

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II)



ASOCIACIÓN DE LAS SUBUNIDADES DE PI3-CN1ASA DE CLASE IA A ICOS (CD278) Y SU IMPORTANCIA EN LA COESTIMULACIÓN

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Yeni Yasbleidy Acosta Ampudia

Bajo la dirección del doctor

José María Rojo Hernández

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA ANIMAL II**



**ASOCIACIÓN DE LAS SUBUNIDADES DE PI3-CINASA
DE CLASE IA A ICOS (CD278) Y SU IMPORTANCIA EN
LA COESTIMULACIÓN**

**Memoria presentada para optar el grado de Doctor por la
Universidad Complutense de Madrid**

YENY YASBLEIDY ACOSTA AMPUDIA

Madrid, 2012

Dirigida por el Dr. José María Rojo Hernández



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CELULAR Y MOLECULAR**

Esta tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación de una Beca Predoctoral del programa “Junta para la Ampliación de Estudios” del C.S.I.C. correspondiente al año 2008.

A mis padres que son el pilar fundamental de mi vida, han creído en mí y me han apoyado siempre. A Leonardo que con su amor, confianza y apoyo me ha ayudado a alcanzar esta meta, se ha sacrificado junto a mí y ha sido mi soporte para no darme por vencida.

"La vida no es sino una continua sucesión de oportunidades para sobrevivir"

Gabriel García Márquez

Agradecimientos

Es difícil entender la importancia de los agradecimientos de una tesis doctoral hasta que no se ha terminado. Intentaré resumir en unas líneas la gratitud que siento a todas las personas que han estado presentes durante esta etapa, haciendo posible que hoy deje de ser un sueño para ser una realidad.

En primer lugar, le agradezco al Dr. José María Rojo, el abrirme las puertas de su grupo de investigación hace ya cuatro años, la dedicación de su tiempo y esfuerzo y por asesorarme tan acertadamente en el desarrollo de esta Tesis. Del mismo modo, agradezco a la Dra. Pilar Portolés, su colaboración e importante aportación al trabajo realizado en esta tesis y muy especialmente por su apoyo.

Me gustaría agradecer al Centro de Investigaciones Biológicas los medios que me ha ofrecido para realizar este trabajo. Además, agradezco a todo el personal del centro por su colaboración y amabilidad, en especial a los servicios de citometría de flujo, proteómica, microscopía y al animalario.

Agradezco a todos los que han formado parte del laboratorio del CIB y de Majadahonda, por brindarme su apoyo y amistad cuando lo necesite, Marisa, Marypaz, María José, Sandra, Gabi, Gloria, María, Laura y Almudena. Gracias de corazón me hicieron sentir como en casa.

Estos cuatro años fuera de mi país estuvieron llenos de alegrías y tristezas. Pero al mismo tiempo encontré amigos que hicieron menos difícil este camino. A todos ellos mi especial agradecimiento: Luisa, Lu, Eva, Virginia, Cristina, Eunáte, Blanco, Mikel, Lucia y Elisa, gracias por adoptarme como una becaria de su laboratorio, echaré de menos los chistes malos y los mil y un temas de debate en las comidas. También agradezco a todos mis amigos de Colombia su amistad y cariño, a pesar de la distancia los sentí muy cerca. Dianita y Tatiana, decidimos juntas venir a España, gracias por su amistad incondicional, son muchas las cosas que hemos compartido y que seguiremos compartiendo.

Quisiera expresar mi gratitud y más sincero cariño a la Universidad del Tolima por todas sus enseñanzas y a la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia por guiar mis primeros pasos en la Investigación.

El más especial de los agradecimientos va dedicado a toda mi familia, por haber soportado tanto tiempo sin vernos, por todo su cariño y apoyo. A mis padres (Stella y Jairo) son el principio de todo, no tengo palabras para agradecer todo lo que han hecho por mí siempre. A mis hermanas Valentina y Yadira, a mi sobrino Juanjo y a mi cuñado Guillermo, ya que de una u otra forma siempre estuvieron cerca para apoyarme y animarme a continuar.

Nada hubiera sido fácil sin ti, Leonardo, como olvidar todos los sacrificios para estar aquí en España, dejaste tu familia, tus amigos, tu trabajo y todo por seguir mi sueño. Gracias por hacerme feliz, por tu amor y apoyo incondicional. Por todo eso y mucho más este triunfo también te pertenece... Lo hemos logrado!!!

