD5. *J. Biol. Chem.* 273:19183.
31. Bauch, A., K. S. Campbell, and M. Reth. 1998. Interaction of the CD5 cytoplasmic domain with the Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II δ . *Eur. J. Immunol.* 28:2167.
32. 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.
33. 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.
34. Chatila, T. A., and R. S. Geha. 1988. Phosphorylation of T cell membrane proteins by activators of protein kinase C. *J. Immunol.* 140:4308.
35. 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. USA* 89:6368.
36. 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- ζ molecules in human CD3⁺ thymocytes. *J. Immunol.* 159:3739.
37. 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.
38. Calvo, J., L. Places, G. Espinosa, O. Padilla, J. M. Vilà, 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.
39. Calvo, J., O. Padilla, L. Places, E. Vigorito, J. M. Vilà, R. Vilella, J. Milà, J. Vives, M. A. Bowen, and F. Lozano. 1999. Relevance of individual CD5 extracellular domains on antibody recognition, glycosylation and co-mitogenic signalling. *Tissue Antigens* 54:16.
40. 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.
41. Pearson, R. B., and B. E. Kemp. 1991. Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol.* 200:62.
42. 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.
43. Yant, S., A. Hirano, and T. C. Wong. 1997. Identification of a cytoplasmic Tyr-X-X-Leu motif essential for down regulation of the human cell receptor CD46 in persistent measles virus infection. *J. Virol.* 71:766.
44. Kamiguchi, H., and V. Lemmon. 1998. A neuronal form of the cell adhesion molecule L1 contains a tyrosine-based signal required for sorting to the axonal growth cone. *J. Neurosci.* 18:3749.
45. Li, Y., M. P. Marzolo, P. van Kerkhof, G. J. Strous, and G. Bu. 2000. The YXXL motif, but not the two PNXV motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 275:17187.
46. Acuto, O., and D. A. Cantrell. 2000. T cell activation and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Immunol.* 18:165.
47. King, S. M., J. F. R. Dillman, S. E. Benashski, R. J. Lye, R. S. Patel-King, and K. K. Pfister. 1996. The mouse t-complex-encoded protein Tctex-1 is a light chain of brain cytoplasmic dynein. *J. Biol. Chem.* 271:478.
48. Hama, N. F. Paliogianni, B. J. Fessier, 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.
49. Keenan, C., and D. Kelleher. 1998. Protein kinase C and the cytoskeleton. *Cell Signal.* 10:225.
50. Weiss, A., and J. B. Imboden. 1987. Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation. *Adv. Immunol.* 41:1.
51. 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.
52. Harder, T., and K. Simons. 1997. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:534.
53. Geppert, T. D., and P. E. Lipsky. 1991. Association of various T cell-surface molecules with the cytoskeleton. *J. Immunol.* 146:3298.

Anexo IV.2:

T410 y T412 no son los únicos sitios de fosforilación *in vitro* por PKC en la región citoplasmática de CD5

Con la intención de determinar la existencia de otros sitios en la región citoplasmática de CD5, aparte de T410 y T412, que fuesen también dianas de fosforilación para PKC, realizamos ensayos de fosforilación *in vitro* por PKC utilizando mutantes citoplasmáticos de CD5 con la doble sustitución T410→A y T412→A. La figura IV.2.Anexo muestra que la molécula WT y el mutante T410-T412 son los dos fosforilables *in vitro* por PKC, aunque en el último los niveles de fosforilación son apreciablemente reducidos. Este resultado indica que la región citoplasmática de CD5 alberga otros sitios accesibles para PKC aparte de T410 y T412. El resultado del análisis de los mutantes E418^{stop} y E418^{stop}/T410A-T412A (fig. IV.2.3B y fig. IV.2.Anexo) revela, además, que estos otros sitios se encuentran fuera de los primeros 40 aa de la región citoplasmática de CD5 donde se localizan las treoninas 410 y 412.

De acuerdo con estos datos, en la secuencia aminoacídica de CD5 existen 3 residuos serina (S436, S439 y S452) inmersos en motivos conocidos de fosforilación por PKC [R-X-S] (fig. IV.2.1) que podrían ser responsables de la fosforilación *in vitro* del mutante T410A-T412A.

NOTA: Este experimento es referido como *data not shown* en la discusión del artículo al cual este apartado está anexo.

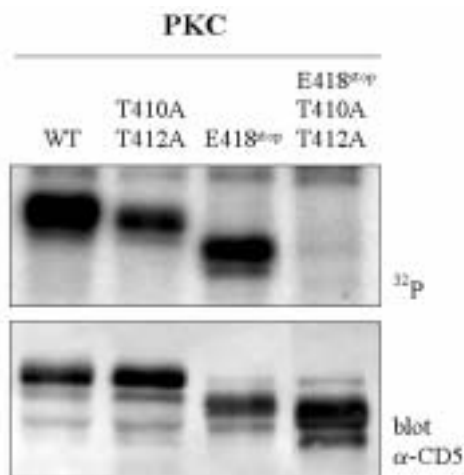


Figura IV.2.Anexo. En la región citoplasmática de CD5 existen otros sitios de fosforilación *in vitro* por PKC, aparte de T410 y T412. Inmunoprecipitados de moléculas de CD5 WT y mutantes citoplasmáticos fueron utilizados como sustratos en un ensayo de fosforilación *in vitro* con PKC purificada (*ver materiales y métodos*).

3. FOSFORILACIÓN DE CD5 EN RESIDUOS TIROSINA:

Los residuos Y429 e Y463 de CD5 humano son dianas de tirosincinasas

Resumen. La activación linfocitaria conlleva la fosforilación en tirosinas de CD5. Con el fin de determinar los sitios exactos de tirosinfosforilación y las cinasas implicadas, se estimularon y se analizaron células transfectantes Jurkat que expresaban moléculas de CD5 mutadas puntualmente a nivel de sus residuos tirosina. Nuestros resultados demostraron que, tras la estimulación con mAb anti-CD3 o pervanadato, sólo los residuos Y429 y Y463 son dianas de tirosinacinasas. Se obtuvieron los mismos resultados *in vitro* en ensayos de fosforilación utilizando productos recombinantes purificados de las tirosincinasas Lck y Fyn. El análisis de células Jurkat deficientes en Lck y CD3 demostró además que la tirosinfosforilación de CD5 requiere la actividad Lck. Con todos estos datos nosotros proponemos que la activación de la célula T induce la fosforilación en tirosinas de CD5 a nivel de los residuos Y429 y Y463, preferencialmente a través de la activación de Lck.

Residues Y429 and Y463 of the human CD5 are targeted by protein tyrosine kinases

Josep M. Vilà, Idoia Gimferrer, Olga Padilla, Mònica Arman, Lourdes Places, María Simarro, Jordi Vives and Francisco Lozano

Servei d'Immunologia, Institut D'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clínic, Barcelona, Spain

The human CD5 lymphocyte cell surface co-receptor modulates activation and differentiation responses mediated by the antigen-specific receptor of T and B cells. CD5 is phosphorylated following lymphocyte activation; however, the exact sites and kinases involved are yet to be determined. Jurkat T cell transfectants expressing tyrosine-mutated CD5 molecules have been used to show that residues Y429 and Y463 are targeted *in vivo* by protein tyrosine kinases following cell stimulation with anti-CD3 mAb or pervanadate. This is in agreement with data from direct *in vitro* kinase assays using purified recombinant Lck and Fyn protein tyrosine kinases. The analysis of Lck- and CD3-deficient Jurkat cells shows that tyrosine phosphorylation of CD5 requires Lck activity. We propose that T cell activation mediates CD5 tyrosine phosphorylation at residues Y429 and Y463 mainly through the activation of Lck.

Key words: Tyrosine phosphorylation / Human CD5 / Lck / Fyn / Lymphocyte activation

Received	22/9/00
Revised	7/12/00
Accepted	25/1/01

1 Introduction

CD5 is a 67-kDa cell surface glycoprotein expressed on T cells and the B1a cell subset [1]. CD5 belongs to a family of receptors characterized by the presence of scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domains on their extracellular regions [2, 3]. CD5 associates with the antigen-specific receptor present on T (TCR) and B (BCR) cells [4–6] and modulates signaling responses [7–9], although the complete transduction pathway has not been disclosed. Signaling elements reported to date include the activation of phosphatidylcholine specific-phospholipase C (PC-PLC) [10], acidic sphingomyelinase [11], Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase type IV (CaMK IV) [12], casein kinase II (CKII) [13], phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) [14], guanine exchange factor Vav [14], small Ras-related GTPase Rac 1 [14], protein kinase C- ζ (PKC- ζ) [11] and members of the mitogen-activated protein kinase cascade [11].

The cytoplasmic domain of CD5 lacks intrinsic catalytic activity, but its phosphorylation sites can potentially mediate protein-protein signaling interactions. Physical association of the CD5 cytoplasmic tail has been shown for Lck [15], Src homology 2 domain-bearing protein

phosphatase-1 (SHP-1) [16], CKII [17, 18], ras GTPase-activating protein (ras GAP) [19], c-cbl [19], Tctex-1 [20], CaMK II δ [20], PI 3-K [21], p21 phospho- ζ molecule [22] and an uncharacterized inducible kinase [23]. CD5 is constitutively phosphorylated by CKII at a cluster of three C-terminal serine residues [17] and undergoes rapid hyperphosphorylation on serine, threonine and/or tyrosine residues following cell stimulation by PMA [24, 25], anti-CD3 [23, 26, 27], or anti-CD5 mAb [23]. The CD5 cytoplasmic tail includes four tyrosine residues (Y378, Y429, Y441 and Y463), three of which are potentially embedded into known tyrosine-based motifs. The amino acid sequence neighboring Y429 and Y441 (E-X₇-D-X₂-Y⁴²⁹-X₂-P-X₈-Y⁴⁴¹-X₂-L) is similar to the immunoreceptor tyrosine-based activation motif ITAM ([D/E]-X₇-[D/E]-X₂-Y-X₂-L-X₆₋₈-Y-X₂-L) found on accessory molecules that associate with the antigen-specific receptor [28]. The membrane proximal Y378 residue is also contained within a sequence (LAY³⁷⁸KKL), which recalls the immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif ITIM ([I/V]-X-Y-X₂-[L/V]) [29].

The exact nature of both the kinases and the residues involved in the inducible tyrosine phosphorylation of CD5 remains to be fully elucidated. This issue has been explored in the present study by analyzing a series of mutant CD5 molecules carrying Y→A substitutions and expressed on a CD5-deficient Jurkat-derivative cell line. Here, we identify tyrosines 429 and 463 as preferential targets for the protein tyrosine kinase (PTK) Lck.

[1 21294]

Abbreviations: PV: Pervanadate WT: Wild type

2 Results and discussion

2.1 Cell stimulation with anti-CD3 mAb and pervanadate lead to tyrosine phosphorylation of CD5

As an early consequence of antigen receptor engagement, a rapid and transient tyrosine kinase activation is observed, leading to tyrosine phosphorylation of numerous cellular substrates, including the cytoplasmic domain of CD5 [26, 27]. The ability of anti-CD3 mAb and pervanadate (PV) to mimic TCR engagement [30] was used here to investigate the tyrosine phosphorylation of CD5. As shown in Fig. 1A, both stimuli induced clear increases in the phosphotyrosine content of CD5

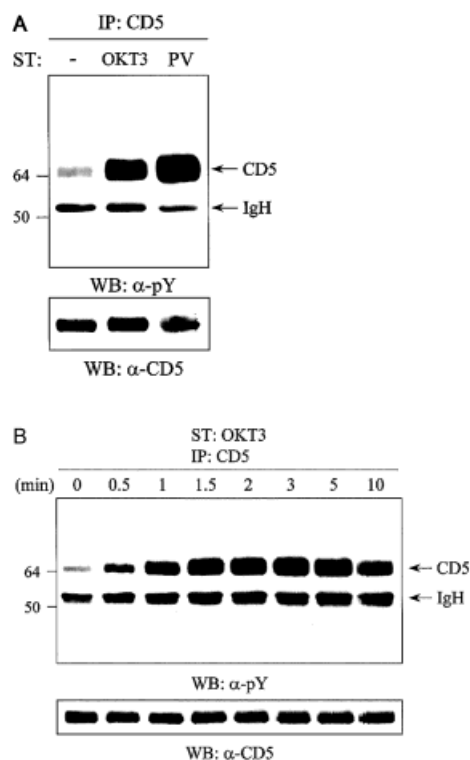


Fig. 1. Anti-CD3 mAb and PV stimulation induces tyrosine phosphorylation of CD5. (A) JE6.1 cells (2×10^7) were left unstimulated (-) or stimulated with $2 \mu\text{g/ml}$ OKT3 mAb for 3 min, and 1×10^7 JE6.1 cells were stimulated with $200 \mu\text{M}$ PV for 5 min. After Triton X-100 lysis, CD5 was immunoprecipitated with anti-CD5 mAb Cris-1 and resolved by SDS-PAGE. Samples were blotted with anti-phosphotyrosine mAb PY99 or anti-CD5 polyclonal antibody. (B) JE6.1 cells (2×10^7) were stimulated with anti-CD3 mAb OKT3 for the time points indicated. CD5 immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting for phosphotyrosine and CD5 contents.

expressed on Jurkat JE6.1 cells. As expected, PV was a much more efficient stimulus in inducing tyrosine phosphorylation of CD5. A discrete constitutive tyrosine phosphorylation of CD5 was detected, reflecting the semi-activated state of the Jurkat JE6.1 cells. Fig. 1B shows the early and transient tyrosine phosphorylation of CD5 following CD3 cross-linking. These results demonstrate that CD5 is an early substrate for PTK following TCR ligation and are consistent with works by other authors [26, 27].

2.2 Y429 and Y463 are preferential sites for *in vivo* CD5 tyrosine phosphorylation

The ability of Jurkat cells to support the tyrosine phosphorylation of CD5 allowed us to examine a series of CD5 mutants with tyrosine to alanine substitutions (Fig. 2) to determine the specific phosphorylation sites. The cytoplasmic domain of CD5 contains four potential tyrosine phosphorylation sites at positions 378, 429, 441, and 463 (Fig. 2). Stable Jurkat 2G5 transfectants expressing wild-type (WT) and tyrosine-mutated CD5 forms were subjected to CD3 cross-linking for 3 min at 37°C . Next, CD5 immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting for phosphotyrosine content. As expected, the constitutively low tyrosine phosphorylation levels of WT molecules were significantly increased following CD3 ligation (Fig. 3A). The same increase was

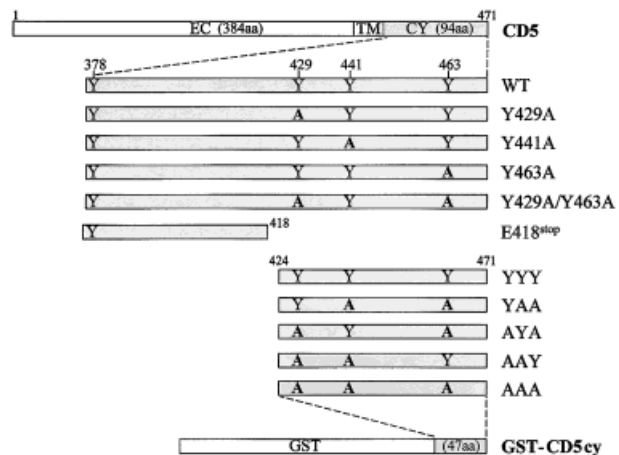


Fig. 2. Schematic representation of normal and chimeric CD5 molecules used in this study. The position of tyrosine (Y) residues mutated to alanine (A) is shown. Tyrosine-mutant CD5 are named according to the position of the tyrosine to alanine substitution. The truncation mutant E418^{stop} is named according to the amino acid in which a premature stop codon was introduced. GST-CD5cy fusion proteins were named according to the amino acid (Y or A) present at positions 429, 441 and 463, respectively.

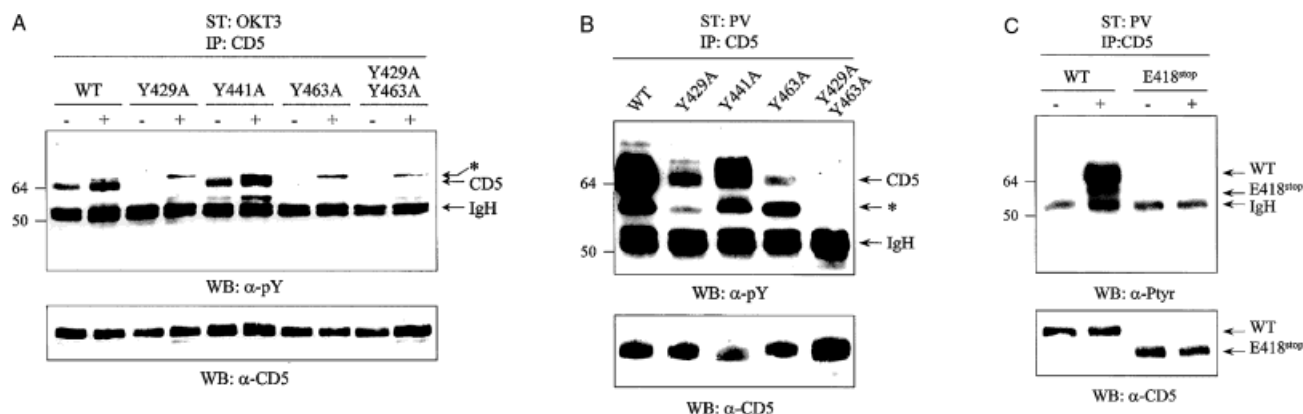


Fig. 3. CD3 and PV stimulations lead to phosphorylation of CD5 at Y429 and Y463. (A) Tyrosine phosphorylation analysis of Jurkat transfectants expressing CD5 molecules containing Y→A substitutions stimulated with (+) or without (-) the anti-CD3 mAb OKT3. (B) Tyrosine phosphorylation analysis of same Jurkat cell transfectants as in (A) subjected to PV stimulation. (C) Comparative analysis of PV-stimulated Jurkat cell transfectants expressing WT or cytoplasmic-truncated E418^{stop} molecules. In all lanes, CD5 immunoprecipitates were analyzed by Western blot for phosphotyrosine (top panels) and CD5 (bottom panels) content. The presence of tyrosine phosphorylated bands not reactive with anti-CD5 antiserum is indicated by an asterisk.

found for CD5 molecules carrying single Y441A substitution. In contrast, both the constitutive and the CD3-inducible tyrosine phosphorylation were abrogated in CD5 carrying either single (Y429A, Y463A) or double (Y429A/Y463A) tyrosine to alanine substitutions (Fig. 3A). This indicates that tyrosines 429 and 463 are major sites of CD5 tyrosine phosphorylation. This conclusion was also drawn from experiments using the stronger inducer of tyrosine phosphorylation PV. As shown in Fig. 3B, single Y429A and Y463A substitutions dramatically reduced the PV effects on CD5 tyrosine phosphorylation. The introduction of double substitutions (Y429A/Y463A) completely abrogated CD5 tyrosine phosphorylation. Consistently, a deletion mutant CD5 molecule lacking 54 amino acids from its C terminus (E418^{stop}), which has Y378 as the only available tyrosine residue, was not tyrosine phosphorylated following PV stimulation (Fig. 3C).

Taken together, our results indicate that residues Y429 and Y463 are the main, if not the only, tyrosines phosphorylated upon CD3 engagement or PV stimulation, and that residues Y378 and Y441 make little or no contribution. This is consistent with the idea that recognition sites of PTK usually contain the tyrosine phosphate acceptor near acidic residues [31]. Tyrosines 429 and 463, but not tyrosines 378 and 441, are surrounded by acidic residues (DXEY⁴²⁹ and DXDY⁴⁶³D). Additionally, the sequence flanking Y429 (DNEY⁴²⁹SQP) is similar to that of the tyrosine autophosphorylation site (DNEY^{TAR}) of the src PTK family [32]. The phosphorylation of Y429 but not Y441 raises doubts on the function of the ITAM-like sequence of CD5 as a true ITAM. In fact, the ITAM-like

sequence of CD5 is not coded by a single exon [33] as classical ITAM are. The recently reported presence of ZAP-70 in CD5 immunoprecipitates [22] must be attributed to the additional presence of p21 phospho- ζ -chains. In fact, the authors show that the association between ZAP-70 and CD5 does not take place in CD3⁻ thymocytes. Accordingly, recent *in vitro* experiments demonstrate that tandem SH2 domains of ZAP-70 binds to ζ and not to CD5 [21].

Similarly, the observed lack of phosphorylation of Y378 also argue against the function of the ITIM-like sequence of CD5 as a true ITIM. The neighboring sequence centered by Y378 (LAY³⁷⁸KKL) does not fit well either with the restricted consensus ITIM motif [I/V]-X-Y-X₂-[L/V], or the more broadly defined [L/S/I/V]-X-Y-X₂-[L/V/I/S] consensus [29]. The recently reported evidence that SHP-1 binding to phosphorylated Y378 mediates the inhibitory action of CD5 [16] is contradicted by recent experimental data. It has been reported that tyrosines within the ITAM-like motif of CD5 are required for the inhibition of BCR signaling, whereas Y378 is dispensable for this effect [34]. Consistently, hypersensitivity to TCR stimulation cannot be abrogated by a cytoplasmic tail-less CD5 form retaining Y378 [35].

