

Grupo de Biología del Linfocito. Universidad de Santiago de Compostela

Montserrat Nogueira Álvarez

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Santiago de Compostela.

Componentes del grupo

Montserrat Nogueira Álvarez; Pilar Árias Crespo; Francisco J Salgado; Oscar Cordero Santamaría; Ana Canda-Sánchez; Amparo Pérez Díaz; Carla Varela.

Historia del grupo

Nuestras investigaciones comenzaron con los trabajos sobre Protimosina α (ProT α), un péptido muy ácido (50% de glutámico/aspártico). Su alto grado de conservación filogenética sugería un papel muy importante, describiéndose de hecho a lo largo de estos años funciones tanto intracelulares (división celular) como extracelulares muy dispares. Desde el principio nuestro grupo se centró en las funciones extracelulares, describiendo cómo ProT α aumentaba la citotoxicidad de células NK o la proliferación y secreción de IL-2 en PBMC estimulados por PHA. Dentro del estudio de ProT α resultaba también esencial la caracterización del receptor de superficie que daba cuenta de estas funciones extracelulares. Se diseñó un sistema de marcaje radioactivo (^{125}I) para ProT α que permitió identificar dos receptores específicos, uno de baja y otro de alta afinidad. Estos receptores eran regulados por el estado de la célula y se internalizaban tras su interacción con ProT α . Experimentos posteriores nos permitieron estimar la masa molecular relativa de las proteínas de unión a ProT α siendo ésta de 31, 29 y 19 kDa. Por otra parte, desde finales de los 90 se empezó a ver que muchas proteínas de señalización celular se encontraban asociadas en la superficie celular a microdominios (rafts lipídicos) de composición sensiblemente diferenciada de su entorno. Nos preguntamos si el receptor de ProT α se encontraba también concentrado en estas regiones de membrana. Nuestros resultados indicaron, sin lugar a duda, una fuerte asociación con rafts lipídicos, la formación de agregados tras la unión a su ligando ("cap like structures") así como la participación activa de los

rafts en los procesos de transducción de señales. Esperamos, en breve, poder aportar más datos acerca de este receptor, de los componentes de la cascada de señalización intracelular así como de la estructura primaria de las proteínas que lo constituyen.

Aparte de ProT α , CD26 es también objetivo de la investigación farmacéutica y básica. Ecto-peptidasa multifuncional presente en un amplio espectro de células, presenta un papel muy relevante en diabetes y artritis reumatoide, así como en progresión/agresividad tumoral y obesidad. Su expresión está regulada en linfocitos T se la ha relacionado con el control de la actividad de citoquinas y quimioquinas así como de rutas clave de adhesión y señalización vía integrinas o CD45, respectivamente. Nuestros estudios comenzaron en el año 1997, describiendo un espectacular incremento de CD26 y de su actividad dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) en linfocitos T activados, especialmente T CD4⁺ y CD8⁺, coestimulados con IL-12. A pesar de que en el año 1991 se había descrito coexpresión/interacción de CD26 y CD45R0 en células T de memoria en ese mismo artículo obtuvimos datos que indicaban que IL-12 tenía un efecto totalmente opuesto sobre la expresión de ambas moléculas, causando una disminución de la expresión de CD45R0. Este dato fue de notable importancia para investigaciones futuras. En el año 2000 también publicamos que el aumento de expresión de CD26 dependiente de IL-12 era debido a procesos postranscripcionales.