A mi segunda familia Sabina, Carlos, Laura, Angie, Santi y Carlitos, gracias por su cariño, por quererme como una hija y apoyarme durante todo este tiempo.

A "Don Hernando y a mi tío Jairo" siempre su recuerdo estará presente en mi mente y en mi corazón, dándome la fortaleza para seguir superándome.

A las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo y lo han hecho posible.

Finalmente y no por eso menos importante, le doy las gracias a Dios por cada una de las personas que ha puesto en mi vida en el momento indicado, por darme la fe y la esperanza de luchar cada día.

A todos mi sincero agradecimiento.

ÍNDICES

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ABREVIATURAS	2
RESUMEN	6
1 INTRODUCCIÓN	9
1.1 ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T	9
1.1.1 Estímulos mediados por el receptor de células T	10
1.2 PI3-CINASAS	13
1.2.1 PI3-cinasas de clase I	13
1.2.2 PI3-cinasa de clase II y III	16
1.2.3 Papel de PI3-cinasa en la activación de linfocitos T	16
1.2.4 Papel de PI3-cinasa en la coestimulación.....	18
1.2.5 Interacción de PI3-cinasa con otras moléculas de señalización	19
1.2.5.1 Tirosina cinasas	19
1.2.5.2 Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina.....	19
1.2.5.3 Serina/Treonina cinasas	20
1.3 LIGANDOS DE LA FAMILIA B7	22
1.4 RECEPTORES DE LA FAMILIA CD28.....	23
1.4.1 CD28 y CTLA-4.....	23
1.4.2 ICOS.....	26
1.4.2.1 Expresión y estructura de ICOS	26
1.4.2.2 Señalización a través de ICOS.....	28
1.4.2.3 Efecto de ICOS en la respuesta de las células T “in vitro”	28
1.4.2.4 Efecto de ICOS en la respuesta de las células T “in vivo”	29

1.5	PAPEL DEL CITOESQUELETO EN LA ACTIVACIÓN DE LA CELULA T	30
1.5.1	Microdominios de membrana	31
1.5.2	La familia de Rho-GTPasas como reguladores del citoesqueleto.....	32
2	OBJETIVOS	36
3	MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1	MATERIALES.....	38
3.1.1	Animales de laboratorio.....	38
3.1.2	Líneas celulares.....	38
3.1.3	Estirpes bacterianas.....	39
3.1.4	Anticuerpos policlonales.....	39
3.1.5	Otros anticuerpos.....	41
3.1.6	Medios de cultivo	41
3.1.7	Vectores	42
3.1.8	ARN de Interferencia o silenciamiento (siARN).....	43
3.1.9	Péptidos.....	43
3.1.10	Tampones.....	43
3.1.11	Otros reactivos y productos.....	45
3.2	MÉTODOS	45
3.2.1	Aislamiento de linfocitos T CD4 ⁺ de ratón.....	45
3.2.2	Aislamiento de linfocitos T CD4 ⁺ Naive de ratón.....	46
3.2.3	Obtención de blastos a partir de linfocitos T CD4 ⁺	46
3.2.4	Activación celular por anticuerpos adsorbidos a esferas de poliestireno	47
3.2.5	Activación celular por anticuerpos adsorbidos a placas de cultivo.....	47
3.2.6	Medida de proliferación celular.....	47
3.2.7	Silenciamiento con siARN	48
3.2.8	Transfección de COS-7 con fosfato cálcico	48
3.2.9	Adhesión, elongación celular y tinción de F-Actina	49
3.2.10	Tinción de vinculina.....	49
3.2.11	Detección de balsas lipídicas por fluorescencia	50
3.2.12	Muerte celular	51
3.2.13	Lisis celular	51