2.3 Y429 and Y463 are tyrosine phosphorylated *in vitro* by Lck and Fyn

Activation of src family PTK is the most proximal event elicited by the T cell antigen receptor [36]. Two members of this family, Lck and Fyn, are mainly expressed in T

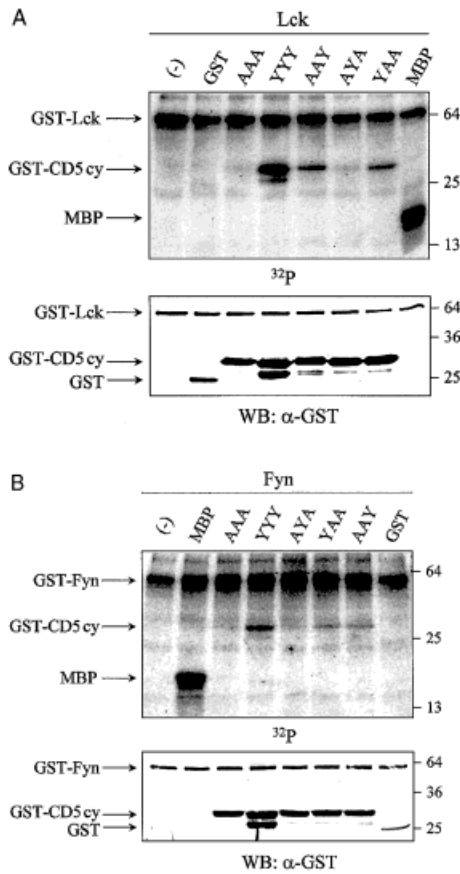


Fig. 4. *In vitro* phosphorylation assays of CD5 by Lck and Fyn. (A) Soluble purified GST-CD5cy fusion proteins, either unmutated or tyrosine-mutated, were incubated with identical amounts of solid-phase bound GST-Lck fusion protein, in the presence of [γ - 32 P]ATP. MBP and GST were used as positive and negative internal controls, respectively. The products of the reactions were resolved by 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and autoradiographed for measuring 32 P incorporation. Nitrocellulose membranes were then immunoblotted by anti-GST polyclonal antibody to control the sample loading. (B) Identical analysis to that shown in A, except that the GST-Fyn fusion protein was used as kinase in the phosphorylation assay.

cells [37] and are potential effectors of CD5 tyrosine phosphorylation [27]. To examine whether the cytoplasmic tyrosines of CD5 are substrates for Lck and Fyn, we carried out direct *in vitro* kinase assays. For these experiments, we generated glutathione S-transferase (GST) fusion proteins (GST-CD5cy) containing WT and tyrosine-mutated versions of the C-terminal half (from H424 to L471) of the CD5 cytoplasmic tail (Fig. 2). Versions containing the complete cytoplasmic tail of CD5 could not be generated due to deficient bacterial expression of the resulting fusion protein. Soluble purified GST-CD5cy proteins were incubated with solid phase-bound

GST fusion proteins containing the kinase domain of Lck (GST-Lck) or Fyn (GST-Fyn), in presence of [γ - 32 P]ATP. As shown in Fig. 4, both Lck and Fyn phosphorylated GST-CD5cy/YYY protein. Nevertheless, GST-CD5cy/YYY phosphorylation levels achieved with Lck were repeatedly higher than those with Fyn, as deduced from internal controls [myelin basic protein (MBP) phosphorylation and kinase autophosphorylation] (Fig. 4). The contribution of each tyrosine on the CD5 phosphorylation was explored by analyzing GST-CD5cy/YAA, AYA and AAY fusion proteins. Again, the same results were obtained for both Lck and Fyn. The GST-CD5cy/YAA and AAY proteins were phosphorylated, but at levels lower than YYY. The GST-CD5cy/AYA remained unphosphorylated in all cases. Therefore, only Y429 and Y463 are accessible to Lck and Fyn phosphorylation. These experiments demonstrate that the cytoplasmic region of CD5 is a good substrate for Lck and (in a lesser extent) Fyn, and agree with CD5 tyrosine phosphorylation after Lck co-expression in insect cells [15]. Our *in vitro* kinase assays are consistent with the *in vivo* experiments shown in Fig. 3, indicating that Lck and Fyn are responsible for CD5 tyrosine phosphorylation following TCR engagement.

2.4 Functional Lck activity is required for CD5 tyrosine phosphorylation

To explore the involvement of src family PTK on CD5 phosphorylation following T cell stimulation, we used the Lck-deficient Jurkat-derivative JCAM1 [38]. As shown in Fig. 5, neither OKT3 mAb nor PV induced tyrosine phos-

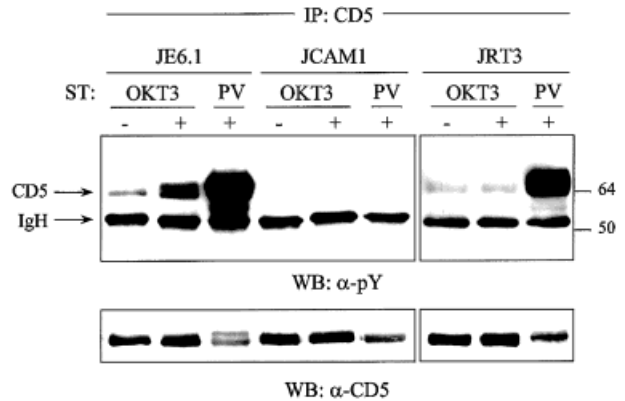


Fig. 5. Dependence of CD5 tyrosine phosphorylation on intact Lck activity. WT Jurkat JE6.1 cells and its Lck-deficient and TCR/CD3-deficient derivatives JCAM1 and JRT3-T3.5, respectively, were incubated in the presence (+) or absence (-) of anti-CD3 mAb OKT3 or PV. CD5 immunoprecipitates were analyzed by Western blot for phosphotyrosine (top panel) and CD5 (bottom panel) content.

phorylation of CD5 in JCAM1 cells (Fig. 5). In parallel experiments, the same stimuli induced significant CD5 phosphorylation on the parental Jurkat JE6.1 cells (Fig. 5). The Jurkat derivative JRT3-T3.5, deficient in TCR/CD3 expression, was also analyzed. As expected, CD5 undergoes tyrosine phosphorylation upon PV but not OKT3 mAb stimulation (Fig. 5). This indicates that tyrosine phosphorylation of CD5 is dependent on functional Lck activity, but not on the presence of the TCR/CD3 receptor complex. The JCAM1 results are consistent with our direct *in vitro* kinase assays (Fig. 4) and support the notion that Lck is the main PTK for the tyrosine phosphorylation of CD5 following T cell stimulation. Nevertheless, the contribution of other PTK cannot be completely ruled out. It has been reported that JCAM1 cells express low levels of endogenous Fyn [39]. Moreover, tyrosine phosphorylation of proteins through both CD3 and PV stimulations requires the presence of Lck activity [38, 40]. Activation of Lck is the first step in TCR signal transduction [36] and downstream Lck-dependent kinases could be rendered inactive in JCAM1 cells. One of such kinase is ZAP-70, which is activated through the phosphorylation within its catalytic domain by Lck [41].

3 Concluding remarks

In conclusion we show that Y429 and Y463 are the main, if not the only, sites for CD5 tyrosine phosphorylation and suggest that Lck is the major tyrosine kinase involved. The lower efficacy in phosphorylating the CD5 cytoplasmic tail together with the predominant perinuclear distribution [42] makes Fyn's contribution unlikely. The phosphorylation seen at residues Y429 and Y463 but not at Y441 and Y378 invalidates the ITAM-like and ITIM-like sequences of CD5 as classical ITAM and ITIM. However, this fact does not invalidate CD5 as a molecule able to recruit signaling molecules via phosphotyrosine-mediated interactions. In fact, it has been shown that the SH2 domains of Lck, rasGAP and PI 3-K efficiently bind to phosphopeptides containing Y429 and Y463 residues [19, 21]. These results support the hypothesis that phosphorylation of Y429 and Y463 is relevant to CD5 signaling in the recruitment of signal transduction elements.

4 Materials and methods

4.1 Antibodies

The anti-phosphotyrosine mAb PY99 (IgG2b) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The mouse Cris-1 mAb (IgG2a) to human CD5 was produced in our laboratory by R. Vilella, using PBMC as immunizing cells. The anti-human CD3 ϵ mAb OKT3 was from

Ortho Biotech Inc. (Raritan, NJ). Rabbit polyclonal antisera against the extracellular region of the human CD5 was produced in our laboratory as previously described [43]. Rabbit polyclonal antibody to GST recombinant protein was obtained in our laboratory using GST-CD5cy/YYY (see below) as immunizing protein [17]. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated sheep IgG fraction to mouse Ig was from Amersham Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Sweden). Peroxidase-labeled recombinant protein G was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

4.2 Cells and transfectants

The human T cell leukemia Jurkat JE6.1 cell line, and its Lck-deficient (JCAM1) and TCR β -chain deficient (JRT3-T3.5) derivatives were supplied by American Type Culture Collection. The generation and characterization of the CD5-deficient 2G5 Jurkat subclone has been reported elsewhere [10]. The 2G5 Jurkat cell transfectants expressing cytoplasmic tail-mutant CD5 molecules were obtained by cell electroporation and selection for CD5 surface expression of neomycin-resistant cell clones as previously reported [10]. Cell lines were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10 % fetal bovine serum, L-glutamine and antibiotics.

4.3 CD5 constructs

The constructs coding for WT and E418^{stop} CD5 molecules were generated and cloned into the pH β APr-1-neo expression vector as previously reported [10, 17]. The constructs coding for cytoplasmic tail-mutant CD5 molecules carrying Y \rightarrow A substitutions were similarly cloned and obtained by inverse PCR mutagenesis using specific oligonucleotide primers pairs: 5'-CCAGCCAACCTCCCAGGAAGTCCC-3'/5'-CCTTCGTTATCCACGTGGGAGGCTGT-3' for Y429A, 5'-CCAGCTCTGGAAGGGGTTCTGC-3'/5'-TGCAGCTGACAGGCGGGAGTTCCT-3' for Y441A, and 5'-CTGATCTGCATGGGGCTCAGAGGCT-3'/5'-CGTCACTGTCGGAGGAGTTGTCAGGC-3' for Y463A. All mutations were verified by DNA sequencing in both directions (ABI PRISM dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit; PE Applied Biosystems, Warrington, GB). Plasmid constructions were purified by cesium chloride density gradients.

4.4 GST fusion proteins

The GST-CD5cy/YYY construct codes for a fusion protein composed of the GST protein fused in frame to the 47 most C-terminal residues of the CD5 cytoplasmic tail (from H424 to the natural stop codon) [17]. This was done by PCR amplification of the CD5 cytoplasmic region with the sense/antisense oligonucleotide pairs: 5'-CATGCCGTCGACCCACGTGGATAACGAA-3'/5'-ATAAGAATGCGGCCGCGATCCCAGTTCTTTACAG-3' and further cloning into the Sal I- and Not I-restricted pGEX-4T-2 vector (Amersham Pharma-

cia Biotech). The GST-CD5cy constructs carrying Y→A substitutions were obtained in the same way, except that the above-mentioned cytoplasmic tail-mutant CD5 constructs were used as PCR templates. Competent DH10 cells were transformed with pGEX DNA and screened for their capacity to express correct GST fusion protein. Selected clones were induced with IPTG, disrupted by sonication, and lysed in a buffer containing 1 % Triton X-100 and complete protease inhibitor cocktail tablets (Boehringer Mannheim, Germany). After centrifugation at 12,000×g for 10 min at 4°C, GST fusion proteins were purified from supernatants by adsorption to a glutathione-Sepharose matrix (Amersham Pharmacia Biotech), following manufacturer's instructions. The plasmids coding for GST-Lck and GST-Fyn fusion proteins were a gift from Dr. Jos'e Alberola-Ila (California Institute of Technology, Pasadena, CA). These constructions consist of the GST sequence fused in frame to the respective kinase domain (from Q225 to the natural stop codon), and are cloned into the baculovirus expression pPFZ5 vector. These constructs were expressed in Sf9 insect cells and the GST fusion proteins purified following the above-mentioned procedure.

4.5 Cell stimulation, immunoprecipitation and immunoblotting

Jurkat cells were washed once and resuspended in cold PBS to 2×10^8 cells/ml. For mAb stimulation, 2×10^7 cell samples were left on ice with 2 µg/ml OKT3 for 10 min and then stimulated at 37°C for 3 min. For PV stimulation, 1×10^7 cells were equilibrated at 37°C for 10 min and then incubated with 200 µM PV for 5 min at 37°C. The PV was prepared by mixing 4 mM orthovanadate with 180 mM H₂O₂ for 10 min at room temperature. At the end of stimulation periods, Jurkat cells were washed once with 1 ml cold PBS, and then disrupted on ice for 15 min with 0.5 ml Triton X-100 lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 90 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 mM orthovanadate, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin). Nuclei and cellular debris were removed by 15 min microcentrifugation at 4°C. CD5 molecules were immunoprecipitated from the lysates with 0.5 µg/ml Cris-1 mAb plus protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) for 1 h at 4°C. Immune complexes were extensively washed with high salt lysis buffer (lysis buffer plus 500 mM NaCl), subjected to 9% SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Richmond, CA). The filters were blocked overnight at 4°C in blocking solution [PBS, 0.1 % Tween 20, and 1 % BSA (Merck, Darmstadt, Germany)]. Western blot detection of phosphotyrosine proteins was carried out by using anti-phosphotyrosine mAb (1 µg/ml) and HRP-linked anti-mouse IgG (1/7,500) at room temperature for 1 h and 30 min, respectively. Filters were developed by chemiluminescence with SuperSignal West Dura Substrate (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Re-probing of the membranes for CD5 detection was performed after incubation with

stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.7, 100 mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS) at 55°C for 30 min, and further incubation with non-fat milk/PBS blocking solution (PBS, 0.1% Tween 20, and 5% non-fat milk) at 37°C for 30 min. Rabbit anti-CD5 polyclonal antibody (1/200) and HRP-conjugated protein G (1/800) were used at room temperature for 30 min and 15 min, respectively. The immunoblot was developed by a colorimetric procedure using diaminobenzidine (Sigma) and H₂O₂ as peroxidase substrates.

4.6 In vitro tyrosine kinase assays

For direct *in vitro* kinase assays, 1 µg of purified soluble GST-CD5cy proteins was added to 30 µl of a kinase buffer containing 50 mM Hepes 7.2, 10 mM MnCl₂, 150 mM NaCl, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM dithiothreitol, 0.1% NP40, 100 µM ATP, 10 µCi [γ -³²P]ATP (Nuclear Iberica, Madrid, Spain). The assays were carried out at 30°C for 30 min in the presence of glutathione-Sepharose beads coated with GST-Lck (2 µg) or -Fyn (1 µg) fusion proteins. Bovine MBP (Sigma; 1 µg) was used as positive control substrate. The reaction was stopped by adding 10 µl of 4× reducing sample buffer, and boiling for 5 min. The total volume was loaded and run into 12% SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose and ³²P incorporation was detected by autoradiography. As loading control, blocked membranes were probed with a rabbit anti-GST polyclonal serum (1/200) and HRP-conjugated protein G (1/800) for 30 min and 15 min, respectively. The immunoblot was developed by the above-described colorimetric procedure.

Acknowledgements: The authors are deeply indebted to M. Isamat for critical reviewing of the manuscript. This work was supported by Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (SAF 98/045). J.M.V., O.P. and M.A. are recipients of fellowships from IDIBAPS (330017), Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (1998FI/839) and Ministerio de Educación y Cultura (PN98/46729827), respectively.

References

- 1 **Hardy, R. R. and Hayakawa, K.**, CD5 B cells, a fetal B lineage. *Adv. Immunol.* 1994. **55**: 297–339.
- 2 **Resnick, D., Pearson, A. and Krieger, M.**, The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 1994. **19**: 5–8.
- 3 **Aruffo, A., Bowen, M. A., Patel, D. D., Haynes, B. F., Starling, G. C., Gebe, J. A. and Bajorath, J.**, CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function? *Immunol. Today* 1997. **18**: 498–504.
- 4 **Beyers, A. D., Spruyt, L. and Williams, A. F.**, Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4, or CD8 and CD5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992. **89**: 2945–2949.

- 5 Osman, N., Ley, S. C. and Crumpton, M. J., Evidence for an association between the T cell receptor/CD3 antigen complex and the CD5 antigen in human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1992. **22**: 2995–3000.
- 6 Lankester, A. C., van Schijndel, G. M., Cordell, J. L., van Noesel, C. J. and van Lier, R. A., CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. *Eur. J. Immunol.* 1994. **24**: 812–816.
- 7 Tarakhovsky, A., Kanner, S. B., Hombach, J., Ledbetter, J. A., Müller, W., Killeen, N. and Rajewsky, K., A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* 1995. **269**: 535–537.
- 8 Bikah, G., Carey, J., Ciallella, J. R., Tarakhovsky, A. and Bonadada, S., CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science* 1996. **274**: 1906–1909.
- 9 Lozano, F., Simarro, M., Calvo, J., Vilà, J. M., Padilla, O., Bowen, J. and Campbell, K. S., CD5 signal transduction: positive or negative modulation of antigen receptor signaling. *Crit. Rev. Immunol.* 2000. **20**: 347–358.
- 10 Simarro, M., Pelassy, C., Calvo, J., Places, L., Aussel, C. and Lozano, F., The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production. *J. Immunol.* 1997. **159**: 4307–4315.
- 11 Simarro, M., Calvo, J., Vilà, J. M., Places, L., Padilla, O., Alberola-Ila, J., Vives, J. and Lozano, F., Signaling through CD5 involves acidic sphingomyelinase, protein kinase C-zeta, mitogen-activated protein kinase kinase, and c-Jun NH2-terminal kinase. *J. Immunol.* 1999. **162**: 5149–5155.
- 12 Gringhuis, S. I., de Leij, L. F., Wayman, G. A., Tokumitsu, H. and Vellenga, E., The Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase type IV is involved in the CD5-mediated signaling pathway in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 1997. **272**: 31809–31820.
- 13 Raman, C. and Kimberly, R. P., Differential CD5-dependent regulation of CD5-associated CK2 activity in mature and immature T cells: implication on TCR/CD3-mediated activation. *J. Immunol.* 1998. **161**: 5817–5820.
- 14 Gringhuis, S. I., de Leij, L. F., Coffey, P. J. and Vellenga, E., Signaling through CD5 activates a pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase, Vav, and Rac1 in human mature T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 1998. **18**: 1725–1735.
- 15 Raab, M., Yamamoto, M. and Rudd, C. E., The T cell antigen CD5 acts as a receptor and substrate for the protein-tyrosine kinase p56lck. *Mol. Cell. Biol.* 1994. **14**: 2862–2870.
- 16 Perez-Villar, J. J., Whitney, G. S., Bowen, M. A., Hewgill, D. H., Aruffo, A. A. and Kanner, S. B., CD5 negatively regulates the T cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Mol. Cell. Biol.* 1999. **19**: 2903–2912.
- 17 Calvo, J., Vilà, J. M., Places, L., Simarro, M., Padilla, O., Andreu, D., Campbell, K. S., Aussel, C. and Lozano, F., Human CD5 signaling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by casein kinase II. *J. Immunol.* 1998. **161**: 6022–6029.
- 18 Raman, C., Kuo, A., Deshane, J., Litchfield, D. W. and Kimberly, R. P., Regulation of casein kinase 2 by direct interaction with cell surface receptor CD5. *J. Biol. Chem.* 1998. **273**: 19183–19189.
- 19 Dennehy, K. M., Broszeit, R., Ferris, W. F. and Beyers, A. D., Thymocyte activation induces the association of the proto-oncoprotein c-cbl and ras GTPase-activating protein with CD5. *Eur. J. Immunol.* 1998. **28**: 1617–1625.
- 20 Bauch, A., Campbell, K. S. and Reth, M., Interaction of the CD5 cytoplasmic domain with the Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase IIdelta. *Eur. J. Immunol.* 1998. **28**: 2167–2177.
- 21 Dennehy, K. M., Broszeit, R., Garnett, D., Durrheim, G. A., Spruyt, L. L. and Beyers, A. D., Thymocyte activation induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase and pp120 with CD5. *Eur. J. Immunol.* 1997. **27**: 679–686.
- 22 Gary-Gouy, H., Lang, V., Sarun, S., Boumsell, L. and Bismuth, G., *In vivo* association of CD5 with tyrosine-phosphorylated ZAP-70 and p21 phospho-zeta molecules in human CD3⁺ thymocytes. *J. Immunol.* 1997. **159**: 3739–3747.
- 23 Alberola-Ila, J., Places, L., Lozano, F. and Vives, J., Association of an activation inducible serine kinase activity with CD5. *J. Immunol.* 1993. **151**: 4423–4430.
- 24 Chatila, T. A. and Geha, R. S., Phosphorylation of T cell membrane proteins by activators of protein kinase C. *J. Immunol.* 1988. **140**: 4308–4314.
- 25 Lozano, F., Alberola-Ila, J., Places, L., Gallart, T. and Vives, J., Phosphorylation-mediated changes in the electrophoretic mobility of CD5 molecules. *Eur. J. Biochem.* 1990. **193**: 469–477.
- 26 Davies, A. A., Ley, S. C. and Crumpton, M. J., CD5 is phosphorylated on tyrosine after stimulation of the T cell antigen receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992. **89**: 6368–6372.
- 27 Burgess, K. E., Yamamoto, M., Prasad, K. V. and Rudd, C. E., 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. USA* 1992. **89**: 9311–9315.
- 28 Reth, M., Antigen receptor tail clue. *Nature* 1989. **338**: 383–384.
- 29 Sinclair, N. R., Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs on activating molecules. *Crit. Rev. Immunol.* 2000. **20**: 89–102.
- 30 Secrist, J. P., Burns, L. A., Karnitz, L., Koretzky, G. A. and Abraham, R. T., Stimulatory effects of the protein tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, on T cell activation events. *J. Biol. Chem.* 1993. **268**: 5886–5893.
- 31 Kemp, B. E. and Pearson, R. B., Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* 1990. **15**: 342–346.
- 32 Pearson, R. B. and Kemp, B. E., Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol.* 1991. **200**: 62–81.
- 33 Padilla, O., Calvo, J., Vilà, J. M., Gimferrer, I., Places, L., Arias, M. T., Pujana, M. A., Vives, J. and Lozano, F., Genomic organization of the human CD5 gene. *Immunogenetics* 2000. **51**: 993–1001.
- 34 Gary-Gouy, H., Bruhns, P., Schmitt, C., Dalloul, A., Daeron, M. and Bismuth, G., The pseudo-immunoreceptor tyrosine-based activation motif of CD5 mediates its inhibitory action on B cell receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 2000. **275**: 548–556.
- 35 Peña-Rossi, C., Zuckerman, L. A., Strong, J., Kwan, J., Ferris, W., Chan, S., Tarakhovsky, A., Beyers, A. D. and Killeen, N., Negative regulation of CD4 lineage development and responses by CD5. *J. Immunol.* 1999. **163**: 6494–6501.
- 36 Alberola-Ila, J., Takaki, S., Kerner, J. D. and Perlmutter, R. M., Differential signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1997. **15**: 125–154.
- 37 Olszowy, M. W., Leuchtman, P. L., Veillette, A. and Shaw, A. S., Comparison of p56lck and p59fyn protein expression in thymocyte subsets, peripheral T cells, NK cells, and lymphoid cell lines. *J. Immunol.* 1995. **155**: 4236–4240.

- 38 **Straus, D. B. and Weiss, A.**, Genetic evidence for the involvement of the Lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 1992. **70**: 585–593.
- 39 **Denny, M. F., Patai, B. and Straus, D. B.**, Differential T cell antigen receptor signaling mediated by the Src family kinases Lck and Fyn. *Mol. Cell. Biol.* 2000. **20**: 1426–1435.
- 40 **Jin, Y. J., Friedman, J. and Burakoff, S. J.**, Regulation of tyrosine phosphorylation in isolated T cell membrane by inhibition of protein tyrosine phosphatases. *J. Immunol.* 1998. **161**: 1743–1750.
- 41 **Chan, A. C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G. H., Wang, T., Thoma, R. and Kurosaki, T.**, Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* 1995. **14**: 2499–2508.
- 42 **Ley, S. C., Marsh, M., Bebbington, C. R., Proudfoot, K. and Jordan, P.**, Distinct intracellular localization of Lck and Fyn protein tyrosine kinases in human T lymphocytes. *J. Cell. Biol.* 1994. **125**: 639–649.
- 43 **Calvo, J., Places, L., Espinosa, G., Padilla, O., Vilà, J. M., Villamor, N., Ingelmo, M., Gallart, T., Vives, J., Font, J. and Lozano, F.**, Identification of a natural soluble form of human CD5. *Tissue Antigens* 1999. **54**: 128–137.