En 2003 demostramos que CD26 y CD45R0 estaban presentes tanto en fracciones raft como no-raft de células T en reposo y activadas, variando su presencia relativa de acuerdo con las condiciones de activación. Propusimos y demostramos entonces un modelo de interacción de tipo *cis* dependiente de IL-12, en el cual los mayores niveles de CD26 generados por la citoquina estaban regulando el desplazamiento de CD45R0 fuera de rafts y, con ello, la actividad fosfatasa de CD45. Además, comenzamos los trabajos con el receptor de IL-12 (IL-12R). IL-12R está formado por dos subunidades (IL-12R α 1 e IL-12R α 2) que carecen de actividad enzimática

intrínseca, por lo que la cascada de transducción de señales es a través de la vía Jak/STAT, en donde Jak2, Tyk2 y STAT4 son componentes esenciales. Por eso, y a raíz de los datos anteriormente comentados, nuestro grupo planteó una hipótesis en la cual la salida de CD45R0 (fosfatasa de tirosina) de zona raft tenía como objetivo su acercamiento a Tyk2, una quinasa Janus que interacciona con IL-12R β 1 y que es sustrato de CD45. Tyk2 quedaría de esta forma defosforilada e inactivada. Todo ello relacionaría a CD26 con un mecanismo de «retroalimentación negativa» para desconectar la señalización desencadenada a través de IL-12R. Además, IL-12, como ocurre con otras citoquinas, podría también activar otras vías de señalización aparte de la clásica Jak/STAT, como las MAP quinasa Raf-Mek1-Erk1/2 o la familia Src, lo cual podría relacionarse con el enriquecimiento en rafts de ciertas moléculas de señalización o la inducción de proliferación celular en linfocitos T; estaba claro que para todo ello habría que investigar la topología de IL-12R α 1 e IL-12R α 2 en linfocitos T humanos.

Avanzando en esta línea, hemos demostrado recientemente que la IL-12 es capaz de inducir fosforilación y activación de la cascada de MAPK quinasa Raf-Mek1-Erk1/2 y que la activación de estas quinasa es dependiente de la integridad de las regiones raft de membrana plasmática. Estos resultados nos hicieron sospechar que alguna o las dos proteínas (β 1 β 2) que conforman el receptor de IL-12, podrían estar en microdominios raft. De hecho, aparte de analizar mediante geles bidimensionales las especies proteicas de los rafts lipídicos y la influencia de IL-12 sobre esta composición, obtuvimos resultados que nos indicaban que, en ausencia de IL-12, IL-12R β 2 se encontraba fundamentalmente en zona raft e IL-12R β 1 en regiones no-raft, provocando la presencia de IL-12 una primera señal β 2-dependiente y un desplazamiento de IL-12R β 2 a zonas no raft, en donde podría asociarse con IL-12R β 1 y mediar una señal β 1 β 2-dependiente. Todos estos resultados están recogidos en un trabajo pendiente de publicar (“Lipid rafts and how to regulate signalling via IL-12R through protein positioning on cell membrane.”).

Aparte de CD45R0, CD26 interacciona con otras proteínas en la superficie como adenosín deaminasa (ectoADA). Una serie de estudios de microscopía confocal fueron diseñados para revelar la posible relación entre IL-12 y otras citoquinas (IL-2, IL-4, TNF α) con la expresión, regulación y ubicación en la superficie celular de CD26, ecto-ADA y CD45R0. También estudiamos la influencia de CD26 en la vía

de transporte de ADA hacia la superficie celular. Fruto de estos estudios se descubrió que la presencia de ecto-ADA era independiente de la actividad del gen, que sus niveles estaban controlados por citoquinas, que ecto-ADA se unía sólo parcialmente a CD26 y que CD26 no formaba parte de la vía de secreción del ADA intracelular. Hipotetizamos, además, que ecto-ADA podía estar relacionado en diversos contactos célula-célula. Finalmente, a lo largo de estos años también publicamos diversos trabajos sobre CD26 soluble (sCD26) como biomarcador. En dos trabajos se estudió el valor potencial diagnóstico y pronóstico de CD26s en pacientes con carcinoma colorectal. El otro se corresponde con una colaboración con el Servicio de Reumatología del Hospital Clínico Universitario de Santiago que se sigue manteniendo hoy en día en la que estudiamos la presencia de IL-12, IL-15, CD26s y ADA en pacientes con artritis reumatoide. Como prolongación natural de estos estudios hemos puesto a punto un método de análisis de muestras de suero que permite eliminar con volúmenes de partida mayores de lo habitual albúmina e inmunoglobulinas totales. También se está comenzando a analizar, mediante geles bidimensionales, los sueros fraccionados de individuos sanos y de pacientes a los que se les ha diagnosticado recientemente una artritis reumatoide, a la búsqueda de un biomarcador temprano de esta enfermedad.