3.2.14	Ensayo de interacción y precipitación (“pull-down”)	51
3.2.15	Electroforesis bidimensional	52
3.2.16	Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas	53
3.2.17	Aislamiento de balsas lipídicas	53
3.2.18	Inmunoprecipitación	53
3.2.19	Electroforesis SDS-PAGE e “inmunoblot”	54
3.2.20	Tinción de plata	55
3.2.21	Obtención y purificación de anticuerpos	55
3.2.22	Cuantificación de interleucinas mediante ELISA de captura	55
3.2.23	qRT-PCR	56
3.2.24	Clonación de las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ de PI3-cinasa	58
4	RESULTADOS	61
4.1	SEÑALES MEDIADAS POR ICOS: PROTEÍNAS ASOCIADAS AL DOMINIO CITOPLASMÁTICO DE ICOS	61
4.1.1	Identificación de moléculas asociadas a motivos YMxM: Unión de PI3-cinasa de clase IA al péptido de ICOS pYMFm	61
4.1.2	Abundancia relativa de las subunidades de PI3-cinasa de clase IA en inmunoprecipitados de ICOS	66
4.1.3	La unión diferencial de las subunidades catalíticas de PI3-cinasa a ICOS refleja las diferencias en la unión de estas subunidades a la subunidad reguladora	68
4.2	IMPORTANCIA DE LAS SUBUNIDADES CATALÍTICAS DE PI3-CINASA DE CLASE IA EN LA ESTIMULACIÓN Y COESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS T	74
4.2.1	Efecto del silenciamiento (siARN) de las subunidades catalíticas de PI3-cinasa de clase IA en la estimulación y la coestimulación por ICOS	74
4.2.2	Papel de la subunidad catalítica p110 α en la coestimulación por ICOS	79
4.2.2.1	Efecto diferencial de inhibidores de p110 α en la producción de IFN- γ y la fosforilación de Akt	81
4.2.3	Papel de la subunidad catalítica p110 α en la coestimulación por CD28 y en la viabilidad celular	84
4.2.4	Importancia de la subunidad catalítica p110 α de PI3-cinasa en la supervivencia de linfocitos T	87
4.2.4.1	La muerte celular inducida por el inhibidor de p110 α es dependiente de caspasas en linfocitos T CD4 ⁺	91

4.3	CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LINFOCITOS T INDUCIDOS POR ICOS	93
4.3.1	Elongación celular inducida por ICOS	94
4.3.2	Gránulos de Actina inducidos por ICOS.....	100
4.3.3	Disociación de la polimerización de actina y acumulación de “balsas” lipídicas por ligandos de ICOS	103
5	DISCUSIÓN	108
5.1	UNIÓN DE LAS SUBUNIDADES DE PI3-CINASA DE CLASE IA A ICOS	108
5.2	PAPEL DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA p110 α EN LA ACTIVACIÓN DEL TCR Y LA COESTIMULACIÓN.....	110
5.3	CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LINFOCITOS T INDUCIDOS POR ICOS	114
5.4	DISOCIACIÓN DE LA POLIMERIZACIÓN DE ACTINA Y LA ACUMULACIÓN DE “BALSAS” LIPÍDICAS POR LIGANDOS DE ICOS	119
5.5	PAPEL DE PI3-CINASA EN LA SUPERVIVENCIA DE LINFOCITOS T.....	119
6	CONCLUSIONES.....	123
7	BIBLIOGRAFÍA.....	126
ANEXOS	140

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases de la respuesta de células T CD4 ⁺	10
Figura 2. Procesos de señalización celular inducida por la activación de la célula T.	12
Figura 3. Estructura esquemática del heterodímero p85/p110 de clase IA de PI3-cinasa.	14
Figura 4. Clasificación y estructura de PI3-cinasa.....	15
Figura 5. Mecanismos de activación y reclutamiento de PI3-cinasa en linfocitos T.....	17
Figura 6. Representación de los dominios citoplasmáticos de CD28, ICOS y CTLA-4.....	25
Figura 7. Alineación de la secuencia de ICOS y CD28.	27
Figura 8. Mecanismo de regulación de los filamentos de actina por las Rho GTPasa.	34
Figura 9. Separación de proteínas asociadas a péptidos de ICOS y CD28 por ensayos de “pull down”.....	62
Figura 10. Abundancia de las subunidades de PI3-cinasa de clase IA en diferentes tipos de células T CD4 ⁺ de ratón.	63
Figura 11. Abundancia relativa de las subunidades de PI3-cinasa de clase IA en ensayos de “pull-down” con péptidos de ICOS.....	64
Figura 12. Comparación de las subunidades de PI3-cinasa de clase IA asociadas a péptidos fosforilados (ICOS pTir, sICOS pTir) o no fosforilados (ICOS) y a un péptido de CD28 fosforilado (CD28 pTir) por ensayos de “pull-down”.....	66
Figura 13. Asociación de las subunidades de PI3-cinasa a inmunoprecipitados de ICOS expresado en la superficie celular antes y después de la inducción de la fosforilación de proteínas intracelulares con pervanadato.	67
Figura 14. Abundancia de las subunidades catalíticas de PI3-cinasa de clase IA en inmunoprecipitados de la subunidad reguladora alfa comparado con la abundancia en linfocitos T.....	69
Figura 15. La depleción eficiente de la subunidad reguladora de PI3-cinasa elimina la subunidad catalítica p110 α , pero no p110 δ en células SR.D10.....	70