Correspondence: Francisco Lozano, Servei d'Immunologia, IDIBAPS, Hospital Clínic, Villarroel 170, E-08036 Barcelona, Spain
Fax: +34-93-4518038
e-mail: lozano@medicina.ub.es

Note added in proof: While the present article was in press, Dennehy et al. (*Int. Immunol.* 2001. **13**: 149–156) reported that both Y429 and Y463 are the only prominent sites for tyrosine phosphorylation of mouse CD5. Their results also confirm the lack of phosphorylation of Y378, and make unlikely the reported association of SHP-1 with CD5 through the Y378 residue.

ANEXO IV.3:

La región más yuxtamembranal de CD5 es suficiente para su internalización mediada por clatrina

El transporte intracelular de proteínas vesiculares y de secreción, y la endocitosis de receptores transmembrana están generalmente mediados por vesículas recubiertas de clatrina [186]. La proteína AP-2 es la responsable de reconocer motivos citoplasmáticos de internalización en receptores de membrana y de reclutar moléculas de clatrina y ensamblarlas formando un tapiz [187]. Uno de las secuencias de reconocimiento descritos para la AP-2

es el motivo basado en tirosina [Y-X-X- ϕ] (donde ϕ es un aminoácido hidrofóbico) [188]. Dado que CD5 contienen una secuencia [Y³⁷⁸KKL] en el extremo N-terminal de su cola citoplasmática (fig. 1.7), que encaja perfectamente con el motivo de reconocimiento de AP-2, quisimos comprobar su funcionalidad en la internalización mediada por clatrina de CD5. Analizamos la internalización de CD5 en un medio hipertónico, puesto que la incubación de células en este medio rompe las estructuras de clatrina asociadas a membrana [189, 190] y, por lo tanto, inhibe la endocitosis de receptores que siguen esa ruta [190, 191].

Células Jurkat transfectadas con las construcciones WT y K384^{stop} (fig. IV.2.1) fueron incubadas a 4°C con concentraciones saturantes de mAbs anti-CD5, lavadas, y dejadas a 37°C durante diferentes períodos de tiempo, tanto en medio de cultivo solo o conteniendo 0,45 M de sacarosa. Anticuerpos contra inmunoglobulinas de ratón conjugados a FITC se utilizaron para monitorizar los niveles de CD5 unido a anticuerpo. Como se muestra en la figura IV.3.Anexo, el medio hipertónico con sacarosa impide la rápida internalización de las moléculas WT y K384^{stop}. Este resultado indica que la internalización de CD5 mediada por anticuerpo sigue una ruta dependiente de clatrina, y que posiblemente la secuencia [Y³⁷⁸KKL], conservada en el mutante K384^{stop}, dirija tal fenómeno.

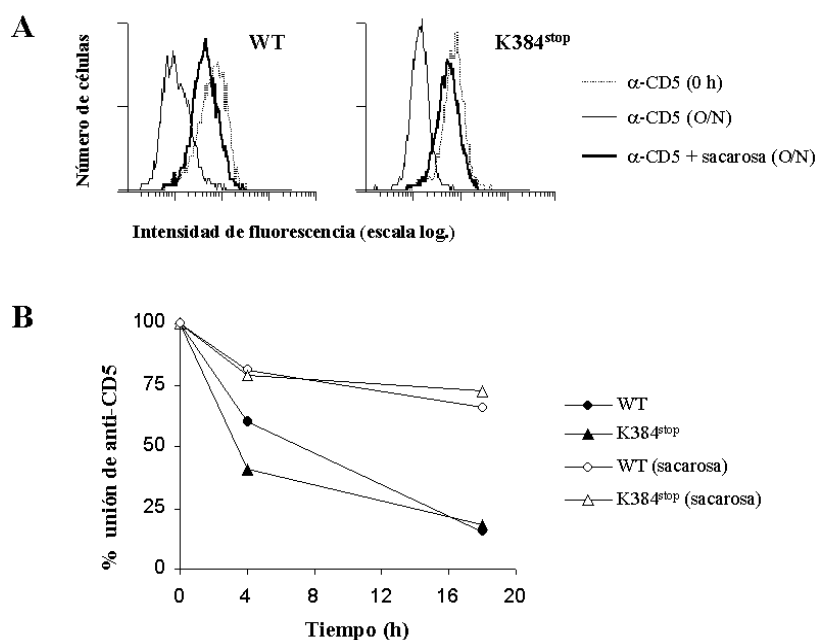


Figura IV.3.Anexo. Efecto de concentraciones altas de sacarosa en la internalización de CD5. Células transfectantes Jurkat 2G5 WT y K384^{stop} se incubaron en hielo 30 min con concentraciones saturantes de mAb anti-CD5 Cris-1 (1-10 μ g /10⁶ células). Tras eliminar el exceso de anticuerpo, las células se lavaron con medio de cultivo conteniendo o sin contener 0,45 M de sacarosa, y se dejaron incubando a 37°C con el mismo medio. En los tiempos indicados, las células se tiñeron con anticuerpos anti-Ig murinos marcados con FITC y analizadas por citometría de flujo. **(A)** Histogramas de fluorescencia mostrando la expresión de CD5 superficial después de una incubación de toda una noche (O/N), con o sin sacarosa. La línea discontinua representa la expresión basal de CD5 en las células. **(B)** Experimentos de los niveles relativos de expresión de CD5 en el tiempo, tras la incubación en presencia (iconos blancos) o ausencia (iconos negros) de sacarosa de los transfectantes WT (círculos) y K384^{stop} (triángulos).

(ii) CD5 COMO ACTIVADOR DE CINASAS

- 4. ACTIVADOR DE TIROSINCINASAS INTRACELULARES
- 5. ACTIVADOR DE UNA SERIN/TREONINCINASA ASOCIADA

4. ACTIVADOR DE TIROSINCINASAS INTRACELULARES:

CD5 induce la fosforilación en tirosinas de proteínas adaptadoras

Resumen. Con el objetivo de estudiar el papel de las proteínas adaptadoras en la señalización de CD5, analizamos el patrón de proteínas tirosinfosforiladas asociadas a Grb2 tras la estimulación vía CD5 en células Jurkat. Entre ellas identificamos las proteínas adaptadoras c-Cbl y LAT. La fosforilación de c-Cbl (120 kDa) tras el entrecruzamiento con mAb anti-CD5 es rápida y transitoria, y sus niveles de fosforilación vía CD5 son similares a los inducidos vía CD3 y no se afectan por la delección de 2/3 C-terminales de la región citoplasmática de CD5. Por el contrario, la fosforilación de LAT (36-38 kDa) vía CD5 es muy débil comparada con la inducida vía CD3. Dado el papel señalizador negativo atribuido a Cbl, el predominio de la fosforilación de c-Cbl sobre LAT podría estar relacionado con la función moduladora negativa descrita para CD5 en timocitos y células B1a.

A pesar que CD5 fue inicialmente considerada una molécula co-estimuladora en células T periféricas, estudios recientes a partir de ratones CD5^{-/-} han demostrado que también podría inducir señales inhibitorias que atenuaran las señales de activación mediadas por el receptor específico de antígeno [66]. El hecho de que la regulación negativa no ocurre en ausencia de la región citoplasmática de CD5 [142] sugiere que tal efecto dependa de interacciones intracelulares mediadas por dicha región. Así, se ha descrito la asociación de SHP-1 y CKII a la región citoplasmática de CD5, las cuales podrían estar implicadas en la señalización negativa de CD5 en timocitos [150, 192]. No obstante, las bases moleculares de su capacidad para modular las señales del TCR y

BCR están todavía lejos de ser completamente conocidas.

La fosforilación en tirosinas de proteínas adaptadoras es un proceso clave en la señalización intracelular. Estas proteínas no poseen ninguna actividad enzimática o transcripcional intrínseca, pero presentan una alta capacidad para interaccionar con otras proteínas. De esta manera actúan haciendo de puente entre procesos bioquímicos iniciados por el receptor celular y vías de señalización más distales [193]. Estudios sobre diversas proteínas adaptadoras han revelado su crítica función en la activación linfocitaria [194-196]. Tras la activación del receptor de célula T (TCR), proteínas adaptadoras como LAT y c-Cbl, entre otras, juegan un papel muy importante [197]. C-Cbl ha sido identificado como un

regulador negativo de tirosincinasas implicadas en el inicio de la señalización del receptor antigénico, tales como ZAP-70 [154], Syk [156] y Fyn [198]. Por otro lado, LAT juega un papel clave en la activación de Ras y de PLC γ 1, y por lo tanto está implicada en la propagación de las señales del TCR hacia vías de señalización más distales [20, 25]. En este trabajo, demostramos que la estimulación vía CD5 induce la fosforilación en tirosinas de c-Cbl en células Jurkat, mientras que es incapaz de conseguir niveles importantes de fosforilación en LAT. El predominio de la fosforilación de c-Cbl sobre LAT creemos que podría estar relacionado con la función moduladora negativa de CD5 reportada en determinados tipos celulares (timocitos y B1a).

4.1 La estimulación vía CD5 induce fosforilación de proteínas intracelulares en sus residuos tirosina

Para analizar la capacidad de CD5 de inducir fosforilación de sustratos intracelulares, aprovechamos la propiedad de la proteína adaptadora Grb2 en unir proteínas tirosinfosforiladas a través de sus dominios SH2. Moléculas Grb2 se inmunoprecipitaron de lisados de células Jurkat estimuladas con mAb anti-CD5 (Cris-1), mAb anti-CD3 (OKT3) o sin estimular. Los contenidos de proteínas tirosinfosforiladas en los inmunoprecipitados de Grb2 se analizaron por *western blot* con un mAb anti-fosfotirosina. Como se puede ver en la figura IV.4.1, tras la incubación con Cris-1 existe un claro incremento respecto el control en el número de proteínas fosforiladas que co-inmunoprecipitan con Grb2. Este resultado demuestra que CD5 es capaz de activar PTK intracelulares y es consistente con resultados anteriores [113]. En la misma figura también puede observarse que el patrón de fosfoproteínas asociadas a Grb2 en las células estimuladas vía CD5 difiere ligeramente del inducido vía CD3. Existen bandas comunes de 120 y 76 kDa, y bandas específicas para CD3 o para CD5 de 36-38 kDa y 55 kDa, respectivamente. Esto sugiere que la señalización de CD5 tiene características diferentes a las del receptor antigénico TCR/CD3.

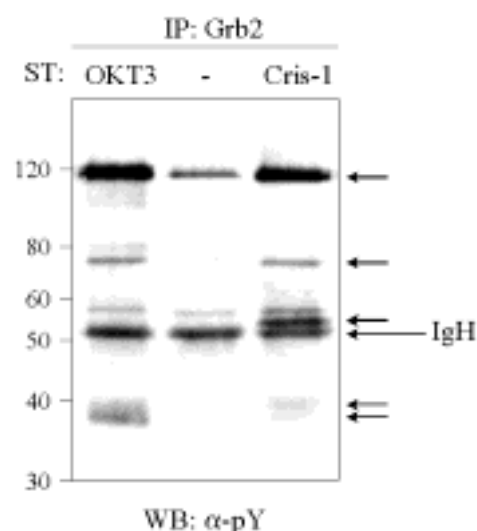


Figura IV.4.1 CD5 induce la tirosinfosforilación de proteínas y la asociación de éstas a Grb2. Células Jurkat se trataron con mAb anti-CD3 (OKT3), mAb anti-CD5 (Cris-1) o medio de cultivo (-) y posteriormente se lisaron. Los lisados celulares se inmunoprecipitaron con mAb anti-Grb2. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por *western blot* con mAb anti-fosfotirosina PY99 (α -pY) y se detectaron por quimioluminiscencia. Con flecha se indican las bandas en el carril "Cris-1" que no aparecen en el carril control (-) y, además, la banda que correspondería a las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgH).

4.2 Tirosinfosforilación diferencial de c-Cbl y LAT vía CD5

Grb2 se ha encontrado físicamente asociada a diversas proteínas adaptadoras relacionadas con la señalización intracelular del receptor antigénico de las células T, tales como c-Cbl (120 kDa), SLP-76 (76 kDa), Shc (46, 52 y 66 kDa) y LAT (36-38 kDa) [197]. Dado que los pesos de estas proteínas parecen corresponder con los de las bandas aparecidas en el carril OKT3 de la figura IV.4.1, decidimos investigar particularmente la fosforilación de p120^{c-Cbl} y p36-38^{LAT} en la activación linfocitaria mediada por CD5. Para ello, se prepararon lisados de células Jurkat estimuladas con Cris-1. Como controles negativo y positivo se obtuvieron lisados de células sin estimular y estimuladas con OKT3, respectivamente. C-Cbl y LAT fueron inmunoprecipitados secuencialmente a partir del mismo lisado y analizados por *western blot* con mAb anti-fosfotirosina. Posteriormente, se comprobaron los contenidos de c-Cbl y LAT como control de carga.

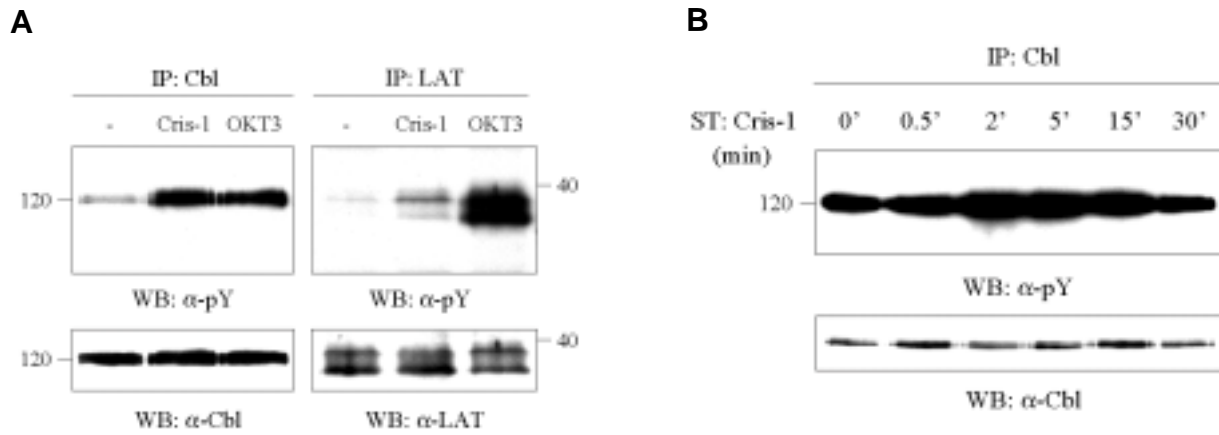


Figura IV.4.2 (A) La estimulación con mAb anti-CD5 induce un importante aumento de fosforilación en c-Cbl, pero no en LAT. Lisados de células Jurkat sin estimular (-) o estimulados con mAb anti-CD3 (OKT3) o mAb anti-CD5 (Cris-1) se inmunoprecipitaron primero con anti-Cbl y después con anti-LAT. Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se analizaron por *immunoblotting* con anti-fosfotirosina (α -pY), anti-Cbl o anti-LAT. (B) La fosforilación de Cbl vía CD5 es rápida y transitoria. Células Jurkat se estimularon con Cris-1 en los tiempos indicados, se lisaron y se inmunoprecipitaron con anti-Cbl. Los contenidos en fosfotirosina y Cbl de los inmunoprecipitados se analizaron por *immunoblotting*.

En la figura IV.4.2A puede apreciarse un notable incremento en los niveles de fosforilación de c-Cbl tras la estimulación vía CD5. Además, estos niveles son cualitativamente muy similares, por no decir idénticos, a los encontrados cuando la estimulación es vía CD3 (fig. IV.4.2A). Adicionalmente, la figura IV.4.2B muestra que la fosforilación de c-Cbl vía CD5 es temprana (2 min.) y transitoria, sugiriendo que podría estar mediada por tirosincinasas de la familia Src. Por el contrario, y a diferencia de la estimulación vía CD3, el entrecruzamiento de CD5 induce un débil y discreto aumento en los niveles de fosforilación de LAT (fig.

IV.4.2A). Estos resultados indican que mientras c-Cbl es sustrato importante de fosforilación en la vía de señalización de CD5, LAT no lo es.

4.3 La fosforilación de Cbl no depende de los 2/3 C-terminales de la región citoplasmática de CD5.

Para determinar la región de CD5 responsable de la fosforilación de c-Cbl, examinamos una serie de transfectantes Jurkat que expresaban moléculas de CD5 silvestre (WT) o mutadas por delección a nivel de su

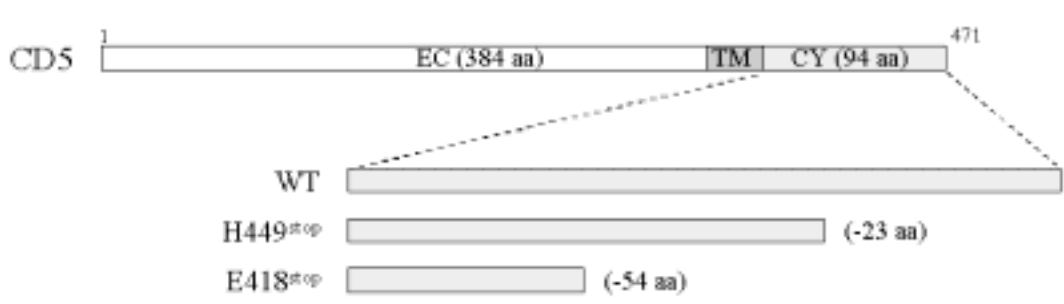


Figura IV.4.3. Representación esquemática de las moléculas de CD5 silvestre y mutadas a nivel de su región citoplasmática. Los mutantes por delección (H449^{stop} y E418^{stop}) se nombran por la naturaleza del aminoácido sobre el cual se ha añadido un codón *stop* prematuro, y por su posición en la secuencia silvestre de CD5. EC, extracelular; CY, citoplasmático; TM, transmembrana.

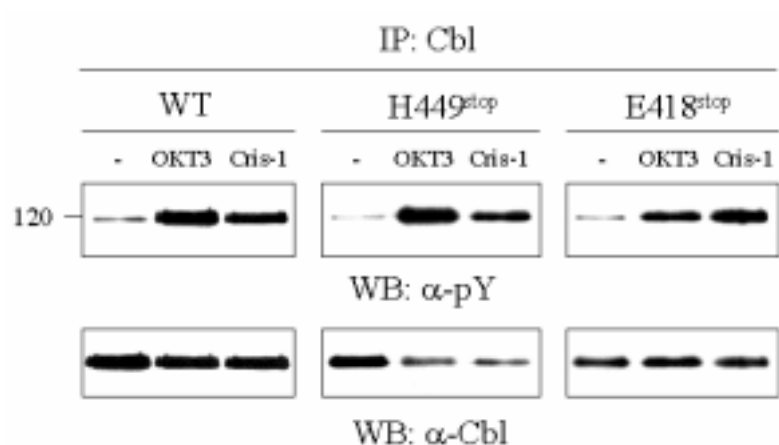


Figura IV.4.4 La delección de los dos últimos tercios citoplasmáticos de CD5 no afecta en la fosforilación de Cbl vía CD5. Células Jurkat deficientes en CD5 (clona 2G5) se transfectoron con la secuencia silvestre de CD5 (WT) y con dos versiones mutadas del mismo (H449^{stop} y E418^{stop}). Los transfectantes se estimularon con mAb anti-CD5 (Cris-1), con mAb anti-CD3 (OKT3) o con medio de cultivo (-), y se lisaron en el tampón de lisis TritónX-100. Los lisados se inmunoprecipitaron con antisuero policlonal anti-Cbl, se resolvieron por SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Los contenidos en fosfotirosina y Cbl de los mismos se analizaron por *western blot* con mAb PY99 y anticuerpos policlonales anti-Cbl (α -pY y α -Cbl, respectivamente).

región citoplasmática (H449^{stop} y E418^{stop}) (fig. IV.4.3). Cada transfectante se estimuló con mAb anti-CD5 o mAb anti-CD3 y se analizó su habilidad para la fosforilación de c-Cbl (fig. IV.4.4). Los niveles de c-Cbl fosforilado en el transfectante WT son comparables a los que se observan en células Jurkat sin transfectar (fig. IV.4.2A), por lo que válida la utilización de los transfectantes de CD5 H449^{stop} y E418^{stop} en este estudio. En la figura IV.4.4 se puede observar como en ambos transfectantes c-Cbl es fosforilado a través de CD5 en unos niveles muy similares a los que aparecen vía CD3. Esto indica que ninguna de las dos delecciones realizadas sobre la molécula de CD5 son suficientes para anular la fosforilación de c-Cbl. Por lo tanto, en las 2/3 partes C-terminales de la cola citoplasmática de CD5 no se encuentran los sitios responsables de la fosforilación de c-Cbl a través de CD5, abriendo la posibilidad que el primer tercio citoplasmático o la región transmembrana de CD5 contengan tales sitios.

5. ACTIVADOR DE UNA SERIN/TREONINCINASA ASOCIADA:

La región citoplasmática de CD5 más proximal a la membrana se asocia y es sustrato de una actividad serin/treonincinasa inducible

Resumen. Se ha descrito una actividad serin/treonincinasa, todavía sin identificar, asociada a los inmunoprecipitados de CD5, detectable a través de ensayos de cinasa *in vitro*. La estimulación con anti-CD5 o anti-CD3 induce un rápido aumento de su actividad cinasa que se correlaciona con un incremento en la fosforilación de CD5. En este trabajo demostramos que la cinasa está asociada específicamente a la región citoplasmática de CD5 más proximal a la membrana, puesto que la delección de los primeros 40 aa citoplasmáticos es suficiente para impedir su fosforilación. Además, demostramos que los sitios diana para la cinasa se encuentran en esta región, así como a lo largo de toda la cola citoplasmática.

Nuestro grupo describió con anterioridad la asociación a CD5 de una actividad serin/treonincinasa todavía pendiente de caracterización [111]. Esta cinasa co-immunoprecipita con CD5 y fosforila el propio CD5 en ensayos *in vitro* de fosforilación, por lo que CD5 es receptor y sustrato a la vez. Presenta una actividad basal, pero que es considerablemente aumentada tras la estimulación con mAb anti-CD5 y mAb anti-CD3. En el presente trabajo se ha avanzado en la caracterización de esta cinasa, localizando sus sitios de asociación y de fosforilación a CD5.