Objetivos científicos

Como su propio nombre indica este grupo utiliza como modelo de trabajo los linfocitos T humanos y tiene actualmente dos grandes objetivos. El primero de ellos, encuadrado en lo que podríamos denominar investigación básica, es profundizar en el modelo de mosaico fluido de la membrana biológica, analizando los movimientos laterales de sus distintos componentes (especialmente proteínas y lípidos) así como su segregación en determinados microdominios (“rafts” o balsas lipídicas) en respuesta a estímulos mediados por el receptor de la célula T (TCR) o receptores de citoquinas y factores de crecimiento. Asimismo, este primer objetivo también engloba estudiar si esa segregación puede afectar a la señalización de esos receptores, potenciándola, inhibiéndola o modificando de algún modo su funcionalidad. Para ello investigamos mediante distintas técnicas proteómicas/interactómi-

cas y de inmunofluorescencia la dinámica de varias moléculas de la superficie del linfocito T (CD26, CD45, IL-12R, receptor de Protimosina α), así como la influencia de las asociaciones transitorias con otros receptores en los procesos de transducción de señales al interior celular. El segundo de los objetivos, en cambio, pertenece más al ámbito de la investigación aplicada, ya que pretende la búsqueda de biomarcadores séricos de detección temprana de artritis reumatoide mediante el uso de distintas estrategias proteómicas.

Proyectos financiados en convocatorias públicas

- Estudio de la actividad citotóxica de linfocitos activados por IL-2.
- Una aproximación a los mecanismos de modulación de la inmunocapacitación de células T por hormonas tímicas
- Inmunoregulación por protimosina-alfa: mecanismo molecular de acción en células T y estudio preliminar en inmunoterapia adoptiva.
- Activación de la citotoxicidad endógena de células naturales asesinas (NK) humanas por la hormona tímica protimosina-alfa.
- Mecanismo molecular de activación de células naturales asesinas (NK) por protimosina alfa. Posibilidades terapéuticas.
- Receptor de protimosina alfa: caracterización estructural y biológica.
- Mecanismo molecular de protimosina alfa como modificador de la respuesta biológica.
- Detección de biomarcadores de artritis reumatoide mediante técnicas proteómicas.
- Proteínas que interaccionan con CD26 en la membrana plasmática: un estudio proteómico y funcional
- Red de Biotecnología aplicada al ámbito de las ciencias de la salud.
- Interacción de proteínas de membrana como nuevo mecanismo de control de receptores de citoquinas.

Colaboraciones

- Dr. M.N. Jones, Reader of Biochemistry, Medical School, Manchester University.
- Dr. F. Bell, Professor of Immunology, School of Biological Sciences, Manchester University.
- Dr. A. Magee, Professor of Membrane Biology, Imperial College London, Section of Cell and Molecular Biology.
- Dr. R. Franco y Dra. C. Lluís, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Barcelona.
- Dr. F. Sánchez-Madrid, Servicio de Inmunología del Hospital de la Princesa, Madrid.
- Dr. J. Rodríguez-Berrocal y Dra. M. Paez de la Cadena, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Vigo.
- Dr. J. Viñuela y Dr. A. Mera-Varela, del Servicio de Inmunología y del Servicio de Reumatología respectivamente del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela.
- Jaime Sancho. Instituto de Parasitología y Biomedicina. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud. Granada

Publicaciones

Se recogen como material suplementario en la publicación "on line".