Figura 16. Abundancia de las subunidades catalíticas de PI3-cinasa de clase IA exógena en inmunoprecipitados de la subunidad reguladora alfa.	72
Figura 17. Abundancia de las subunidades catalíticas de PI3-cinasa de clase IA exógena en inmunoprecipitados del epítipo V5 presente en el vector de clonación.	73
Figura 18. Efecto del silenciamiento de la subunidad catalítica p110 α de PI3-cinasa en la coestimulación por ICOS.	75
Figura 19. Asociación de las subunidades de PI3-cinasa a inmunoprecipitados de ICOS expresado en la superficie de células tratadas con siARN para la subunidad catalítica p110 α	76
Figura 20. Efecto del silenciamiento de la subunidad catalítica p110 δ de PI3-cinasa en la coestimulación por ICOS.	77
Figura 21. Efecto del silenciamiento de ambas subunidades catalíticas p110 α y p110 δ de PI3-cinasa en la coestimulación por ICOS.	78
Figura 22. Efecto de inhibidores farmacológicos en la secreción de IL-4 o IL-10 inducida por la coestimulación con ICOS en SR.D10 y blastos de linfocitos T CD4 ⁺	79
Figura 23. Efecto de inhibidores farmacológicos en las señales tempranas de Akt y Erk inducidas por la coestimulación con ICOS en células SR.D10.	81
Figura 24. Efecto de la inhibición de las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ en la secreción de IL-2, IL-4, IL-10 o IFN- γ inducida por la coestimulación con ICOS en blastos de linfocitos T CD4 ⁺	82
Figura 25. Efecto de la inhibición de PI3-cinasa en las señales tempranas de Akt y Erk inducidas por la coestimulación con ICOS en blastos de linfocitos T CD4 ⁺	83
Figura 26. Efecto de la inhibición de la subunidad p110 α en la coestimulación por CD28 y en la viabilidad celular.	85
Figura 27. Apoptosis de linfocitos T CD4 ⁺ inducida por inhibidores de PI3-cinasa.	86
Figura 28. Efecto de la inhibición de la subunidad p110 α en la proliferación celular y en la producción de IFN- γ	87
Figura 29. Papel del silenciamiento de las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ de PI3-cinasa en la supervivencia de linfocitos T.	88
Figura 30. La supervivencia de células SR.D10 activadas con IL-2 es dependiente de p110 α , Akt y NF κ B.	89

Figura 31. La supervivencia de células SR.D10 sin activar es dependiente de p110 α , Akt y NF κ B.	90
Figura 32. Efecto de la inhibición de la subunidad p110 α en la apoptosis y la viabilidad de linfocitos T CD4 ⁺ y células SR.D10.....	91
Figura 33. La apoptosis inducida por el inhibidor de NF κ B y de Akt en linfocitos T CD4 ⁺ es dependiente de caspasas.....	92
Figura 34. La muerte celular inducida por el inhibidor de p110 α en células SR.D10 no es un proceso autofágico.....	93
Figura 35. Elongación y cambios en el citoesqueleto de actina en células SR.D10.	94
Figura 36. Papel de PI3-cinasa, Lck y Akt en la elongación celular inducida por ICOS.....	95
Figura 37. Papel de Vav-1 en la elongación celular inducida por ICOS.	96
Figura 38. Papel de las Rho GTPasas en la elongación celular inducida por ICOS.....	97
Figura 39. Papel de ROCK en la elongación celular inducida por ICOS.	98
Figura 40. Papel de MLCK en la elongación celular inducida por ICOS.	99
Figura 41. Papel de calmodulina en la elongación celular inducida por ICOS.	99
Figura 42. Papel de la GTPasa dinamina en la elongación celular inducida por ICOS.....	100
Figura 43. Gránulos de actina inducidos por ICOS.	101
Figura 44. Distribución de vinculina y actina en células incubadas con ligandos de ICOS.	102
Figura 45. Efecto de la ligación de ICOS y de otras moléculas en la polimerización de actina y la acumulación de “balsas” lipídicas.	104
Figura 46. ICOS no está presente en las balsas lipídicas de lisados celulares.	105
Figura 47. La ligación de CD3 más ICOS induce acumulación de balsas lipídicas en el sitio de contacto celular.....	106
Figura 48. Representación esquemática de la potencial vía de señalización involucrada en los cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por la coestimulación con ICOS en linfocitos T.	118