5.1 Anticuerpos anti-CD5 co-immunoprecipitan una actividad cinasa inducible

Con la intención de comprobar la descrita asociación de una cinasa a la región citoplasmática de CD5, realizamos ensayos de fosforilación *in vitro* a partir de inmunoprecipitados de CD5. Para ello, estimulamos células Jurkat vía CD5 y vía CD3 con mAb Cris-1 y mAb OKT3, respectivamente. Estas células fueron lisadas e inmunoprecipitadas con Cris-1. Los inmunoprecipitados de CD5 fueron posteriormente incubados 15 min a 4°C en presencia de [γ -³²P]ATP y lavados, para eliminar el ATP no incorporado. Las proteínas resultantes se sometieron a electroforesis en un gel SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se

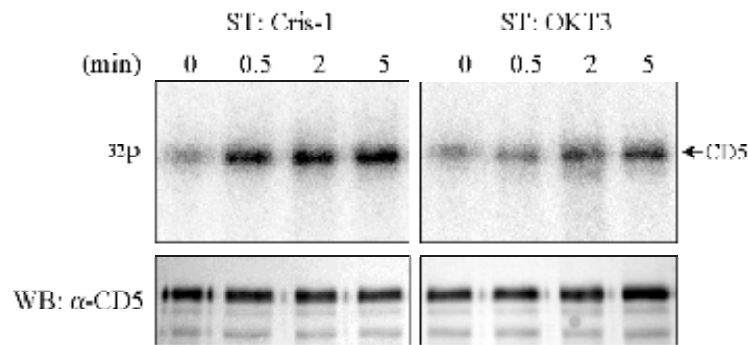


Figura IV.5.1 Inmunoprecitados de CD5 están asociados a una actividad cinasa inducible vía CD5 y vía CD3. CD5 fue inmunoprecitado de lisados de células Jurkat estimuladas con Cris-1 (mAb anti-CD5) y OKT3 (mAb anti-CD3ε) a diferentes tiempos. Los inmunoprecitados se sometieron a un ensayo de cinasa *in vitro* en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Posteriormente los niveles de fósforo radioactivo incorporado se analizaron por autorradiografía, y la cantidad de CD5 inmunoprecitado se controló en cada carril por *western blot*.

autorradiografiaron. Tal y como se observa en la figura IV.5.1, CD5 aparece correctamente fosforilado tras el ensayo y confirma así la existencia de una actividad cinasa que co-precipita con el receptor. En estado basal la cinasa es semi-activa, puesto que sin estimulación CD5 presenta ya niveles detectables de fosforilación (fig. IV.5.1). Estos niveles aumentan rápidamente de intensidad (detectable a 0,5 min) tras la estimulación con anti-CD5 y anti-CD3, siendo la primera más eficiente (fig. IV.5.1). Estos resultados demuestran, por lo tanto, que existe una cinasa asociada a los inmunoprecitados de CD5, y que es inducible a través de los receptores CD5 y TCR/CD3.

Para descartar que la actividad cinasa provenga de la propia molécula de CD5, realizamos experimentos parecidos en los cuales los inmunoprecitados de CD5 se lavaron antes del ensayo con concentraciones altas de sal (0,5 M NaCl). En este caso, CD5 presentó niveles de fosforilación considerablemente más reducidos que en situaciones paralelas de lavado normal (fig. IV.5.2). Este resultado demuestra que la actividad cinasa no es intrínseca a la región citoplasmática de CD5, sino co-precipita con él. Todos estos datos confirman resultados previos obtenidos por nuestro grupo [111].

También fueron analizadas células Jurkat JCAM1 y JRT3, las cuales son deficientes en la expresión de la proteína tirosincinasa Lck y del complejo receptor antigénico TCR, respectivamente. En ambas células,

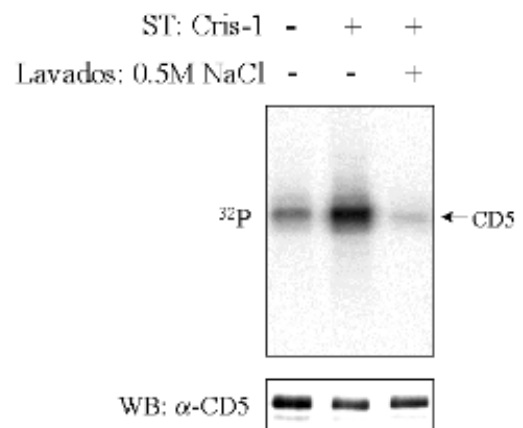


Figura IV.5.2 La fosforilación de CD5 depende de la asociación de la actividad cinasa a los inmunoprecitados de CD5. Células Jurkat fueron estimuladas con Cris-1, lisadas e inmunoprecitadas con anti-CD5. La mitad de los inmunoprecitados fueron lavados con tampón de lisis, y la otra mitad con tampón de lisis conteniendo 0,5 M NaCl. Posteriormente, se realizaron ensayos de cinasa *in vitro* sobre los inmunoprecitados en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, y se analizaron por autorradiografía los niveles de radioactividad incorporada a CD5.

CD5 también aparece fosforilado *in vitro* y su actividad cinasa asociada mantiene una cinética de activación muy similar a la de células Jurkat originales (fig. IV.5.3). Este resultado indica que la cinasa no requiere una actividad tirosincinasa como Lck para ser activada, ni que dependa de la presencia en la membrana del complejo receptor antigénico TCR/CD3. Por lo tanto, la cinasa asociada se comportaría como un elemento de la propia maquinaria de señalización de CD5.

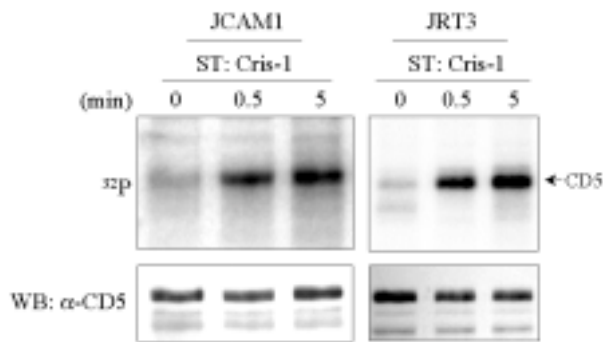


Figura IV.5.3 La asociación de la actividad cinasa con CD5 es independiente de la expresión celular de Lck y TCR. Células Jurkat deficientes en Lck (JCAM1) y en el complejo receptor antigénico (JRT3) se estimularon con anti-CD5 (Cris-1) y anti-CD3 (OKT3) en los tiempos indicados. CD5 se inmunoprecipitó de los lisados y se ensayo *in vitro* su asociación a la actividad cinasa. Los niveles de radioactividad incorporada a CD5 se analizaron por autorradiografía.

5.2 La actividad cinasa se asocia al tercio citoplasmático de CD5 más proximal a la membrana

Para determinar los sitios de asociación y fosforilación de la actividad cinasa, se analizaron una serie de células Jurkat CD5⁻ (2G5) transfectadas con moléculas mutantes de CD5 conteniendo diferentes deleciones y/o mutaciones puntuales en su región citoplasmática (fig. IV.5.4). Se realizaron ensayos de cinasa *in vitro* para

cada transfectante previamente estimulados o no con Cris-1 (anti-CD5). Los niveles de fosforilación encontrados para la molécula WT fueron similares a los encontrados para CD5 endógeno en células Jurkat normales (fig. IV.5.5A), validando así la utilización de los transfectantes en el estudio. Los mutantes H449^{stop}, Δ(E418-L444) y E418^{stop} también se fosforilaron tras la incubación de sus inmunoprecipitados con ATP radioactivo (fig. IV.5.5A). No obstante, los niveles de fosforilación de las moléculas H449^{stop} y Δ(E418-L444) fueron considerablemente mayores que E418^{stop}, cuya cola citoplasmática fue reducida a 40 aa yuxtamembranales. Estas diferencias indican que los sitios de fosforilación para la cinasa no se concentran exclusivamente en los primeros 40 aa citoplasmáticos, sino que se reparten a lo largo de toda la región citoplasmática de CD5. En cambio, por lo que respecta a los sitios de asociación, parece que estos si se encuentran en estos primeros 40 aa de la región citoplasmática de CD5. Esto se deduce al analizar el mutante Δ(K384-A417) que, aún conservando dianas de fosforilación para la cinasa, no presenta niveles detectables de fosforilación, ni basal, ni inducible (fig. IV.5.5B). Por lo tanto, el tercio citoplasmático más

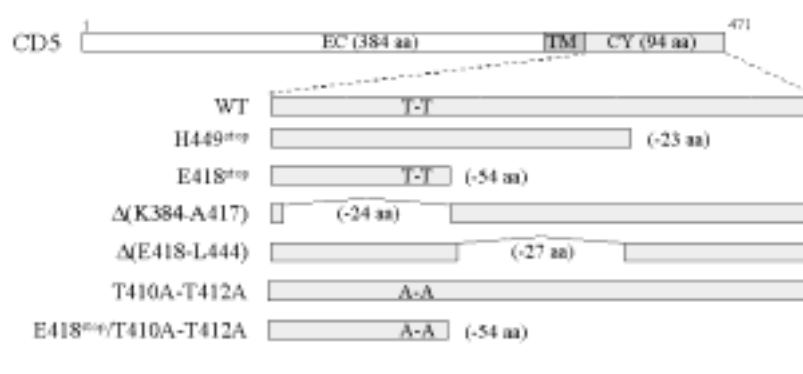


Figura IV.5.4 Representación esquemática de la región citoplasmática de CD5 de las moléculas mutantes utilizadas en este trabajo. Los mutantes por deleción del extremo C-terminal de la región citoplasmática (H449^{stop} y E418^{stop}) se nombran con el aminoácido sobre el cual se ha añadido un codón *stop* prematuro, y por su posición en la secuencia completa de CD5. Los mutantes por deleción interna (Δ(K384-A417); Δ(E418-L444)) se nombran con el primer y último aminoácido delecionado y su posición en la secuencia completa de CD5. La posición de los residuos serina, treonina y tirosina en la secuencia aminoacídica del dominio citoplasmático de CD5 se muestra más arriba. La posición de los residuos en motivos consenso de fosforilación para diferentes cinasas es indicada por flechas. EC, extracelular; CY, citoplasmático; TM, transmembrana.

proximal a la membrana de CD5 es responsable de la asociación de la cinasa y de la consecuente fosforilación de toda la molécula. De estos experimentos se deduce, además, que la asociación de la cinasa a CD5 es específica y probablemente directa.

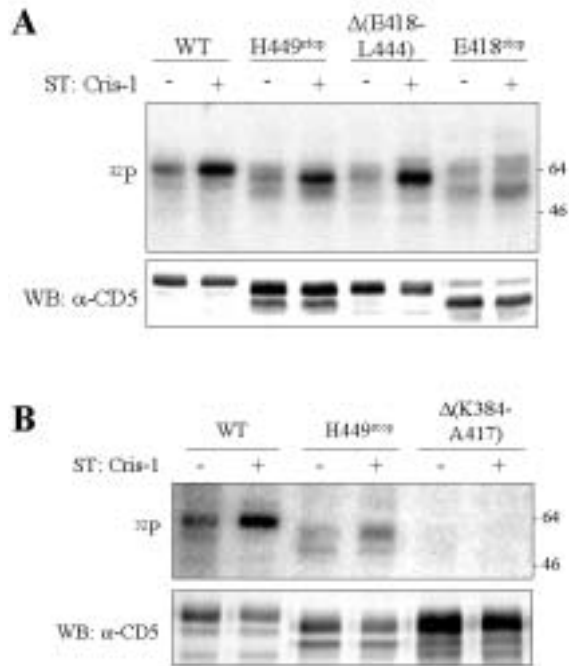


Figura IV.5.5 La actividad cinasa se asocia físicamente con los primeros 40 aminoácidos N-terminales de la región citoplasmática de CD5. **(A y B)** Células Jurkat 2G5 (CD5⁺) transfectadas con construcciones mutantes para la región citoplasmática de CD5 se estimularon con Cris-1 durante 2 min y se lisaron. La asociación de la actividad cinasa a los inmunoprecipitados de CD5 de los lisados se analizó mediante ensayos de fosforilación *in vitro*. Los niveles de radioactividad incorporada a CD5 se detectaron por autorradiografía.

Finalmente, también, se analizaron mutantes puntuales para las treoninas T410 y T412 (fig. IV.5.6). La sustitución de estos residuos por alanina en la región citoplasmática de la molécula WT no altera los niveles de fosforilación de CD5 tras el ensayo. En cambio, la mutación puntual de estos residuos en la molécula E418^{stop} es suficiente para impedir la fosforilación de la molécula. Por lo tanto, los residuos T410 y/o T412 son sitios diana para la cinasa, aunque no los únicos en el resto de la región citoplasmática.

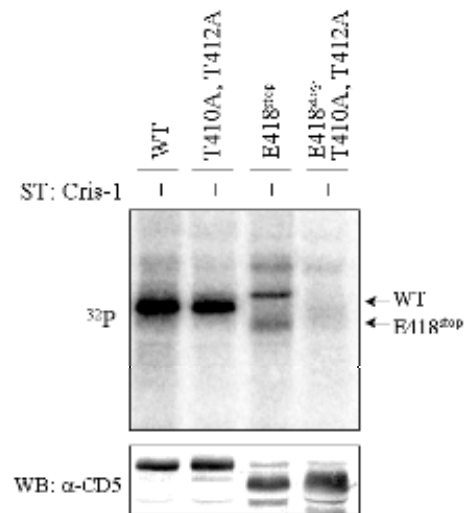


Figura IV.5.6 La mutación puntual de los residuos T410 y T412 impide la fosforilación de la región citoplasmática de CD5 más proximal a la membrana. Células Jurkat 2G5 transfectadas con construcciones mutantes para la región citoplasmática de CD5 se estimularon con Cris-1 durante 2 min y se lisaron. CD5 fue inmunoprecipitado de los lisados y los inmunoprecipitados se sometieron a un ensayo de cinasa *in vitro* en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Posteriormente los niveles de fósforo radioactivo incorporado se analizaron por autorradiografía, y la cantidad de CD5 inmunoprecipitado por *western blot*.

V. DISCUSIÓN

Los linfocitos, al igual que todas las células eucariotas, se comunican con su medio colindante a través de una serie de receptores anclados en su superficie membranal. Estos receptores, solos o en combinación con otros, se encargan de reconocer específicamente estímulos externos y de transmitirlos hacia el interior celular. Concretamente, convierten una señal física extracelular (unión ligando-receptor) en una señal bioquímica intracelular (activación de cascadas enzimáticas) que finalizará en una respuesta celular concreta. Entre la diversidad de respuestas celulares a cambios externos se incluye la entrada de nutrientes e iones, la regulación de la síntesis de proteína y DNA, y la decisión acerca de la proliferación o muerte celular. La conversión de una señal en otra se conoce como transducción de la señal y está mediada por numerosos mecanismos que implican la modificación funcional de enzimas u otras proteínas y lípidos preexistentes. Un mecanismo fundamental en la regulación de la actividad y la función de numerosas proteínas en las células eucariotas son los ciclos de fosforilación-defosforilación. Prueba de ello es que la activación de los linfocitos T, mediada por un amplio espectro de agentes exógenos (antígeno específico, ésteres de forbol, lectinas mitogénicas, anticuerpos monoclonales anti-CD3, etc.), induce la fosforilación de un gran número de proteínas intracelulares. Dicha fosforilación se produce a través de la actividad fosfotransferasa que poseen ciertas enzimas denominadas cinasas. Básicamente, existen dos tipos de cinasas, dependiendo de si su actividad

fosfotransferasa se manifiesta a nivel de residuos serina y/o treonina (serin/treonincinasa), o bien de residuos tirosina (tiosincinasa). Una subdivisión idéntica también es aplicable a otro grupo de enzimas celulares, las fosfatasa, encargadas de defosforilar los substratos diana de las cinasas.

En el presente trabajo de tesis aportamos nuevas evidencias que reafirman la importancia de los procesos de fosforilación-defosforilación en la señalización intracelular mediada por el receptor linfocitario CD5. Por una parte, demostramos que éste es fosforilado específicamente por cinasas activadas vía TCR, y que tal fosforilación es importante para que CD5 inicie una respuesta celular concreta en el contexto de la activación linfocitaria. Por otra parte, demostramos que CD5 induce, por si mismo, la activación de cinasas intracelulares y la fosforilación de moléculas señalizadoras, promoviendo así una respuesta celular específica. Finalmente, presentamos evidencias a favor de la relevancia de las interacciones proteína-proteína en la señalización de CD5. En este sentido demostramos la asociación a la región citoplasmática de CD5 de moléculas implicadas en la transducción de señales, como cinasas y proteínas del citoesqueleto,

1- Fosforilación constitutiva de CD5

CD5 es una molécula que se encuentra constitutivamente fosforilada [106, 110]. La utilización de un inhibidor específico de CKII (heparina), así como ensayos de fosforilación *in vitro* con substratos

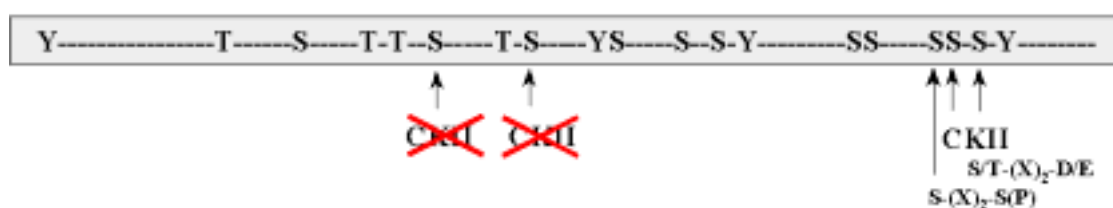


Figura V.1. Representación esquemática de la región citoplasmática de CD5. Se indican con una flecha los residuos serina inmersos en motivos de fosforilación para CKII. Las serinas en las posiciones 415 y 423 no son dianas de fosforilación para CKII, por lo que el nombre "CKII" ha sido tachado. Las serinas en las posiciones 458, 459 y 461 son los únicos sitios sustrato de fosforilación para CKII.

peptídicos, permitió identificar a esta cinasa como la posible responsable de su fosforilación constitutiva [107]. CKII es una serin/treonincinasa ubicua y pleiotrópica, que existe como un tetrámero ($\alpha_2\beta_2$) de subunidades catalíticas (α) y reguladoras (β). Esta enzima es activa de forma basal y está implicada en la regulación de múltiples funciones celulares [199]. Así, CKII fosforila y regula la función de diversas proteínas celulares importantes, tales como factores de transcripción [200-203], proteínas del citoesqueleto [204, 205], y receptores de membrana [206, 207].

En la región citoplasmática de CD5 existen 5 residuos serina inmersos en motivos consenso de fosforilación para CKII ([S/T-X-X-D/E] y [S-X-X-S(P)]) (fig.V.1). A pesar que todos ellos *a priori* son potencialmente fosforilables por esta enzima, hemos podido comprobar que la fosforilación *in vitro* de CD5 por CKII tienen lugar exclusivamente en la región más carboxiterminal, donde se encuentran tres de los motivos (posiciones 458, 459 y 461) (fig. IV.1.2).

De acuerdo con nuestro resultado *in vitro*, nuestro grupo demostró previamente en experimentos *in vivo* que las serinas carboxiterminales S458, S459 y S461 son dianas

únicas de CKII y residuos responsables de la fosforilación constitutiva de CD5 [107]. Como se discutirá más adelante, en esta fosforilación constitutiva posiblemente juegue un papel muy importante la capacidad de CD5 de asociarse a la subunidad β de CKII. Se desconocen los motivos por los cuales las serinas en las posiciones 415 y 423 no son sustrato de CKII aún manteniendo el motivo de fosforilación (fig. V.1). Quizás la causa se debe buscar en la conformación de la propia molécula que hace inaccesibles estas serinas a la fosforilación de la cinasa.

2- Fosforilación inducible de CD5

Tras la activación linfocitaria, muchas y distintas cinasas son activadas de forma selectiva para mediar respuestas celulares concretas. La activación de estas enzimas resulta en la fosforilación de distintas moléculas intracelulares implicadas en la transducción de señales. Diversos estudios han demostrado que, bajo estímulos que mimetizan la activación celular vía TCR, CD5 es sustrato de serin/treonincinasas [109-111] y tirosincinasas [112, 113, 132]. Una de las posibles consecuencias de la modificación de CD5 por adición de

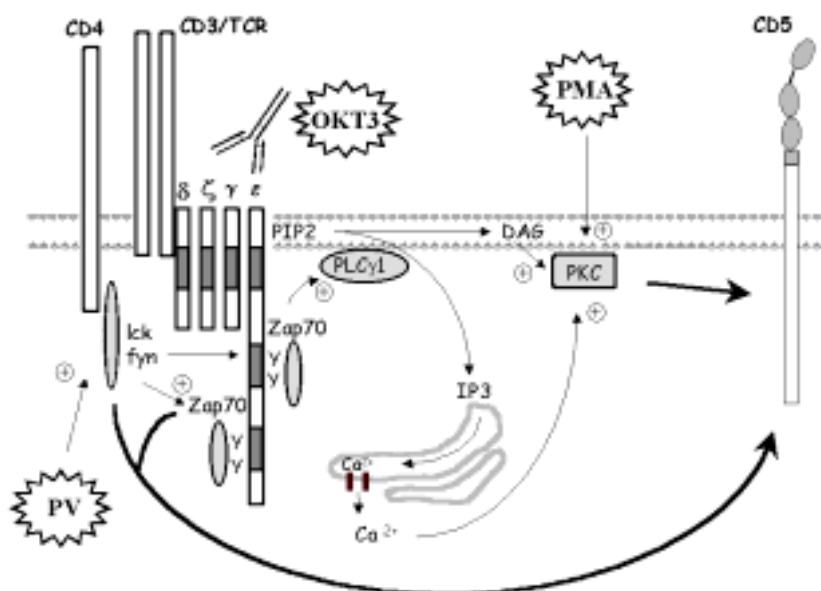


Figura V.2. Niveles de actuación de los estímulos utilizados en este trabajo.

grupos fosfato a su región citoplasmática es la de promover el anclaje y activación de moléculas implicadas en la transducción de señales. Así, diversos trabajos han aportado evidencias a favor de la asociación de CD5 tirosinfosforilado a diferentes moléculas señalizadoras como Lck [143, 144], ZAP-70 [145], p21-TCR ζ (moléculas TCR ζ con sus ITAMs monofosforilados) [145], p85 α -PI3-K [143, 146], y ras GAP (proteína activadora de la GTPase ras) [147] y c-Cbl [147]. Por esto, la fosforilación inducible de CD5 es sin duda un mecanismo crítico para su función señalizadora durante la activación linfocitaria.

En este trabajo se ha profundizado en la caracterización de la fosforilación inducible de CD5, identificando residuos y cinasas implicadas, y posibles implicaciones funcionales. Para ello hemos utilizado tres estímulos distintos que mimetizan la activación linfocitaria: OKT3 (anticuerpo monoclonal contra la cadena invariable CD3 ϵ del complejo TCR), PMA (éster de forbol) y pervanadato (Na₃VO₄). Todos ellos son estímulos suprafisiológicos que actúan a diferentes niveles en la cascada de señalización del TCR (fig. V.2). Los anticuerpos anti-CD3 constituyen el sistema más parecido al fisiológico, puesto que actúan a nivel del propio receptor antigénico, remediando el contacto MHC/antígeno con el TCR. PMA se caracteriza por poseer una estructura química muy similar a la del DAG, confiriéndole la capacidad de unir y activar la serin/treonincinasa PKC [208, 209]. Por este motivo, la estimulación con PMA mimetiza la señalización del TCR en una fase más tardía, es decir, a partir de la activación de PKC (fig. V.2). El pervanadato es un agente muy reductor que inhibe de forma generalizada tirosinfosfatasa (PTP), induciendo la fosforilación en tirosinas de numerosas proteínas intracelulares. De esta manera, es un estímulo que simula la activación de PTKs mediada por el receptor antigénico tras el contacto con el antígeno (fig. V.2).

A continuación se hace una discusión detallada de los resultados obtenidos sobre la fosforilación inducible de CD5 por distintas cinasas:

2-1) Fosforilación de CD5 por PKC. La estimulación celular con PMA induce la hiperfosforilación de CD5 [109], fundamentalmente en residuos serina [106, 110]. En el presente trabajo, demostramos que dicha hiperfosforilación es dependiente de la región citoplasmática de CD5 más proximal a la membrana (fig. IV.2.2A), concretamente de los residuos T410 y T412 (fig. IV.2.4), y de la correcta activación de la serin/treonincinasa PKC (fig. IV.2.2B).

El análisis de la secuencia aminoacídica de la región citoplasmática de CD5 muestra la existencia de 5 sitios consenso de fosforilación para PKC: dos treoninas yuxtamembranales (T410 y T412) y tres serinas (S436, S439 y S452) (fig. I.7). Ensayos de PKC *in vitro* confirman que CD5 es un buen sustrato para esta cinasa (fig. IV.2.3A), y que T410 y T412 son las únicas dianas en la región más proximal a la membrana (fig. IV.2.3B), aunque no en toda la región citoplasmática (fig. IV.2.Anexo). Esto indica que posiblemente las serinas 436, 439 y 452 también sean sitios accesibles por PKC. En estudios *in vivo*, comprobamos, no obstante, que la doble sustitución T410A y T412A es suficiente para anular completamente la fosforilación de CD5 inducida por PMA (fig. IV.2.A), sugiriendo que las serinas 436, 439 y 452 no participan en la fosforilación *in vivo* por PKC de la molécula de CD5. De todas maneras, esto estaría en desacuerdo con la fosforilación en serinas de CD5 descrita tras la estimulación con PMA mediante el análisis de fosfoaminoácidos resultantes [106, 110]. Por esto, nosotros creemos que la fosforilación de T410 y T412 podría inducir cambios conformacionales en la molécula que permitieran la accesibilidad posterior de S436, S439 y S452 a la fosforilación por PKC (fig. V.3). De hecho, se han descrito cambios en la movilidad electroforética de CD5 dependientes de fosforilación tras la estimulación con PMA [110]. Por lo tanto, la fosforilación de CD5 por PKC podría ser el resultado de dos pasos secuenciales (fig. V.3), en los cuales los residuos T410 y T412 tendrían un papel crítico y decisivo.

La región evolutivamente más conservada en toda la secuencia citoplasmática de CD5 es justamente la yuxtamembranal y que contiene los residuos T410 y

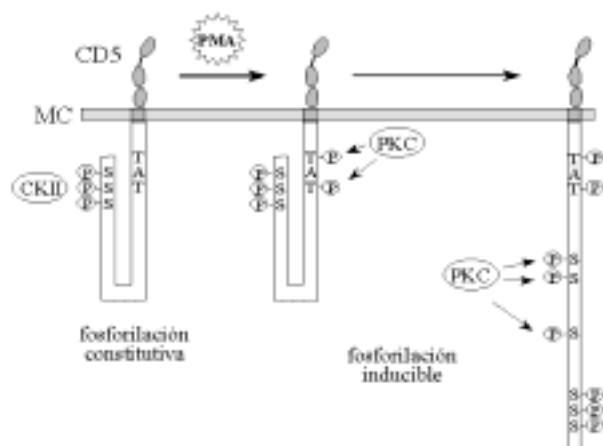


Figura V.3. Modelo hipotético de la fosforilación inducible de CD5 por PMA. La molécula CD5 está constitutivamente fosforilada por CKII a nivel de tres residuos serina carboxiterminales. Tras la estimulación con PMA, T410 y T412 son rápidamente fosforiladas por PKC, siendo los otros residuos potenciales no accesibles por la cinasa. La fosforilación de T410 y T412 genera un cambio conformacional en la molécula que posibilitaría el acceso de PKC a las serinas anteriormente escondidas, y su rápida fosforilación.

T412 (82% homología a nivel de aminoácidos entre diferentes especies de mamíferos), asignando *a priori* a esta región un papel funcional importante [91, 92]. Nosotros demostramos en este trabajo la relevancia funcional de esta región, y más concretamente de los residuos T410 y T412, a través de su implicación en la activación de la fosfolipasa PC-PLC mediada por CD5. Hemos comprobado que la doble sustitución T410→A y T412→A impide la generación de DAG inducida por CD5 (fig. IV.2.5). El hecho que la sustitución por alanina de las serinas S459 y S461 también anule la producción de DAG [107], sugiere que la integridad de los residuos responsables tanto de la fosforilación constitutiva (S458, S459 y S461) como de la inducible (T410 y T412) sea necesaria para la generación de segundos mensajeros lipídicos mediados por CD5. Por lo tanto, los sucesos relacionados con la fosforilación juegan un importante papel en el acoplamiento de CD5 con la vía de señalización PC-PLC/A-SMasa (fig. I.9).

2-2) Fosforilación de CD5 por PTKs. Como consecuencia de la estimulación del receptor antigénico se produce una rápida y transitoria activación de PTKs, induciendo la fosforilación en tirosinas de numerosos substratos celulares, entre los cuales se incluye CD5 [112, 113]. En este trabajo demostramos que la fosforilación en tirosinas de CD5 se localiza preferencialmente a nivel de los residuos Y429 y Y463 (fig. IV.3.3). Por contra, las otras dos tirosinas presentes en la región citoplasmática de CD5 (Y378 y Y441) no contribuyen en nada o lo hacen de forma despreciable (fig. V.4). Esto está de acuerdo con la idea de que, normalmente, la tirosina aceptora de fosfato está cerca de residuos ácidos [210]. Son las tirosinas 429 y 463, pero no las tirosinas 378 y 441, las que están flanqueadas por residuos ácidos (DXEY⁴²⁹ y DXDY⁴⁶³D). Además, la secuencia colindante de Y429 (DNEY⁴²⁹SQP) es similar a la del sitio de autofosforilación (DNEY⁴²⁹TAR) de las PTKs de la familia Src [105]. Mediante ensayos de fosforilación *in vitro*, demostramos también que CD5 es un buen substrato de PTKs de la familia Src, como Lck y Fyn, y que las tirosinas 429 y 463 son las únicas dianas accesibles para ambas cinasas (fig. IV.3.4). El hecho que los ensayos de cinasa *in vitro* con Lck y Fyn coincidan con los experimentos *in vivo* en cuanto a los residuos implicados, sugiere que ambas cinasas sean las responsables de la fosforilación en tirosinas de CD5 mediada por TCR. No obstante, la baja eficiencia de fosforilación de la cola citoplasmática de CD5 por Fyn (fig. IV.3.4), junto con la predominante distribución perinuclear de esta cinasa [211], hace poco probable su contribución a la fosforilación de CD5 *in vivo*. De acuerdo con esto, no se detecta fosforilación en tirosinas sobre CD5 en células deficientes en Lck (JCAM1) (fig. IV.3.5), indicando que Lck es la principal, sino la única, PTK implicada en la fosforilación de CD5. No obstante, no se debería descartar la contribución de otras PTK, puesto que se ha descrito que las células JCAM1 expresan niveles bajos de Fyn endógeno [212]. Además, la activación de Lck es el primer paso en la transducción de señales de TCR [213] y existen cinasas

dependientes de Lck, como ZAP-70 [19], que pueden quedar inactivas en células JCAM1.

Los residuos Y429 y Y441 están integrados en un motivo ITAM-like [E-X₇-D-X₂-Y⁴²⁹-X₂-P-X₆-Y⁴⁴¹-X₂-L], muy similar a los ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) de moléculas señalizadoras, tales como las del complejo receptor antigénico CD3 y TCR ζ [D/E-X₇-D/E-X₂-Y-X₂-L-X₆₋₈-Y-X₂-L] [101]. Los motivos ITAM son funcionales en el momento en que sus dos tirosinas son fosforiladas, constituyendo entonces sitios de anclaje para los dominios SH2 de la tirosincinasa ZAP-70. Por lo tanto, la fosforilación de Y429 (fig. IV.2.3), pero no de Y441, invalida la función de la secuencia ITAM-like de CD5 como un verdadero ITAM (fig. V.4). De hecho, la secuencia ITAM-like de CD5 no está codificada por un único exón [118], tal y como lo están los ITAM clásicos. De esta manera, el motivo ITAM-like no representa un sitio potencial de anclaje para ZAP-70 (fig. V.4). En este sentido, la recientemente descrita presencia de ZAP-70 en los inmunoprecipitados de CD5 [145] debería ser atribuida a la presencia adicional de cadenas ζ p21 del complejo TCR asociadas a CD5. De hecho, los mismos autores demuestran que no hay asociación entre ZAP-70 y CD5 en timocitos CD3⁺ [145]. Además, experimentos recientes *in vitro* demuestran que los dominios SH2 de ZAP-70 en tándem se unen a ζ y no a CD5 [143].

De forma similar, la tirosina 378 está integrada en una secuencia ITIM-like [LAY³⁷⁸KKL] que recuerda al motivo de inhibición ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) de algunos inmunoreceptores [S/L/I/V-X-Y-X₂-L/I] [102]. Los motivos ITIM son funcionales cuando la tirosina es fosforilada y constituyen entonces sitios de asociación de tirosinfosfatasa con dominios SH2, como SHP-1 (*Src homology 2 domain-bearing protein phosphatase-1*). En relación con esto, diversos trabajos han demostrado la asociación de SHP-1 con CD5 en timocitos murinos [150], células B1-a murinas [151], células Jurkat humanas [152] y linfoblastos T estimulados con fitohemaglutinina [152]. Uno de estos trabajos demuestra, además, que esta asociación se localiza concretamente a nivel de Y378, y propone que

esta tirosina podría ser la responsable de la capacidad moduladora negativa de CD5 [152]. No obstante, la no fosforilación de Y378 descrita por nosotros (fig. IV.2.3) (y también por otro grupo [214]) va en contra de la función de la secuencia ITIM-like de CD5 como un verdadero ITIM y, por lo tanto, de que la asociación de SHP-1 a CD5 tenga lugar en la tirosina 378 (fig. V.4). De acuerdo con nuestro resultado, un estudio reciente ha demostrado que una forma transgénica de CD5 sin cola citoplasmática, pero que retiene la Y378, carece de la capacidad de regular negativamente las señales mediadas por TCR [142]. Asimismo, se ha descrito que la inhibición mediada por CD5 sobre la señalización del BCR requiere la presencia de las tirosinas 429 y 441 inmersas en el motivo ITAM-like de CD5, mientras que Y378 es completamente dispensable [153]. De acuerdo con esto último, recientemente se ha descrito la interacción *in vitro* de la proteína inhibitoria de Ras, rasGAP (*GTPase-activating protein for Ras*), a la tirosina

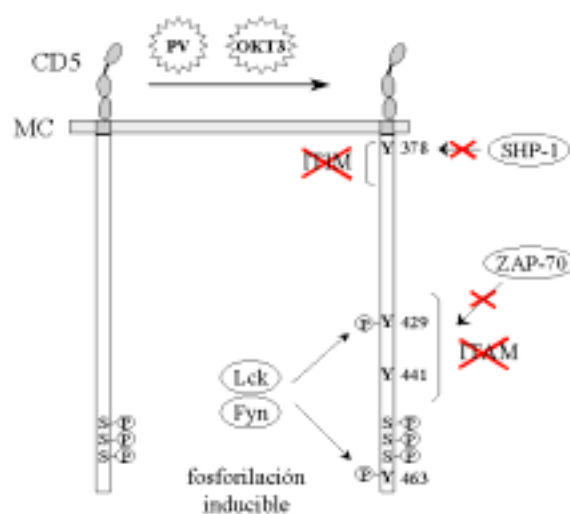


Figura V.4. Modelo hipotético de la fosforilación en tirosinas de CD5 inducible por pervanadato (PV) y anti-CD3 mAbs (OKT3). CD5 está constitutivamente fosforilado por CKII. La estimulación con PV o OKT3 induce la rápida fosforilación sobre los residuos Y429 e Y463 de la cola citoplasmática de CD5. La no fosforilación de Y378 y de Y441 invalida la existencia motivos ITIM e ITAM en CD5, y por lo tanto hace improbable la asociación de la fosfatasa SHIP-1 y de la tirosincinasa ZAP-70, respectivamente.

429 fosforilada [147], que cumple perfectamente el motivo de anclaje a rasGAP [pY-X-X-P] [197]. A través de la fosforilación de esta tirosina, CD5 podría entonces reclutar rasGAP e inhibir la vía de señalización del receptor antigénico.

A pesar que CD5 no presente dominios funcionales ITAM-like, ni ITIM-like, esto no invalida CD5 como una molécula capaz de reclutar moléculas señalizadoras vía interacciones mediadas por fosfotirosinas. De hecho, se ha probado que los dominios SH2 de Lck, rasGAP y PI3-K se unen eficientemente a fosfopéptidos conteniendo los residuos Y429 y Y463 [143, 147]. Estos trabajos apoyan la hipótesis de que la fosforilación de Y429 y Y463 es relevante para la señalización de CD5, dado que generan puntos de anclaje especializados en el reclutamiento de elementos señalizadores con dominios de unión a fosfotirosina.

3- Interacción de CD5 con CKII

El sistema del *yeast two-hybrid* nos permitió encontrar una asociación entre el extremo C-terminal de la región citoplasmática de CD5 (del residuo L444 hasta el L471) y la subunidad β de CKII (fig. IV.1.3). Esta interacción fue posteriormente confirmada por la precipitación de la subunidad CKII β mediante la proteína de fusión CD5-GST (fig. IV.1.4). Dado que CKII es activa de forma basal, la interacción de CKII con CD5 muy probablemente resulte en la fosforilación automática del receptor dando lugar a la fosforilación constitutiva del mismo (fig. V.5). En la localización de los sitios de interacción, demostramos que las serinas C-terminales de CD5, dianas para CKII, son relevantes, pero no esenciales para la unión con CKII β (fig. IV.1.5), de una forma similar a la interacción de CKII β con la proteína supresora del crecimiento p53 [215]. Justamente, todos los residuos de CD5 implicados en la interacción con CKII β (L444 hasta L471) están codificados por un único exón (exón 10 [118]) y se encuentran altamente conservados entre especies de mamíferos [160] y no mamíferos [216]. Esto sugiere que esta región constituye una unidad funcionalmente relevante en la cola citoplasmática de CD5.

En este estudio, no fuimos capaces de demostrar inequívocamente que la mayoría de las moléculas de CD5 están asociadas establemente con CKII en la superficie de las células T. Ensayos por *western blot* no revelaron la presencia de la subunidad CKII α asociada a los inmunoprecipitados de CD5 (datos no presentados). Una explicación posible para esto es que la asociación de CKII con CD5 es transitoria. Esta asociación podría ocurrir durante la biosíntesis de CD5 en el retículo endoplasmático rugoso, o una vez exportado a la membrana.

Con todos nuestros datos, nosotros proponemos un modelo secuencial de tres pasos (asociación, fosforilación y disociación), en el cual la subunidad β reguladora de CKII acercaría la subunidad α catalítica a CD5, permitiendo la fosforilación de las serinas carboxiterminales (fig. V.5).

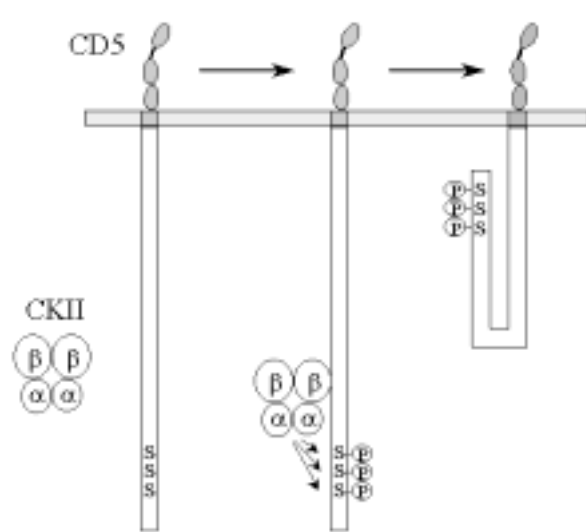


Figura V.5. Modelo hipotético de la asociación, fosforilación y disociación de CKII ($\alpha_2\beta_2$) sobre CD5. La subunidad reguladora β de CKII se asocia a la región carboxiterminal de CD5. Seguidamente, la subunidad catalítica α fosforila las serinas 458, 459 y 461, y se disocia de CD5.

4- Interacción de CD5 con proteínas del citoesqueleto

Cada vez es más claro que las interacciones establecidas por los receptores de membrana con el citoesqueleto son muy importantes en los procesos de activación linfocitaria [12, 217]. Una forma de abordar este problema es a través del estudio de los mecanismos que gobiernan la internalización de los receptores de membrana, en los cuales está íntimamente implicado el citoesqueleto. En este sentido, nuestro grupo demostró anteriormente que mecanismos dependientes de la activación de PKC y de la polimerización de actina, distintos de los usados por TCR/CD3, regulan la internalización de CD5 [218]. En ese trabajo, se demostraba que el tratamiento con citocalasina D o ésteres de forbol (agentes que bloquean la polimerización de los microfilamentos de actina) inhibe la internalización de CD5 [218]. En el presente trabajo de tesis, hemos profundizado en este estudio y hemos localizado dos residuos treonina (T410 y T412) que regularían la tasa de internalización de CD5 a través de mecanismos dependientes de fosforilación vía PKC. Demostramos que las sustituciones T410A y

T412A revierten los efectos inhibitorios de la PMA sobre la internalización de CD5 (fig. IV.2.6). Por lo tanto, estos residuos, que son fosforilados por PKC (ver apartado 2-1), podrían constituir centros importantes de interacción de CD5 con el citoesqueleto. Por otro lado, dado que la estimulación del receptor antigénico induce la activación de PKC [219] y esto favorecería la retención de CD5 en la membrana celular durante la activación linfocitaria, confirmaría el papel relevante de CD5 en la respuesta inmunitaria de célula T.

Otra evidencia sobre la interacción de CD5 con el citoesqueleto, se obtuvo tras comprobar que la internalización de CD5 se produce a través de vesículas de clatrina (fig. V.6) y que requiere una pequeña región yuxtamembranal, la cual contiene un motivo [YXXL] similar al que regula la endocitosis de otros receptores de membrana [220-222]. Agentes que interfieren con la correcta formación de vesículas recubiertas de clatrina impiden la internalización de CD5 mediada por anticuerpo (fig. IV.3.Anexo). Posiblemente, la secuencia [Y³⁷⁸KKL] en el extremo N-terminal de la cola citoplasmática de CD5 constituya el sitio de anclaje a moléculas AP-2 que son responsables de la asociación

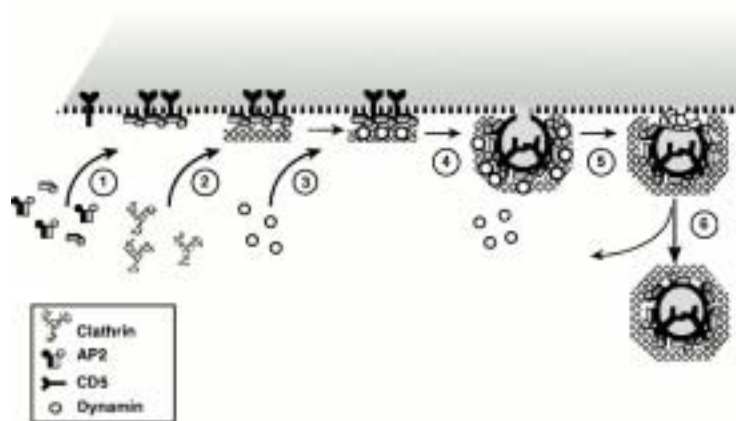


Figura V.6. Modelo de la formación de vesículas recubiertas de clatrina en la internalización de CD5 mediada por anticuerpo. (1) Reclutamiento de AP2 a través de la secuencia YXX ϕ en la región citoplasmática de CD5. (2) Asociación de moléculas de clatrina a nivel de la membrana promovido por AP2. (3) Reclutamiento de moléculas de dinamina. (4) Invaginación del dominio membranal revestido de clatrina. (5) La constricción de la vesícula requiere la redistribución de las moléculas de dinamina y su asociación a nivel del cuello. (6) Escisión de la vesícula y transporte de CD5 hacia el interior celular (*Annual Review of Biochemistry*, S.L. Schmid, 1997, 66: 511).

de receptores a moléculas de clatrina (fig. V.6). Se ha descrito que AP-2 reconozca motivos [Y-X-X- ϕ] (donde ϕ es un aminoácido hidrofóbico) en la región citoplasmática de diferentes receptores [188]. De acuerdo con esto, el mutante K384^{stop} (fig. IV.2.1) que posee una región citoplasmática muy corta de 9 aa, conserva el motivo de reconocimiento a AP-2 y sigue internalizándose vía clatrina tras el entrecruzamiento con anti-CD5 (fig. IV.3.Anexo).

De acuerdo con nuestros datos, existen diversos trabajos que también presentan evidencias sobre la posible interacción de CD5 con el citoesqueleto. Primero, CD5 reside, por lo menos en parte, en la fracción de membrana rica en esfingolípidos y colesterol (*rafts* lipídicos), y su co-ligación con CD3 aumenta la asociación del receptor antigénico con los *rafts* [139]. Segundo, la señalización a través de CD5 activa una vía que incluye PI3-K, Vav y Rac1 [146], y que resulta en la activación de las GTPasas de la familia Rho (Rac1, Rho, Cdc42) implicadas en el control de la organización del citoesqueleto de actina [12]. Tercero, recientemente se ha descrito, por el sistema del *yeast two-hybrid*, la asociación de Tctex-1 (componente del complejo motor de la dineína) con la región de CD5 más proximal a la membrana [160].