ABREVIATURAS

- AP-1: Activador de proteína 1.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- BAD: Inductor de muerte celular asociado a Bcl-2.
- BCL-X_L: Oncogén de leucemia de células B.
- BTLA-4: Atenuador de linfocitos B y T.
- CD: Cúmulo de diferenciación.
- Cdc42: Proteína del ciclo células 42, proteína G.
- CPA: Célula presentadora de antígeno.
- CREB: Elemento de respuesta al cAMP.
- CTLA-4: Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico.
- DAG: Diacilglicerol.
- DH: Homología a Dbl.
- ERK: Kinasa reguladora por señales extracelulares.
- FAK: Kinasa de adhesión focal.
- GADs: Proteína adaptadora relacionada con Grb2.
- GAPs: Proteínas activadoras de GTPasas.
- GDP: Guanosina difosfato.
- GEFs: Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina.
- GM-CSF: Factor estimulador de colonia de granulocitos y macrófagos.
- GPCRs: Receptores asociados a proteínas G.
- GRB-2: Proteína de unión a receptores de crecimiento 2.
- GSK3: Glucógeno sintasa cinasa 3.
- GST: Enzima glutatión-S-transferasa.
- GTP: Guanosina trifosfato.
- HLA: Antígeno leucocitario humano.
- ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1.
- ICOS: Coestimulador inducible.
- ICOS-L: Ligando de ICOS.
- IFN- γ : Interferón gamma.
- I κ B: Inhibidor de NF- κ B.
- IKK: Kinasas de I κ B.
- IL: Interleucina
- IL-2R: Receptor de IL-2.
- ITAM: Motivos de activación del inmunoreceptor basados en tirosina.

JNK: Cinasa del NH₂-terminal de c-Jun.
kDa: Kilo Dalton.
LAT: Conector para la activación de las células T.
LcK: Proteína tirosina cinasa específica de leucocitos.
MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos.
MDM2: Murino doble minutos clon 2.
MEK: Cinasa de las proteínas cinasa activadas por mitógenos.
MHC: Complejo principal de Histocompatibilidad.
MLC: Miosina de cadena ligera.
MLCK: Cinasa de la cadena ligera de la miosina.
mTOR: Diana de la rapamicina en mamíferos.
NF-AT: Factor nuclear de células t activadas.
NF-κB: Factor nuclear estimulador de la cadena ligera de células B activadas.
NK: Células agresoras naturales.
P70S6: Cinasa de S6 de 70 kDa.
PAK: Proteína cinasa activada por p21.
PD-1: Muerte celular programada 1.
PDK: Proteína cinasa dependiente de fosfoinosítidos.
PH: Homología a Pleckstrina.
PKA: Proteína cinasa A.
PKB: Proteína cinasa B.
PKC: Proteína cinasa C.
PLC-γ: Fosfolipasa C gamma.
PTEN: Fosfatasa homóloga de tensina.
PTK: Proteína tirosina cinasa.
PX: Homología phox.
Pyk2: Tirosina cinasa rica en prolina.
Raf: Factor activado por ras.
ROCK: Cinasa asociada a Rho.
SH₂: Dominio de homología Src de tipo 2.
SH₃: Dominio de homología Src de tipo 3.
SHIP: Fosfatasa de inositol que contiene dominio SH₂.
SI: Sinapsis inmunológica.
siARN: Acido ribonucleico interferente pequeño.
SLP-76: Fosfoproteína específica de leucocitos que contiene dominio SH₂.
SMAC: Complejo supramolecular de activación.
Sos: Proteína cuyo nombre deriva de "Hijo de sevenless".
TCR: Receptor de células T.
TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta.
Th: Célula T cooperadora.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TRIM: Proteínas de motivo Tripartito.

VCAM: Molécula de adhesión de las células vasculares.

WASP: Proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich.

ZAP-70: Proteína de 70 kDa asociada a ζ .

RESUMEN

ICOS es una molécula coestimuladora expresada en linfocitos T activados; comparte con CD28 un motivo citoplasmico (YxxM), importante en la señalización celular por ser potencialmente capaz de asociar las subunidades reguladoras de PI3-cinasa. Puesto que hay una diversidad de subunidades catalíticas en las PI3-cinasas de clase IA (α , β , δ), con importantes diferencias en su expresión y –posiblemente- en sus funciones, hemos analizado la asociación de las distintas subunidades de PI3-cinasa a ICOS.