5- Interacción de CD5 con una actividad serin/treonincinasa

En el presente trabajo demostramos que la previamente descrita actividad serin/treonincinasa asociada a CD5 [111] se encuentra unida a la región citoplasmática de CD5 más proximal a la membrana (fig. V.7). La delección de los primeros 40 aa de su región citoplasmática es suficiente para impedir la fosforilación *in vitro* de CD5 por esta cinasa (fig. IV.5.4). Este resultado descarta CKII como posible cinasa asociada a CD5, porque los sitios de interacción con CKII se encuentran únicamente en la región citoplasmática más carboxiterminal (fig. IV.1.3). Además, esta cinasa asociada puede fosforilar la(s) treoninas T410 y/o T412 (fig. IV.5.5), mientras que CKII fosforila *in vitro* únicamente las serinas C-terminales de CD5 (fig. IV.1.2). Nuestro resultado estaría más de acuerdo con la posibilidad que la

actividad serin/treonincinasa se debiera a la recientemente descrita asociación de CD5 con la serin/treonincinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina CaMK II δ [160]. En ese trabajo se demuestra su asociación a la región citoplasmática de CD5 más proximal a la membrana [160]. Esta asociación está presumiblemente mediada por la secuencia de CD5 [R-X-W-X₄-G-X₂-Q-N-X₂-F-H-R-X₄-T-V] que mimetiza el motivo de multimerización de la cinasa con ella misma [160]. De todas maneras, CaMK necesita aumentos en la concentración de Ca^{2+} intracelular para su activación. Nuestro grupo demostró que la estimulación con anti-CD5 no induce aumentos detectables de dicha concentración [169], pero sí de la actividad cinasa [111]. Por lo tanto, muy probablemente la actividad cinasa asociada a CD5 tampoco sea debida a CaMK. Se desconoce el papel funcional de esta cinasa en la señalización intracelular mediada por CD5. No obstante, en este trabajo de tesis demostramos que su activación no depende ni de Lck, ni de la expresión en membrana del receptor TCR (fig. IV.5.3). Esto sugiere que dicha cinasa es un elemento de la propia maquinaria de transducción de señales de CD5, totalmente independiente del receptor antigénico TCR.

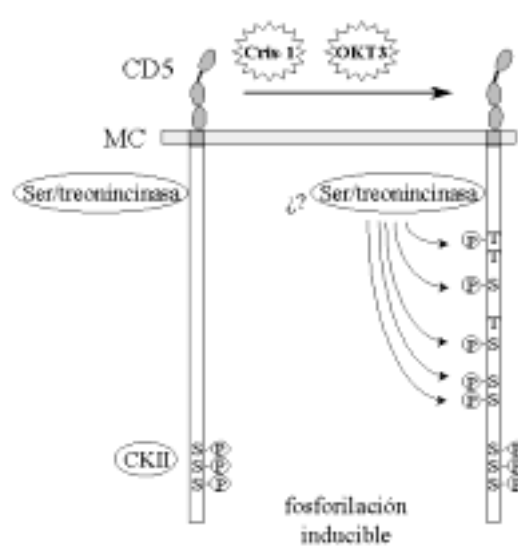


Figura V.7. Modelo hipotético de la asociación de la serin/treonincinasa sobre y de la posterior fosforilación inducible sobre el mismo receptor.

6- Activación de PTKs

Resultados obtenidos por nuestro grupo anteriormente confirmaron la idea que CD5 es una molécula capaz de activar, por si sola, una cascada enzimática de señalización. Demostramos que la estimulación de CD5 induce la activación de enzimas tales como PC-PLC, A-SMasa, PKC, MEK (*mitogen-activated protein kinase*) y JNK (*c-Jun NH2-terminal kinase*) [136, 169, 170]. En el presente trabajo aportamos una nueva evidencia en favor de la capacidad de CD5 de activar enzimas implicadas en cascadas de señalización. Concretamente, demostramos que la estimulación de linfocitos vía CD5 induce la activación de PTKs (fig. V.8). Dicha activación es evidenciada por la observación de una rápida fosforilación en tirosinas de proteínas señalizadoras asociadas a Grb2 (fig. IV.5.1). Desconocemos las PTKs concretas encargadas de dichas fosforilaciones, aunque suponemos que serían las mismas que se activan vía CD3/TCR, dada la estrecha asociación física descrita entre CD5 y CD3/TCR [130-132]. Entre las proteínas que se fosforilan hemos identificado dos con función adaptadora: c-Cbl y LAT (fig. IV.4.2). Curiosamente, sus niveles de fosforilación son distintos cuando son comparados con los obtenidos a través de la estimulación del complejo TCR/CD3. La intensidad de fosforilación de c-Cbl vía CD5 es similar a la inducida vía CD3, mientras que la fosforilación de LAT es menos aparente (fig. IV.4.2A). La idea actual es que LAT y c-Cbl presentan papeles reguladores opuestos en la transducción de señales mediada por el TCR. LAT promueve la propagación de la señal activando, entre otras rutas, la vía de las MAPK; mientras que c-Cbl interfiere con la señalización inhibiendo sobre todo la activación de ZAP-70 (fig. V.8). El predominio de la fosforilación de c-Cbl sobre LAT podría estar relacionado con la función moduladora negativa descrita para CD5 en timocitos y células B1a [140, 141]. La implicación de c-Cbl en la vía de señalización de CD5 (fig. V.8), así como su descrita asociación a la región citoplasmática del mismo [147], podría estar relacionado con la internalización de CD5. Recientemente se ha descrito una actividad ligasa de

ubiquitina asociada a c-Cbl [45] a través de la cual éste podría promover el marcaje con ubiquitina de proteínas que deben ser transportadas al lisosoma para su degradación [223-225]. De esta manera, creemos que c-Cbl podría mediar en la ubiquitinación de CD5 y su consiguiente internalización.

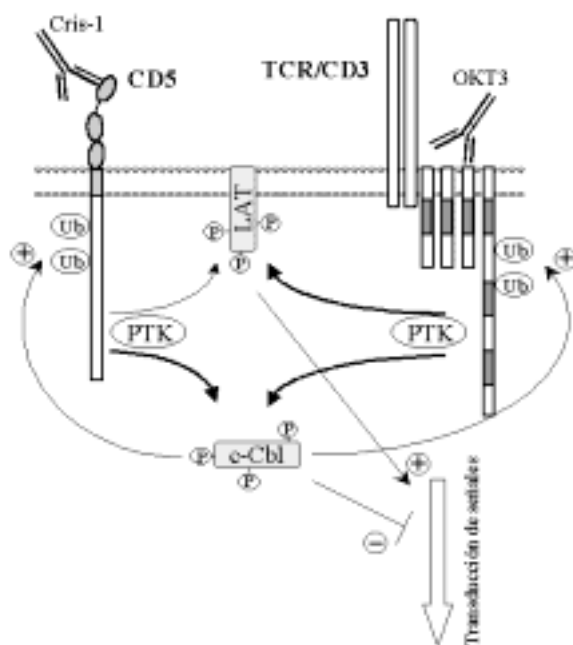


Figura V.8. Activación de proteínas tirosincinasas (PTK) y fosforilación de proteínas adaptadoras (c-Cbl y LAT) mediada por CD5 y CD3.

La ubiquitinación de moléculas se describió primero para proteínas citosólicas y nucleares, pero en los últimos años se ha observado que numerosas proteínas transmembrana pueden también ser ubiquitinadas [158, 159, 226, 227]. En células de mamíferos, la ubiquitinación inducida por el ligando ha sido descrita para la hormona del crecimiento (GHR) [228], el receptor TCR [229] y diversos receptores para factores de crecimiento como EGFR [230], PDGFR [231] y CSF-1R [232]. La ubiquitinación de estos receptores se ha propuesto que sirve como un mecanismo para regular negativamente la señalización del receptor abocándolo a una ruta degradativa lisosomal [158, 223]. Hasta hoy la participación de c-Cbl en la atenuación de la

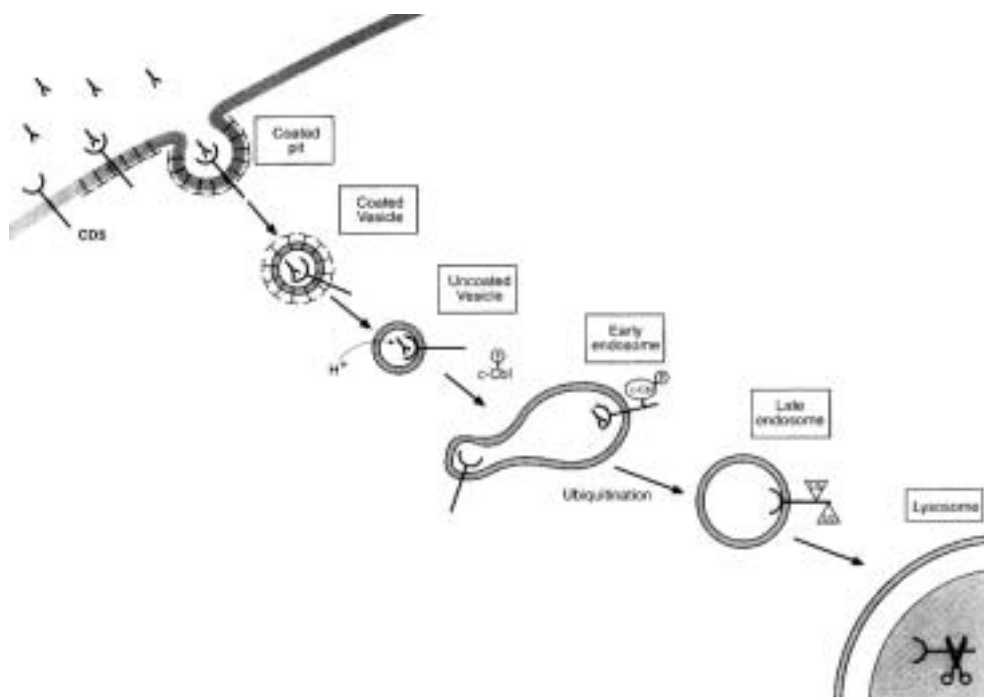


Figura V.9. Modelo propuesto para la internalización de CD5 mediada por anticuerpo y dirigida por c-Cbl. La unión del anticuerpo específico con CD5 induce la formación de áreas revestidas de clatrina a nivel de CD5 que rápidamente se invaginan para formar una vesícula transportadora. La fosforilación de c-Cbl vía CD5 presumiblemente promueve su reclutamiento a la cola citoplasmática de CD5 y la activación de su actividad ligasa de ubiquitina. La ubiquitinación de CD5 por c-Cbl marca CD5 para su transporte al lisosoma donde será degradado por hidrolasas ácidas (*Genes & Development*, G. Levkowitz, 1998, 12: 3663).

señalización de receptores de membrana ha sido reportada para EGFR, PDGFR y CSF-1R [223-225]. Por analogía, nosotros hipotetizamos que la señalización de CD5 es regulada negativamente por una ruta degradativa dependiente de ubiquitina y mediada por c-Cbl (fig. V.9). De forma extensiva, la activación por parte de CD5 de esta ruta degradativa podría promover la modulación negativa de la expresión en membrana de moléculas co-estimuladoras cercanas a CD5. Esto podría explicar los fenómenos de señalización negativa atribuidos a CD5 en timocitos y células B1a [140, 141]. No obstante, ni la ubiquitinación de CD5, ni la implicación de c-Cbl en esta ubiquitinación, han sido todavía probadas. Como una única evidencia de la participación de c-Cbl en la internalización de CD5, existe un trabajo en el cual se demuestra que ratones $Cbl^{-/-}$ presentan niveles disminuidos de CD3, CD4, CD8 y CD5 en la membrana de sus timocitos [155].

Con todo, hay que añadir que la internalización de receptores puede entenderse también como un mecanismo inducido destinado al transporte del receptor hacia compartimentos intracelulares apropiados para la interacción con moléculas señalizadoras más distales. Esta alternativa podría explicar, en la señalización de CD5, fenómenos tales como la activación de SMasa ácida tras la estimulación con anti-CD5 [170]. Esto se debe a que esta enzima es sólo activa en ambientes acídicos, como en endosomas tardíos o lisosomas. Por lo tanto, creemos que la internalización de CD5 podría cubrir al menos dos funciones: 1) la atenuación de la señalización mediada por el receptor CD5 y 2) la activación de cascadas enzimáticas señalizadoras (liberación de ceramida por SMasa).

*

En suma, los resultados presentados en este trabajo de tesis confirman que CD5 es un receptor que puede actuar como un elemento transductor de señales dentro de la vía de señalización de TCR, y como una molécula señalizadora independiente capaz de iniciar su propia vía. Este hecho deja la puerta abierta para el estudio en más profundidad de los mecanismos de señalización utilizados por CD5, así como de la importancia que estos tienen para la correcta activación y diferenciación del linfocito.

VI. CONCLUSIONES

El receptor linfocitario CD5 tiene una región citoplasmática adaptada para transducir señales intracelulares y nuestros resultados demuestran que los procesos de fosforilación juegan un papel muy relevante en ello:

1. La asociación de la subunidad reguladora β de CKII a la región citoplasmática carboxiterminal de CD5 apoya la fosforilación constitutiva de CD5 por esta cinasa, la cual es necesaria para la activación de la cascada enzimática PC-PLC/A-SMasa.
2. La fosforilación inducible de CD5 por PKC sobre los residuos citoplasmáticos T410 y T412 es crítica para la regulación de aspectos funcionales de la molécula, como la activación de la cascada enzimática PC-PLC/A-SMasa y la internalización de la molécula.
3. La fosforilación inducible de CD5 por PTK únicamente sobre las tirosinas Y429 e Y463, invalida la funcionalidad de los motivos ITAM-like e ITIM-like presentes en CD5, pero no descarta posibles asociaciones con moléculas señalizadoras con sitios de reconocimiento de fosfotirosinas.
4. CD5 activa una vía de señalización propia que incluye la fosforilación en tirosinas de proteínas adaptadoras (c-Cbl y LAT), la activación de una serin/treonincinasa todavía por identificar y su internalización mediada por clatrina hacia compartimentos intracelulares.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- 1 **Townsend, A., Elliott, T., Cerundolo, V., Foster, L., Barber, B., Tse, A.**, Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro. *Cell* 1990. **62**: 285-295.
- 2 **Kappler, J., Kotzin, B., Herron, L., Gelfand, E. W., Bigler, R. D., Boylston, A., Carrel, S., Posnett, D. N., Choi, Y., Marrack, P.**, V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 1989. **244**: 811-813.
- 3 **Kaye, J., Porcelli, S., Tite, J., Jones, B., Janeway, C. A.**, Both a monoclonal antibody and antisera specific for determinants unique to individual cloned helper T cell lines can substitute for antigen and antigen-presenting cells in the activation of T cells. *J Exp Med* 1983. **158**: 836-856.
- 4 **Tax, W. J., Willems, H. W., Reekers, P. P., Capel, P. J., Koene, R. A.**, Polymorphism in mitogenic effect of IgG1 monoclonal antibodies against T3 antigen on human T cells. *Nature* 1983. **304**: 445-447.
- 5 **Weiss, A.**, Structure and function of the T cell antigen receptor. *J Clin Invest* 1990. **86**: 1015-1022.
- 6 **Chan, A. C., Shaw, A. S.**, Regulation of antigen receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Curr Opin Immunol* 1996. **8**: 394-401.
- 7 **van_Ewijk, W.**, T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu Rev Immunol* 1991. **9**: 591-615.
- 8 **Arstila, T. P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J., Kourilsky, P.**, A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 1999. **286**: 958-961.
- 9 **Jameson, S. C., Hogquist, K. A., Bevan, M. J.**, Positive selection of thymocytes. *Annu Rev Immunol* 1995. **13**: 93-126.
- 10 **Robey, E., Fowlkes, B. J.**, Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol* 1994. **12**: 675-705.
- 11 **Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M. F., Ohashi, P. S.**, Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 1999. **17**: 829-874.
- 12 **Acuto, O., Cantrell, D.**, T cell activation and the cytoskeleton. *Annu Rev Immunol* 2000. **18**: 165-184.
- 13 **Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M., Bolen, J. B.**, The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell* 1988. **55**: 301-308.
- 14 **Weiss, A.**, T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell* 1993. **73**: 209-212.
- 15 **Straus, D. B., Weiss, A.**, Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 1992. **70**: 585-593.
- 16 **Molina, T. J., Kishihara, K., Siderovski, D. P., van_Ewijk, W., Narendran, A., Timms, E., Wakeham, A., Paige, C. J., Hartmann, K. U., Veillette, A.**, Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature* 1992. **357**: 161-164.
- 17 **Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W., Weiss, A.**, ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 1992. **71**: 649-662.
- 18 **Straus, D. B., Weiss, A.**, The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation. *J Exp Med* 1993. **178**: 1523-1530.
- 19 **Chan, A. C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G. H., Wang, T., Thoma, R., Kurosaki, T.**, Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *Embo J* 1995. **14**: 2499-2508.
- 20 **Zhang, W., Sloan_Lancaster, J., Kitchen, J., Tribble, R. P., Samelson, L. E.**, LAT: the ZAP-

- 70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 1998. **92**: 83-92.
- 21 **Wardenburg, J. B., Fu, C., Jackman, J. K., Flotow, H., Wilkinson, S. E., Williams, D. H., Johnson, R., Kong, G., Chan, A. C., Findell, P. R.**, Phosphorylation of SLP-76 by the ZAP-70 protein-tyrosine kinase is required for T-cell receptor function. *J Biol Chem* 1996. **271**: 19641-19644.
- 22 **Asada, H., Ishii, N., Sasaki, Y., Endo, K., Kasai, H., Tanaka, N., Takeshita, T., Tsuchiya, S., Konno, T., Sugamura, K.**, Grf40, A novel Grb2 family member, is involved in T cell signaling through interaction with SLP-76 and LAT. *J Exp Med* 1999. **189**: 1383-1390.
- 23 **Liu, S. K., Fang, N., Koretzky, G. A., McGlade, C. J.**, The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in T-cell signaling via interactions with the SLP-76 and LAT adaptors. *Curr Biol* 1999. **9**: 67-75.
- 24 **Law, C. L., Ewings, M. K., Chaudhary, P. M., Solow, S. A., Yun, T. J., Marshall, A. J., Hood, L., Clark, E. A.**, GrpL, a Grb2-related adaptor protein, interacts with SLP-76 to regulate nuclear factor of activated T cell activation. *J Exp Med* 1999. **189**: 1243-1253.
- 25 **Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E., Weiss, A.**, LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 1998. **9**: 617-626.
- 26 **Mustelin, T., Coggeshall, K. M., Isakov, N., Altman, A.**, T cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation. *Science* 1990. **247**: 1584-1587.
- 27 **Nishibe, S., Wahl, M. I., Hernandez_Sotomayor, S. M., Tonks, N. K., Rhee, S. G., Carpenter, G.**, Increase of the catalytic activity of phospholipase C-gamma 1 by tyrosine phosphorylation. *Science* 1990. **250**: 1253-1256.
- 28 **Berridge, M. J.**, Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993. **361**: 315-325.
- 29 **Beyers, A. D., Hanekom, C., Rheeder, A., Strachan, A. F., Wooten, M. W., Nel, A. E.**, Characterization of protein kinase C and its isoforms in human T lymphocytes. *J Immunol* 1988. **141**: 3463-3470.
- 30 **Rao, A., Luo, C., Hogan, P. G.**, Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 1997. **15**: 707-747.
- 31 **Izquierdo, M., Leever, S. J., Marshall, C. J., Cantrell, D.**, p21ras couples the T cell antigen receptor to extracellular signal-regulated kinase 2 in T lymphocytes. *J Exp Med* 1993. **178**: 1199-1208.
- 32 **Avruch, J., Zhang, X. F., Kyriakis, J. M.**, Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci* 1994. **19**: 279-283.
- 33 **Agarwal, S., Rao, A.**, Long-range transcriptional regulation of cytokine gene expression. *Curr Opin Immunol* 1998. **10**: 345-352.
- 34 **Galisteo, M. L., Chernoff, J., Su, Y. C., Skolnik, E. Y., Schlessinger, J.**, The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. *J Biol Chem* 1996. **271**: 20997-21000.
- 35 **Rivero_Lezcano, O. M., Marcilla, A., Sameshima, J. H., Robbins, K. C.**, Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol Cell Biol* 1995. **15**: 5725-5731.
- 36 **Bubeck_Wardenburg, J., Pappu, R., Bu, J. Y., Mayer, B., Chernoff, J., Straus, D., Chan, A. C.**, Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity* 1998. **9**: 607-616.
- 37 **Lupher, M. L. J., Rao, N., Eck, M. J., Band, H.**, The Cbl protooncprotein: a negative regulator of immune receptor signal

- transduction. *Immunol Today* 1999. **20**: 375-382.
- 38 **Fournel, M., Davidson, D., Weil, R., Veillette, A.**, Association of tyrosine protein kinase Zap-70 with the protooncogene product p120c-cbl in T lymphocytes. *J Exp Med* 1996. **183**: 301-306.
- 39 **Donovan, J. A., Wange, R. L., Langdon, W. Y., Samelson, L. E.**, The protein product of the c-cbl protooncogene is the 120-kDa tyrosine-phosphorylated protein in Jurkat cells activated via the T cell antigen receptor. *J Biol Chem* 1994. **269**: 22921-22924.
- 40 **Thien, C. B., Bowtell, D. D., Langdon, W. Y.**, Perturbed regulation of ZAP-70 and sustained tyrosine phosphorylation of LAT and SLP-76 in c-Cbl-deficient thymocytes. *J Immunol* 1999. **162**: 7133-7139.
- 41 **Reedquist, K. A., Fukazawa, T., Panchamoorthy, G., Langdon, W. Y., Shoelson, S. E., Druker, B. J., Band, H.**, Stimulation through the T cell receptor induces Cbl association with Crk proteins and the guanine nucleotide exchange protein C3G. *J Biol Chem* 1996. **271**: 8435-8442.
- 42 **Tanaka, S., Morishita, T., Hashimoto, Y., Hattori, S., Nakamura, S., Shibuya, M., Matuoka, K., Takenawa, T., Kurata, T., Nagashima, K.**, C3G, a guanine nucleotide-releasing protein expressed ubiquitously, binds to the Src homology 3 domains of CRK and GRB2/ASH proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994. **91**: 3443-3447.
- 43 **Boussiotis, V. A., Freeman, G. J., Berezovskaya, A., Barber, D. L., Nadler, L. M.**, Maintenance of human T cell anergy: blocking of IL-2 gene transcription by activated Rap1. *Science* 1997. **278**: 124-128.
- 44 **Meisner, H., Conway, B. R., Hartley, D., Czech, M. P.**, Interactions of Cbl with Grb2 and phosphatidylinositol 3'-kinase in activated Jurkat cells. *Mol Cell Biol* 1995. **15**: 3571-3578.
- 45 **Joazeiro, C. A., Wing, S. S., Huang, H., Levenson, J. D., Hunter, T., Liu, Y. C.**, The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase [see comments]. *Science* 1999. **286**: 309-312.
- 46 **Azzam, H. S., DeJarnette, J. B., Huang, K., Emmons, R., Park, C. S., Sommers, C. L., El_Khoury, D., Shores, E. W., Love, P. E.**, Fine tuning of TCR signaling by CD5. *J Immunol* 2001. **166**: 5464-5472.
- 47 **Rudd, C. E.**, Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity* 1996. **4**: 527-534.
- 48 **Liu, Y., Janeway, C. A.**, 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* 1992. **89**: 3845-3849.
- 49 **Zamoyska, R.**, CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? *Curr Opin Immunol* 1998. **10**: 82-87.
- 50 **Sanchez_Madrid, F., del_Pozo, M. A.**, Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* 1999. **18**: 501-511.
- 51 **Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N., Kupfer, A.**, Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 1998. **395**: 82-86.
- 52 **Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., Dustin, M. L.**, The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999. **285**: 221-227.
- 53 **Davis, S. J., van_der_Merwe, P. A.**, The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function. *Immunol Today* 1996. **17**: 177-187.
- 54 **Shaw, A. S., Dustin, M. L.**, Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation. *Immunity* 1997. **6**: 361-369.
- 55 **Simons, K., Ikonen, E.**, Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997. **387**: 569-572.

- 56 **Brown, D. A., London, E.**, Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2000. **275**: 17221-17224.
- 57 **Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., Seed, B.**, Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 1998. **8**: 723-732.
- 58 **Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A. M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M. A., Chauvin, J. P., Pierres, M., He, H. T.**, Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J* 1998. **17**: 5334-5348.
- 59 **Moran, M., Miceli, M. C.**, Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity* 1998. **9**: 787-796.
- 60 **Rodgers, W., Rose, J. K.**, Exclusion of CD45 inhibits activity of p56lck associated with glycolipid-enriched membrane domains. *J Cell Biol* 1996. **135**: 1515-1523.
- 61 **Kabouridis, P. S., Magee, A. I., Ley, S. C.**, S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *EMBO J* 1997. **16**: 4983-4998.
- 62 **Janes, P. W., Ley, S. C., Magee, A. I., Kabouridis, P. S.**, The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol* 2000. **12**: 23-34.
- 63 **Wulfing, C., Sjaastad, M. D., Davis, M. M.**, Visualizing the dynamics of T cell activation: intracellular adhesion molecule 1 migrates rapidly to the T cell/B cell interface and acts to sustain calcium levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. **95**: 6302-6307.
- 64 **Wulfing, C., Davis, M. M.**, A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* 1998. **282**: 2266-2269.
- 65 **Dustin, M. L., Olszowy, M. W., Holdorf, A. D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., Widder, P., Rosenberger, F., van_der_Merwe, P. A., Allen, P. M., Shaw, A. S.**, A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 1998. **94**: 667-677.
- 66 **Lozano, F., Simarro, M., Calvo, J., Vilà, J. M., Padilla, O., Bowen, J., Campbell, K. S.**, CD5 signal transduction: positive or negative modulation of antigen receptor signalling. *Crit. Rev. Immunol.* 2000. **20**: 347-358.
- 67 **Calvo, J., Places, L., Espinosa, G., Padilla, O., Vilà, J. M., Villamor, N., Ingelmo, M., Gallart, T., Vives, J., Font, J., Lozano, F.**, Identification of a natural soluble form of human CD5. *Tissue Antigens* 1999. **54**: 128-137.
- 68 **Cantor, H., Boyse, E. A.**, Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. II. Cooperation between subclasses of Ly+ cells in the generation of killer activity. *J Exp Med* 1975. **141**: 1390-1399.
- 69 **Ledbetter, J. A., Rouse, R. V., Micklen, H. S., Herzenberg, L. A.**, T cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens. Two-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with monoclonal antibodies modifies current views. *J Exp Med* 1980. **152**: 280-295.
- 70 **Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G., Schlossman, S. F.**, A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. 1979. **123**: 1312-1317.
- 71 **Lanier, L. L., Warner, N. L., Ledbetter, J. A., Herzenberg, L. A.**, Quantitative immunofluorescent analysis of surface phenotypes of murine B cell lymphomas and plasmocytomas with monoclonal antibodies. *J Immunol* 1981. **127**: 1691-1697.
- 72 **Royston, I., Majda, J. A., Baird, S. M., Meserve, B. I., Griffiths, J. C.**, Human T cell antigens defined by monoclonal antibodies: The 65,000-dalton antigen of T cells (T65) is also

- found on chronic lymphocytic leukemia cells bearing surface immunoglobulin. *J Immunol* 1980. **125**: 725-731.
- 73 **Wang, C., Good, R. A., Ammirati, P., Dymbort, G., Evans, R. L.**, Identification of a p69,71 complex expressed on human T cells sharing determinants with B-type chronic lymphatic leukemic cells. *J Exp Med* 1980. **151**: 1539-1544.
- 74 **Manohar, V., Brown, E., Leiserson, W. M., Cushed, T. M.**, Expression of Lym-1 by a subset of B lymphocytes. *J Immunol* 1982. **129**: 532-538.
- 75 **Caligaris-Cappio, F., Gobbi, M., Bofill, M., Janossy, G.**, Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 1982. **155**: 623-628.
- 76 **Plater-Zyberk, C., Maini, R. N., Lam, K., Kennedy, T. D., Janossy, G.**, A rheumatoid arthritis B cell subset expresses a phenotype similar to that in chronic lymphocytic leukemia. *Arthritis Rheum* 1985. **28**: 971-976.
- 77 **Dauphinée, M., Tovar, Z., Talal, N.**, B cells expressing CD5 are increased in Sjögren syndrome. *Arthritis Rheum* 1988. **31**: 642-647.
- 78 **Iwatani, Y., Amino, N., Kaneda, T., Kaneda, T., Ichihara, K., Tamaki, H., Tachi, J., Matsuzuka, F., Fukata, S., Kuma, K., Miyai, K.**, Marked increase of CD5+ B cells in hyperthyroid Graves's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 1989. **78**: 196-200.
- 79 **Nicoletti, F., Meroni, P. L., Barcellini, W.**, Enhanced percentage of CD5+ B lymphocytes in newly diagnosed IDDM patients. *Immunol Lett* 1990. **23**: 211-216.
- 80 **Muñoz, A., Gallart, T., Viñas, O., Gomis, R.**, Increased CD5-positive B lymphocytes in type I diabetes. *Clin Exp Immunol* 1991. **83**: 304-308.
- 81 **Azzam, H. S., Grinberg, A., Lui, K., Shen, H., Shores, E. W., Love, P. E.**, CD5 expression is developmentally regulated by T cell receptor (TCR) signals and TCR avidity. *J Exp Med* 1998. **188**: 2301-2311.
- 82 **Carrera, A. C., Cárdenas, L., Tugores, A., Alonso, M., Sánchez-Madrid, F., de Landázuri, M. O.**, Activators of protein kinase C up-regulate the cell surface expression of CD2 and CD5 T cell glycoproteins. *J Biol Chem* 1989. **264**: 15650-15655.
- 83 **Lozano, F., Alberola-Ila, J., Places, L., Gallart, T., Vives, J.**, Protein kinase C-dependent up-regulation of CD5 surface expression on normal and lymphoblastoid T cells. *Immunology* 1990. **70**: 434-439.
- 84 **Miller, R. A., Gralow, J.**, The induction of Leu-1 antigen expression in human malignant and normal B cells by phorbol myristate acetate (PMA). *J Immunol* 1984. **133**: 3408-3414.
- 85 **Teutsch, M., Higer, M., Wang, D., Wortis, H. W.**, Induction of CD5 on B and T cells is suppressed by cyclosporin A, FK-520 and rapamycin. *Int Immunol* 1995. **7**: 381-392.
- 86 **Borthwick, N. J., Bofill, M., Hassan, I., Panayiotidis, P., Janossy, G., Salmon, M., Akbar, A. N.**, 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. 1996. **88**: 508-515.
- 87 **Calvo, J., Solé, J., Simarro, M., Vives, J., Lozano, F.**, Evolutionarily conserved transcription regulatory elements within the 5'-flanking region of the human CD5 gene. *Tissue Antigens* 1996. **47**: 257-261.
- 88 **Weichert, T. R., Schwartz, R. C.**, Cloning of the murine CD5 promoter and its tissue-specific regulation. *J Immunol* 1995. **154**: 4603-4612.
- 89 **Tung, J. W., Kunnavatana, S. S., Herzenberg, L. A.**, The regulation of CD5 expression in murine T cells. *BMC Mol Biol* 2001. **2**: 5.
- 90 **Berland, R., Wortis, H. H.**, An NFAT-dependent enhancer is necessary for anti-IgM-mediated induction of murine CD5 expression in primary splenic B cells. *J Immunol* 1998. **161**: 277-285.

- 91 **Huang, H. S., Jones, N. H., Strominger, J. L., Herzenberg, L. A.**, 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 USA* 1987. **84**: 204-208.
- 92 **Jones, N. H., Clabby, M. L., Dialynas, D. P., Huang, H. S., Herzenberg, L. A., Strominger, J. L.**, Isolation of complementary DNA clones encoding the human lymphocyte glycoprotein T1/Leu1. *Nature* 1986. **323**: 346-349.
- 93 **Resnick, D., Pearson, A., Krieger, M.**, The SRCR superfamily: a family reminiscent of the Ig superfamily. *Trends. Biochem. Sci.* 1994. **19**: 5-8.
- 94 **Aruffo, A., Bowen, M. A., Patel, D. D., Haynes, B. F., Starling, G. C., Gebe, J. A., Bajorath, J.**, CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function? *Immunol Today* 1997. **18**: 498-504.
- 95 **Vilà, J. M., Padilla, O., Arman, M., Gimferrer, I., Lozano, F.**, The scavenger receptor cysteine-rich superfamily (SRCR-SF): structure and function of group B members. *Inmunología* 2000. **19**: 105-121.
- 96 **McAlister, M. S., Brown, M. H., Willis, A. C., Rudd, P. M., Harvey, D. J., Aplin, R., Shotton, D. M., Dwek, R. A., Barclay, A. N., Driscoll, P. C.**, Structural analysis of the CD5 antigen-expression, disulphide bond analysis and physical characterisation of CD5 scavenger receptor superfamily domain 1. *Eur J Biochem* 1998. **257**: 131-141.
- 97 **Calvo, J., Padilla, O., Places, L., Vigorito, E., Vila, J. M., Vilella, R., Milá, J., Vives, J., Bowen, M. A., Lozano, F.**, Relevance of individual CD5 extracellular domains on antibody recognition, glycosylation and co-mitogenic signalling. *Tissue Antigens* 1999. **54**: 16-26.
- 98 **Biancone, L., Bowen, M. A., Lim, A., Aruffo, A., Andres, G., Stamenkovic, I.**, Identification of a novel inducible cell-surface ligand of CD5 on activated lymphocytes. *J Exp Med* 1996. **184**: 811-819.
- 99 **Pospisil, R., Fitts, M. G., Mage, R. G.**, CD5 is a potential selecting ligand for B cell surface immunoglobulin framework region sequences. *J Exp Med* 1996. **184**: 1279-1284.
- 100 **Bikah, G., Lynd, F. M., Aruffo, A. A., Ledbetter, J. A., Bondada, S.**, A role for CD5 in cognate interactions between T cells and B cells, and identification of a novel ligand for CD5. *Int Immunol* 1998. **10**: 1185-1196.
- 101 **Reth, M.**, Antigen receptor tail clue [letter]. *Nature* 1989. **338**: 383-384.
- 102 **Sinclair, N. R.**, Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs on activating molecules. *Crit Rev Immunol* 2000. **20**: 89-102.
- 103 **Kuenzel, E. A., Mulligan, J. A., Sommercorn, J., Krebs, E. G.**, Substrate specificity determinants for casein kinase II as deduced from studies with synthetic peptides. *J Biol Chem* 1987. **262**: 9136-9140.
- 104 **Litchfield, D. W., Arendt, A., Lozeman, F. J., Krebs, E. G., Hargrave, P. A., Palczewski, K.**, Synthetic phosphopeptides are substrates for casein kinase II. *FEBS Lett* 1990. **261**: 117-120.
- 105 **Pearson, R. B., Kemp, B. E.**, Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol* 1991. **200**: 62-81.
- 106 **Griffith, L. C., Schulman, H., Tagawa, M.**, In vivo and in vitro phosphorylation of murine lymphocyte differentiation antigen CD5. *Biochem Biophys Res Commun* 1989. **159**: 536-541.
- 107 **Calvo, J., Vilà, J. M., Places, L., Simarro, M., Padilla, O., Andreu, D., Campbell, K. S., Ausel, C., Lozano, F.**, Human CD5 signaling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by casein kinase II. *J Immunol* 1998. **161**: 6022-6029.

- 108 **Raman, C., Kuo, A., Deshane, J., Litchfield, D. W., Kimberly, R. P.**, Regulation of casein kinase 2 by direct interaction with cell surface receptor CD5. *J Biol Chem* 1998. **273**: 19183-19189.
- 109 **Chatila, T. A., Geha, R. S.**, Phosphorylation of T cell membrane proteins by activators of protein kinase C. *J Immunol* 1988. **140**: 4308-4314.
- 110 **Lozano, F., Alberola-Ila, J., Places, L., Gallart, T., Vives, J.**, Phosphorylation-mediated changes in the electrophoretic mobility of CD5 molecules. *Eur J Biochem* 1990. **193**: 469-477.
- 111 **Alberola-Ila, J., Places, L., Lozano, F., Vives, J.**, Association of an activation inducible serine kinase activity with CD5. *J Immunol* 1993. **151**: 4423-4430.
- 112 **Davies, A. A., Ley, S. C., Crumpton, M. J.**, CD5 is phosphorylated on tyrosine after stimulation of the T-cell antigen receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992. **89**: 6368-6372.
- 113 **Burgess, K. E., Yamamoto, M., Prasad, K. V., Rudd, C. E.**, 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* 1992. **89**: 9311-9315.
- 114 **Hecht, B. K., Kipps, T., Johnston, N. K., Cannizzaro, L. A.**, Leu 1 (CD5) cell surface antigen mapped to 11q13 by in situ hybridization. 1989. **51**: 1012 only.
- 115 **Tsuge, I., Utsumi, K. R., Ueda, R., Takamoto, S., Takahashi, T.**, Assignment of gene coding human T-cell differentiation antigen, Tp120, to chromosome 11. *Somat Cell Mol Genet* 1985. **11**: 217-222.
- 116 **Lecomte, O., Bock, J. B., Birren, B. W., Vollrath, D., Parnes, J. R.**, Molecular linkage of the mouse CD5 and CD6 genes. *Immunogenetics* 1996. **44**: 385-390.
- 117 **Tada, N., Kimura, S., Hammerling, U.**, Immunogenetics of mouse B-cell alloantigen systems defined by monoclonal antibodies and gene-cluster formation of these loci. *Immunol Rev* 1982. **69**: 99-126.
- 118 **Padilla, O., Calvo, J., Vilà, J. M., Gimferrer, I., Places, L., Arias, M. T., Pujana, M. A., Vives, J., Lozano, F.**, Genomic organisation of the human CD5 gene. *Immunogenetics* 2000. DOI: **10.1007/s002510000235** .
- 119 **Calvo, J., Maertzdorf, J., Roca, A., Simarro, M., Places, L., Lázaro, C., Vives, J., Lozano, F.**, Conservation of a polymorphic microsatellite at orthologous positions in the human and mouse CD5 gene promoter. *Immunogenetics* 1997. **45**: 233-234.
- 120 **Waterman, H., Sabanai, I., Geiger, B., Yarden, Y.**, Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J Biol Chem* 1998. **273**: 13819-13827.
- 121 **Luo, W., Van de Velde, H., von Hoegen, I., Parnes, J. R., Thielemans, K.**, 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* 1992. **148**: 1630-1634.
- 122 **Kumanogoh, A., Watanabe, C., Lee, I., Wang, X., Shi, W., Araki, H., Hirata, H., Iwahori, K., Uchida, J., Yasui, T., Matsumoto, M., Yoshida, K., Yakura, H., Pan, C., Parnes, J. R., Kikutani, H.**, Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity* 2000. **13**: 621-631.
- 123 **Pospisil, R., Silverman, G. J., Marti, G. E., Aruffo, A., Bowen, M. A., Mage, R. G.**, 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* 2000. **36**: 353-365.

- 124 **Haas, K. M., Estes, D. M.**, The identification and characterization of a ligand for bovine CD5. *J Immunol* 2001. **166**: 3158-3166.
- 125 **Calvo, J., Places, L., Padilla, O., Vila, J. M., Vives, J., Bowen, M. A., Lozano, F.**, Interaction of recombinant and natural soluble CD5 forms with an alternative cell surface ligand. *Eur J Immunol* 1999. **29**: 2119-2129.
- 126 **Bowen, M. A., Patel, D. D., Li, X., Modrell, B., Malacko, A. R., Wang, W. C., Marquardt, H., Neubauer, M., Pesando, J. M., Francke, U.**, Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J. Exp. Med.* 1995. **181**: 2213.
- 127 **Sun, D., Branum, K., Sun, Q.**, Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by treatment with an anti-rat CD5 antibody (OX19). *Cell Immunol* 1992. **145**: 263-271.
- 128 **Plater-Zyberk, C., Taylor, P. C., Blaylock, M. G., Maini, R. N.**, Anti-CD5 therapy decreases severity of established disease in collagen type II-induced arthritis in DBA/1 mice. *Clin Exp Immunol* 1994. **98**: 442-447.
- 129 **Martin, P. J., Nelson, B. J., Appelbaum, F. R., Anasetti, C., Deeg, H. J., Hansen, J. A., McDonald, G. B., Nash, R. A., Sullivan, K. M., Witherspoon, R. P., Scannon, P. J., Friedmann, N., Storb, R.**, Evaluation of a CD5-specific immunotoxin for treatment of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1996. **88**: 824-830.
- 130 **Beyers, A. D., Spruyt, L., Williams, A. F.**, Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4, or CD8 and CD5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. **89**: 2945-2949.
- 131 **Osman, N., Lazarovits, A. I., Crumpton, M. J.**, Physical association of CD5 and the T cell receptor/CD3 antigen complex on the surface of human T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1993. **23**: 1173-1176.
- 132 **Lankester, A. C., van Schijndel, G. M., Cordell, J. L., van Noesel, C. J., van Lier, R. A.**, CD5 is associated with the human B cell antigen receptor complex. *Eur J Immunol* 1994. **24**: 812-816.
- 133 **Ledbetter, J. A., Martin, P. J., Spooner, C. E., Wofsy, D., Tsu, T. T., Beatty, P. G., Gladstone, P.**, Antibodies to Tp67 and Tp44 augment and sustain proliferative responses of activated T cells. *J Immunol* 1985. **135**: 2331-2336.
- 134 **Ceuppens, J. L., Baroja, M. L.**, 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* 1986. **137**: 1816-1821.
- 135 **Spertini, F., Stohl, W., Ramesh, N., Moody, C., Geha, R. S.**, Induction of human T cell proliferation by a monoclonal antibody to CD5. *J Immunol* 1991. **146**: 47-52.
- 136 **Alberola-Ila, J., Places, L., Cantrell, D. A., Vives, J., Lozano, F.**, Intracellular events involved in CD5-induced human T cell activation and proliferation. *J Immunol* 1992. **148**: 1287-1293.
- 137 **Vandenberghe, P., Ceuppens, J. L.**, 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* 1991. **21**: 251-259.
- 138 **Verwilghen, J., Vandenberghe, P., Wallays, G., de Boer, M., Anthony, N., Panayi, G. S., Ceuppens, J. L.**, 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* 1993. **150**: 835-846.
- 139 **Yashiro-Ohtani, Y., Zhou, X.-Y., Toyooka, K., Tai, X.-G., Park, C.-S., Hamaoka, T., Abe, R., Miyake, K., Fujiwara, H.**, Non-CD28

- costimulatory molecules present in T cell rafts induce T cell costimulation by enhancing the association of TCR with rafts. *J. Immunol.* 2000. **164**: 1251-1259.
- 140 **Tarakhovsky, A., Kanner, S. B., Hombach, J., Ledbetter, J. A., Müller, W., Killeen, N., Rajewsky, K.**, A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* 1995. **269**: 535-537.
- 141 **Bikah, G., Carey, J., Ciallella, J. R., Tarakhovsky, A., Bondada, S.**, CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. *Science* 1996. **274**: 1906-1909.
- 142 **Peña-Rossi, C., Zuckerman, L. A., Strong, J., Kwan, J., Ferris, W., Chan, S., Tarakhovsky, A., Beyers, A. D., Killeen, N.**, Negative regulation of CD4 lineage development and responses by CD5. *J Immunol* 1999. **163**: 6494-6501.
- 143 **Dennehy, K. M., Broszeit, R., Garnett, D., Durrheim, G. A., Spruyt, L. L., Beyers, A. D.**, Thymocyte activation induces the association of phosphatidylinositol 3-kinase and pp120 with CD5. *Eur J Immunol* 1997. **27**: 679-686.
- 144 **Raab, M., Yamamoto, M., Rudd, C. E.**, The T-cell antigen CD5 acts as a receptor and substrate for the protein-tyrosine kinase p56lck. *Mol Cell Biol* 1994. **14**: 2862-2870.
- 145 **Gary-Gouy, H., Lang, V., Sarun, S., Boumsell, L., Bismuth, G.**, In vivo association of CD5 with tyrosine-phosphorylated ZAP-70 and p21 phospho-zeta molecules in human CD3+ thymocytes. *J Immunol* 1997. **159**: 3739-3747.
- 146 **Gringhuis, S. I., de Leij, L. F., Coffey, P. J., Vellenga, E.**, Signaling through CD5 activates a pathway involving phosphatidylinositol 3-kinase, Vav, and Rac1 in human mature T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 1998. **18**: 1725-1735.
- 147 **Dennehy, K. M., Broszeit, R., Ferris, W. F., Beyers, A. D.**, Thymocyte activation induces the association of the proto-oncoprotein c-cbl and ras GTPase-activating protein with CD5. *Eur J Immunol* 1998. **28**: 1617-1625.
- 148 **Doody, G. M., Justement, L. B., Delibrias, C. C., Matthews, R. J., Lin, J., Thomas, M. L., Fearon, D. T.**, A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* 1995. **269**: 242-244.
- 149 **Lorenz, U., Ravichandran, K. S., Burakoff, S. J., Neel, B. G.**, Lack of SHPTP1 results in src-family kinase hyperactivation and thymocyte hyperresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. **93**: 9624-9629.
- 150 **Pani, G., Fischer, K. D., Mlinaric-Rascan, Y., Siminovitch, K. A.**, Signaling capacity of the T cell antigen receptor is negatively regulated by the PTP1C tyrosine phosphatase. *J Exp Med* 1996. **184**: 839-852.
- 151 **Sen, G., Bikah, G., Venkataraman, C., Bondada, S.**, 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.* 1999. **29**: 3319-3328.
- 152 **Perez-Villar, J. J., Whitney, G. S., Bowen, M. A., Hewgill, D. H., Aruffo, A. A., Kanner, S. B.**, CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol* 1999. **19**: 2903-2912.
- 153 **Gary-Gouy, H., Bruhns, P., Schmitt, C., Dalloul, A., Daeron, M., Bismuth, G.**, The pseudo-immunoreceptor tyrosine-based activation motif of CD5 mediates its inhibitory action on B-cell receptor signaling. *J Biol Chem* 2000. **275**: 548-556.
- 154 **Murphy, M. A., Schnall, R. G., Venter, D. J., Barnett, L., Bertoncello, I., Thien, C. B., Langdon, W. Y., Bowtell, D. D.**, Tissue hyperplasia and enhanced T-cell signalling via ZAP-70 in c-Cbl-deficient mice. *Mol Cell Biol* 1998. **18**: 4872-4882.

- 155 **Naramura, M., Kole, H. K., Hu, R. J., Gu, H.,** Altered thymic positive selection and intracellular signals in Cbl-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. **95**: 15547-15552.
- 156 **Ota, Y., Samelson, L. E.,** The product of the proto-oncogene c-cbl: a negative regulator of the Syk tyrosine kinase. *Science* 1997. **276**: 418-420.
- 157 **Hou, D., Cenciarelli, C., Jensen, J. P., Nguygen, H. B., Weissman, A. M.,** Activation-dependent ubiquitination of a T cell antigen receptor subunit on multiple intracellular lysines. *J Biol Chem* 1994. **269**: 14244-14247.
- 158 **Bonifacino, J. S., Weissman, A. M.,** Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998. **14**: 19-57.
- 159 **Rotin, D., Staub, O., Haguenaer-Tsapis, R.,** Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membrane Biol* 2000. **176**: 1-17.
- 160 **Bauch, A., Campbell, K. S., Reth, M.,** Interaction of the CD5 cytoplasmic domain with the Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II δ . *Eur J Immunol* 1998. **28**: 2167-2177.
- 161 **Valentine, M. A., Czernik, A. J., Rachie, N., Hidaka, H., Fisher, C. L., Cambier, J. C., Bomsztyk, K.,** Anti-immunoglobulin M activates nuclear calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in human B lymphocytes. *J Exp Med* 1995. **182**: 1943-1949.
- 162 **Genot, E. M., Meier, K. E., Licciardi, K. A., Ahn, N. G., Uittenbogaart, C. H., Wietzerbin, J., Clark, E. A., Valentine, M. A.,** Phosphorylation of CD20 in cells from hairy cell leukemia cell line. Evidence for involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Immunol* 1993. **151**: 72-82.
- 163 **Sun, P., Enslin, H., Myung, P. S., Maurer, R. A.,** Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev* 1994. **8**: 2527-2539.
- 164 **Bland, M. M., McDonald, O. B., Carrera, A. C.,** p56lck phosphorylation by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type II. *Biochem Biophys Res Commun* 1994. **198**: 67-73.
- 165 **Nghiem, P., Ollick, T., Gardner, P., Schulman, H.,** Interleukin-2 transcriptional block by multifunctional Ca²⁺/calmodulin kinase. *Nature* 1994. **371**: 347-350.
- 166 **Hama, N., Paliogianni, F., Fessler, B. J., Boumpas, D. T.,** 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* 1995. **181**: 1217-1222.
- 167 **June, C. H., Rabinovitch, P. S., Ledbetter, J. A.,** CD5 antibodies increase intracellular ionized calcium concentration in T cells. *J Immunol* 1987. **138**: 2782-2792.
- 168 **Imboden, J. B., June, C. H., McCutcheon, M. A., Ledbetter, J. A.,** Stimulation of CD5 enhances signal transduction by the T cell antigen receptor. *J Clin Invest* 1990. **85**: 130-134.
- 169 **Simarro, M., Pelassy, C., Calvo, J., Places, L., Aussel, C., Lozano, F.,** The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production. *J Immunol* 1997. **159**: 4307-4315.
- 170 **Simarro, M., Calvo, J., Vilà, J. M., Places, L., Padilla, O., Alberola-Ila, J., Vives, J., Lozano, F.,** Signaling through CD5 involves acidic sphingomyelinase, protein kinase C-zeta, mitogen-activated protein kinase kinase, and c-Jun NH₂-terminal kinase. *J Immunol* 1999. **162**: 5149-5155.
- 171 **Hannun, Y. A.,** Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 1996. **274**: 1855-1859.
- 172 **Lozano, J., Berra, E., Municio, M. M., Diaz_Meco, M. T., Dominguez, I., Sanz, L.,**

- Moscat, J.**, Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1994. **269**: 19200-19202.
- 173 **Muller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D., Pfizenmaier, K.**, PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J* 1995. **14**: 1961-1969.
- 174 **Nakanishi, H., Brewer, K. A., Exton, J. H.**, Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1993. **268**: 13-16.
- 175 **Limatola, C., Schaap, D., Moolenaar, W. H., van_Blitterswijk, W. J.**, Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isotypes and other acidic lipids. *Biochem J* 1994. **304 (Pt 3)**: 1001-1008.
- 176 **Diaz_Meco, M. T., Muncio, M. M., Frutos, S., Sanchez, P., Lozano, J., Sanz, L., Moscat, J.**, The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell* 1996. **86**: 777-786.
- 177 **Gomez, J., Garcia, A., R_Borlado, L., Bonay, P., Martinez_A, C., Silva, A., Fresno, M., Carrera, A. C., Eicher_Streiber, C., Rebollo, A.**, IL-2 signaling controls actin organization through Rho-like protein family, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase C-zeta. *J Immunol* 1997. **158**: 1516-1522.
- 178 **Ward, S. G., Parry, R., LeuFeuvre, C., Sansom, D. M., Westwick, J., Lazarovits, A. Y.**, Antibody ligation of CD7 leads to association with phosphoinositide 3-kinase and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate formation in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1995. **25**: 502-507.
- 179 **Gringhuis, S. I., de Leij, L. F., Wayman, G. A., Tokumitsu, H., Vellenga, E.**, The Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase type IV is involved in the CD5-mediated signaling pathway in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 1997. **272**: 31809-31820.
- 180 **Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., Greenberg, M. E.**, Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995. **270**: 1326-1331.
- 181 **Berra, E., Diaz_Meco, M. T., Lozano, J., Frutos, S., Muncio, M. M., Sanchez, P., Sanz, L., Moscat, J.**, Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *EMBO J* 1995. **14**: 6157-6163.
- 182 **Enslin, H., Tokumitsu, H., Stork, P. J., Davis, R. J., Soderling, T. R.**, Regulation of mitogen-activated protein kinases by a calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. **93**: 10803-10808.
- 183 **Chevray, P. M., Nathans, D.**, Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992. **89**: 5789-5793.
- 184 **Breeden, L., Nasmyth, K.**, Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1985. **50**: 643-650.
- 185 **Aussel, C., Pelassy, C., Rossi, B.**, Breakdown of a phosphatidylcholine pool arising from the metabolic conversion of phosphatidylethanolamine as a novel source of diacylglycerol in activated T cells. *J Lipid Mediat* 1990. **2**: 103-116.
- 186 **Schmid, S. L.**, Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* 1997. **66**: 511-548.
- 187 **Kirchhausen, T.**, Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999. **15**: 705-732.
- 188 **Bonifacino, J. S., Dell_Angelica, E. C.**, Molecular bases for the recognition of tyrosine-

- based sorting signals. *J Cell Biol* 1999. **145**: 923-926.
- 189 **Heuser, J. E., Anderson, R. G.**, Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* 1989. **108**: 389-400.
- 190 **Hansen, S. H., Sandvig, K., van_Deurs, B.**, Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J Cell Biol* 1993. **121**: 61-72.
- 191 **Oka, J. A., Christensen, M. D., Weigel, P. H.**, Hyperosmolarity inhibits galactosyl receptor-mediated but not fluid phase endocytosis in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1989. **264**: 12016-12024.
- 192 **Raman, C., Kimberly, R. P.**, Differential CD5-dependent regulation of CD5-associated CK2 activity in mature and immature T cells: implication on TCR/CD3-mediated activation. *J Immunol* 1998. **161**: 5817-5820.
- 193 **Myung, P. S., Boerthe, N. J., Koretzky, G. A.**, Adapter proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 2000. **12**: 256-266.
- 194 **Pawson, T., Scott, J. D.**, Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 1997. **278**: 2075-2080.
- 195 **Wange, R. L., Samelson, L. E.**, Complex complexes: signaling at the TCR. *Immunity* 1996. **5**: 197-205.
- 196 **Peterson, E. J., Clements, J. L., Fang, N., Koretzky, G. A.**, Adaptor proteins in lymphocyte antigen-receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 1998. **10**: 337-344.
- 197 **Tomlinson, M. G., Lin, J., Weiss, A.**, Lymphocytes with a complex: adapter proteins in antigen receptor signaling. *Immunol Today* 2000. **21**: 584-591.
- 198 **Andoniou, C. E., Lill, N. L., Thien, C. B., Lupher, M. L., Ota, S., Bowtell, D. D., Scaife, R. M., Langdon, W. Y., Band, H.**, The Cbl proto-oncogene product negatively regulates the Src-family tyrosine kinase Fyn by enhancing its degradation. *Mol Cell Biol* 2000. **20**: 851-867.
- 199 **Tuazon, P. T., Traugh, J. A.**, Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1991. **23**: 123-164.
- 200 **Luscher, B., Christenson, E., Litchfield, D. W., Krebs, E. G., Eisenman, R. N.**, Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. *Nature* 1990. **344**: 517-522.
- 201 **Jain, N., Mahendran, R., Philp, R., Guy, G. R., Tan, Y. H., Cao, X.**, Casein kinase II associates with Egr-1 and acts as a negative modulator of its DNA binding and transcription activities in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 1996. **271**: 13530-13536.
- 202 **Chu, Z. L., McKinsey, T. A., Liu, L., Qi, X., Ballard, D. W.**, Basal phosphorylation of the PEST domain in the I(kappa)B(beta) regulates its functional interaction with the c-rel proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 1996. **16**: 5974-5984.
- 203 **Armstrong, S. A., Barry, D. A., Leggett, R. W., Mueller, C. R.**, Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity. *J Biol Chem* 1997. **272**: 13489-13495.
- 204 **Pedrotti, B., Islam, K.**, Dephosphorylated but not phosphorylated microtubule associated protein MAP1B binds to microfilaments. *FEBS Lett* 1996. **388**: 131-133.
- 205 **Karki, S., Tokito, M. K., Holzbaur, E. L.**, Casein kinase II binds to and phosphorylates cytoplasmic dynein. *J Biol Chem* 1997. **272**: 5887-5891.
- 206 **Stover, D. R., Walsh, K. A.**, Protein-tyrosine phosphatase activity of CD45 is activated by sequential phosphorylation by two kinases. *Mol Cell Biol* 1994. **14**: 5523-5532.
- 207 **Jones, B. G., Thomas, L., Molloy, S. S., Thulin, C. D., Fry, M. D., Walsh, K. A.**

- Thomas, G.**, Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J* 1995. **14**: 5869-5883.
- 208 **Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R., Nishizuka, Y.**, Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 1983. **258**: 11442-11445.
- 209 **Parker, P. J., Stabel, S., Waterfield, M. D.**, Purification to homogeneity of protein kinase C from bovine brain-identity with the phorbol ester receptor. *EMBO J* 1984. **3**: 953-959.
- 210 **Kemp, B. E., Pearson, R. B.**, Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem Sci* 1990. **15**: 342-346.
- 211 **Ley, S. C., Marsh, M., Bebbington, C. R., Proudfoot, K., Jordan, P.**, Distinct intracellular localization of Lck and Fyn protein tyrosine kinases in human T lymphocytes. *J Cell Biol* 1994. **125**: 639-649.
- 212 **Denny, M. F., Patai, B., Straus, D. B.**, Differential T-cell antigen receptor signaling mediated by the Src family kinases Lck and Fyn. *Mol Cell Biol* 2000. **20**: 1426-1435.
- 213 **Alberola-Ila, J., Takaki, S., Kerner, J. D., Perlmutter, R. M.**, Differential signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol* 1997. **15**: 125-154.
- 214 **Dennehy, K. M., Ferris, W. F., Veenstra, H., Zuckerman, L. A., Killeen, N., Beyers, A. D.**, Determination of the tyrosine phosphorylation sites in the T cell transmembrane glycoprotein CD5. *Int Immunol* 2001. **13**: 149-156.
- 215 **Appel, K., Wagner, P., Boldyreff, B., Issinger, O. G., Montenarh, M.**, Mapping of the interaction sites of the growth suppressor protein p53 with the regulatory beta-subunit of protein kinase CK2. *Oncogene* 1995. **11**: 1971-1978.
- 216 **Koskinen, R., Göbel, T. W., Tregaskes, C. A., Young, J. R., Vainio, O.**, The structure of avian CD5 implies a conserved function. *J Immunol* 1998. **160**: 4943-4950.
- 217 **Dustin, M. L., Cooper, J. A.**, The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* 2000. **1**: 23-29.
- 218 **Alberola-Ila, J., Places, L., Fabregat, V., Vives, J., Lozano, F.**, Different mechanisms regulate the monoclonal antibody-induced modulation of CD2, CD3, and CD5 in human lymphocytes. *Cell Immunol* 1993. **147**: 247-255.
- 219 **Weiss, A., Imboden, J. B.**, Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation. *Adv Immunol* 1987. **41**: 1-38.
- 220 **Yant, S., Hirano, A., Wong, T. C.**, Identification of a cytoplasmic Tyr-X-X-Leu motif essential for down regulation of the human cell receptor CD46 in persistent measles virus infection. *J Virol* 1997. **71**: 766-770.
- 221 **Olson, J. K., Grose, C.**, Endocytosis and recycling of varicella-zoster virus Fc receptor glycoprotein gE: internalization mediated by a YXXL motif in the cytoplasmic tail. *J Virol* 1997. **71**: 4042-4054.
- 222 **Li, Y., Paz_Marzolo, M., van_Kerkhof, P., Strous, G. J., Bu, G.**, The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 2000. **275**: 17187-17194.
- 223 **Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W. Y., Beguinot, L., Geiger, B., Yarden, Y.**, c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev* 1998. **12**: 3663-3674.
- 224 **Miyake, S., Lupher, M. L. J., Druker, B., Band, H.**, The tyrosine kinase regulator Cbl enhances the ubiquitination and degradation of the platelet-derived growth factor receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. **95**: 7927-7932.

- 225 **Lee, P. S., Wang, Y., Dominguez, M. G., Yeung, Y. G., Murphy, M. A., Bowtell, D. D., Stanley, E. R.**, The Cbl protooncoprotein stimulates CSF-1 receptor multiubiquitination and endocytosis, and attenuates macrophage proliferation. *EMBO J* 1999. **18**: 3616-3628.
- 226 **Hicke, L.**, Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. *FASEB J* 1997. **11**: 1215-1226.
- 227 **Hershko, A., Ciechanover, A.**, The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998. **67**: 425-479.
- 228 **Strous, G. J., van Kerkhof, P., Govers, R., Rotwein, P., Schwartz, A. L.**, Growth hormone-induced signal transduction depends on an intact ubiquitin system. *J Biol Chem* 1997. **272**: 40-43.
- 229 **Cenciarelli, C., Wilhelm, K. G. J., Guo, A., Weissman, A. M.**, T cell antigen receptor ubiquitination is a consequence of receptor-mediated tyrosine kinase activation. *J Biol Chem* 1996. **271**: 8709-8713.
- 230 **Galcheva-Gargova, Z., Theroux, S. J., Davis, R. J.**, The epidermal growth factor receptor is covalently linked to ubiquitin. *Oncogene* 1995. **11**: 2649-2655.
- 231 **Mori, S., Heldin, C. H., Claesson-Welsh, L.**, Ligand-induced ubiquitination of the platelet-derived growth factor beta-receptor plays a negative regulatory role in its mitogenic signaling. *J Biol Chem* 1993. **268**: 577-583.
- 232 **Wang, Y., Yeung, Y. G., Stanley, E. R.**, CSF-1 stimulated multiubiquitination of the CSF-1 receptor and of Cbl follows their tyrosine phosphorylation and association with other signaling proteins. *J Cell Biochem* 1999. **72**: 119-134.

VIII. APÉNDICE

Los años de investigación en el Servei d'Immunologia de l'Hospital Clínic han permitido la publicación de diversos trabajos en revistas científicas especializadas, y la presentación de algunos de éstos en Congresos de Inmunología. A continuación se detallan:

Publicaciones:

- (1) **Vilà, J.M.**, Gimferrer, I., Padilla, O., Arman, M., Places, L., Simarro, M., Vives, J., Lozano, F., *Residues Y429 and Y463 of the human CD5 are targeted by protein tyrosine kinases. European Journal of Immunology.* 2001, 31: 1191-1198.
- (2) **Vilà, J.M.**, Calvo, J., Places, L., Padilla, O., Arman, M., Gimferrer, I., Aussel, C., Vives, J., Lozano, F., *Role of two conserved cytoplasmic threonine residues (T410 and T412) in CD5 signaling. Journal of Immunology.* 2001, 166: 396-402.
- (3) **Vilà, J.M.**, O. Padilla, M. Arman, I. Gimferrer, and F. Lozano. *The scavenger receptor cysteine-rich superfamily (SRCR-SF): structure and function of group B members. Inmunología,* 2000; 19:105-121
- (4) Lozano, F., Simarro, M., Calvo, J., **Vilà J.M.**, Padilla, O., Bowen, M., Campbell, K., *CD5 signal transduction: positive or negative modulation of antigen receptor signaling. Critical Reviews in Immunology.* 2000, 20: 347-358.
- (5) Simarro, M., J. Calvo, **J.M. Vilà**, L. Places, O. Padilla, J. Alberola-Ila, J. Vives, and F. Lozano. *Signaling through CD5 involves acidid sphingomyelinase, protein kinase C-zeta, mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) and c-jun NH2-terminal kinase. J. Immunol.,* 1999; 162: 5149-5155
- (6) Calvo, J., **Vilà, J.M.**, Places, L., Simarro, M., Padilla, O., Andreu, D., Campbell, K., Aussel, C., Vives, J., Lozano, F., *Human CD5 signaling and constitutive phosphorylation of C-terminal serine residues by Casein Kinase II. Journal of Immunology.* 1998, 161: 6022-6029.

Presentaciones:

- (1) **J.M.Vilà**, I.Gimferrer, O.Padilla, M.Arman, L.Places, J.Vives, J.Alberola, F.Lozano. Proteínas adaptadoras y señalización mediada por CD5. **Inmunología**, 2001; 20 (Supl.1): 7. *XXVII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología* (Madrid).
- (2) **J.M.Vilà**, I.Gimferrer, O.Padilla, M.Arman, L.Places, M.Simarro, J.Vives, F.Lozano. Proteïnes tirosincinasses fosforilen CD5 a nivell dels residus Y429 i Y463. 2000. *XIV Jornada d'Actualitzacions i Avenços en Immunologia* (Barcelona).
- (3) **J.M.Vilà**, J.Calvo, L.Places, O.Padilla, I.Gimferrer, M.Arman, J.Vives, F.Lozano. Los residuos T410 y T412 son las únicas dianas para PKC en la región citoplasmática de CD5. **Inmunología**, 2000; 19 (Supl.1): 65. *XXVI Congreso de la Sociedad Española de Inmunología* (Sevilla).
- (4) **J.M. Vilà**, J.Calvo, L.Places, O. Padilla, F. Lozano. La región citoplasmática de CD5 más proximal a la membrana se asocia y es substrato para cinasas intracelulares. **Inmunología**, 1999; 18 (Supl 1) : 47. *XXV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología* (Torremolinos).
- (5) **J.M.Vilà**, J.Calvo, M.Simarro, O.Padilla, L.Places, F.Lozano. Interacción de CD5 con CKII. **Inmunología**, 1998; 17 (Supl. 1) : 12. *XXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología* (Murcia).
- (6) **J.M.Vilà**, M.Simarro, J.Calvo, O.Padilla, T.Gallart, L.Places, F.Lozano. CD5 induce la generación de ceramida vía la activación de A-SMasa. **Inmunología**, 1998; 17 (Supl. 1) : 11. *XXIV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología* (Murcia).

Agradecimientos

Al Paco, per l'extraordinària direcció d'aquesta tesi. Sense el seu ajut constant, el seu savi criteri, el seu permanent interès en el meu treball, la confiança dipositada en mi des del primer dia, el seu tracte sempre obert i, sobretot, la motivació que durant tots aquests anys m'ha sabut donar, no hagués pogut arribat fins aquest punt. De tot cor, m'agradaria transmetre-li el meu més profund agraïment.

Al Dr. Vives, per acollir-me al Servei i permetre la consecució digna d'aquesta tesi; i sobretot per recolzar-me en els moments més crítics de la meva etapa al Clínic. Sempre li estaré molt agraït.

A tots els qui han estat al meu costat, colze a colze, pipetejant a l'habitació del fons a l'esquerra, ... als "pacos". A la Lourdes, per alegrar-me la vista cada dia des de la poyata, i cuidar de mi en un laboratori predominantment del sexe contrari. Al Javier, per omplir d'alegria i diversió el laboratori; per la seva predisposició permanent a ajudar-te; ha estat sempre un exemple a seguir. A l'Olga, per començar plegats a descobrir aquest món de 90% fracassos / 10% pletòrics èxits, i emparar-me sempre de la seva tan fresca simpatia. A la Idoia, la "resi" del grup, per ser una constant font d'informació sempre actualitzada, i una persona d'un optimisme desbordant, inclús quan les coses s'entossudeixen a no sortir. A la Mònica, per la seva claredat de pensament i paraula, i el seu fantàstic tracte. A l'Agustí, el "petit" de la família, per ser una persona d'un "gran" cor, disposada sempre a ajudar-te. A la Maria, per ensenyar-me a donar els primers passos en el món de l'experimentació.

A l'Anna i al Dani, una fantàstica parella i uns companys excel·lents, per regalar-me sempre càlids i inoblidables moments.

A la Fiorella, per l'amistat i el suport que sempre m'ha entregat, tan dins com fora del laboratori; per animar els dies durs de treball.

A tots els qui m'han acompanyat durant els meus anys de tesi al Servei d'Immunologia: becaris (Olga M., Montse P., Marie-Hélène, Anna I., Juantxo, Catalina, Raquel, Elena, Lluïsa, Xavi, Cristina), residents (Eduard, Lídia, Carme, Anna G.), tècnics (Juanjo, Àngels, Susana, Pepa, Isabel, Jordi M., Fina, M^a José, Montse, Maite, Virginia, Belén, Marisol, Loli, M^a Carmen,...), adjunts (Ramon, Teresa, Carles, Jordi Y., Jaume, Odette, Guadalupe, Toni), a la "super" Cristina, i molt especialment a la Mercè, pel suport administratiu i logístic que en tot moment m'ha sabut donar.

A la Juanita, per relaxar el meu estat físic i mental amb mans poderoses.

A la Mariona i a l'Helena, per ajudar-me quan més ho he necessitat.

Al Pepe Alberola-Illa i al Marc Isamat per la seva col·laboració en la consecució d'aquests treball doctoral.

A tots ells, moltíssimes gràcies.