En este trabajo se analizaron por ensayos de “pull-down” aquellas proteínas de lisado de células SR.D10, linfocitos T CD4⁺ y linfoblastos capaces de unirse a péptidos de ICOS fosforilados en el residuo de tirosina (ICOSpTir) y a inmunoprecipitados de ICOS.

Los péptidos ICOSpTir asocian las subunidades reguladoras de PI3-cinasa (p85 α , p85 β , p50-55 α) y las subunidades catalíticas (p110 α , p110 β y p110 δ). Por ensayos de “inmunoblot” se encontró una asociación preferencial de la subunidad catalítica p110 α a péptidos ICOSpTir pero también a inmunoprecipitados de ICOS. Además, al inmunoprecipitar PI3-cinasa con anticuerpos frente a la subunidad reguladora se observó una unión preferencial de la subunidad p110 α a la subunidad reguladora, explicando la asociación preferencial de esta subunidad a ICOS.

Como se ha postulado una importancia funcional preferente de la subunidad catalítica p110 δ en la activación de linfocitos T, se han analizado las funciones de ambas subunidades p110 α y p110 δ en la coestimulación por ICOS.

Al estudiar la fosforilación de Akt y la producción de citocinas inducida por anti-CD3 y anti-ICOS en diferentes tipos celulares observamos una diferente sensibilidad de los residuos Ser473 y Tre308 de Akt al utilizar inhibidores dirigidos a diferentes subunidades catalíticas p110, confirmando la importancia de estas subunidades en la activación de Akt. Así, en células SR.D10 la activación temprana de Akt (Ser473), fue bloqueada parcialmente al inhibir las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ de PI3-cinasa con siARN o con inhibidores farmacológicos; en blastos de linfocitos T CD4⁺, la fosforilación en la Treonina 308 de Akt fue inhibida eficientemente por inhibidores de p110 α (A66), p110 δ (IC87114), o de todas las isoformas (LY294002), mientras que la fosforilación en la Serina 473 fue inhibida parcialmente por el inhibidor de p110 α (A66), y totalmente por el de p110 δ , o por LY294002. Estos resultados confirman la importancia de estas subunidades en la activación de Akt. En cuanto a la secreción de citocinas encontramos que la producción de IL-4 e IL-10 es dependiente de la vía PI3-cinasa/Akt en células SR.D10, ya que el inhibidor general de PI3-cinasa (LY294002) y de las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ inhiben la secreción de estas citocinas. En blastos no se observó un efecto significativo sobre la producción de IL-4 o IL-10, pero sí sobre la producción de IFN- γ con concentraciones más bajas de los dos inhibidores de p110 α .

La asociación preferente de las subunidades catalíticas p110 α a las subunidades reguladoras de PI3-kinasa no es específica de la región citoplasmática de ICOS, también pudimos observarla asociada a un péptido de CD28 fosforilado en su motivo YxxM. Al analizar el papel de p110 α en la coestimulación por CD28 encontramos que, a concentraciones de 1-0,1 μ M, el inhibidor de p110 α (PIK-75) inhibía completamente la proliferación a tres días y la producción de citocinas como IL-2 o IFN- γ . Sin embargo, observamos que esta inhibición estaba acompañada por una fuerte pérdida de viabilidad en las células a partir de las 24 horas de cultivo. El uso de inhibidores y el silenciamiento de la subunidad catalítica p110 α confirmaron la importancia de esta subunidad en la supervivencia de linfocitos T. Además, la muerte celular inducida por PIK-75 es dependiente de caspasas en linfocitos T CD4⁺ pero no en la línea celular SR.D10.

También demostramos que la ligación de ICOS induce elongación celular y gránulos densos o puntos de actina polimerizada que se encuentran muy cerca de la superficie de contacto célula-cristal; estos cambios morfológicos son dependientes de PI3-kinasa, en especial de la subunidad catalítica p110 α . Los cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por ICOS son dependientes de Vav, de las GTPasas Rac-1 y Cdc42, y de la kinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), pero independientes de la vía de Akt o de ROCK. ICOS incrementa el agrupamiento de balsas lipídicas inducida por anticuerpo anti-CD3 en el sitio de contacto con el estímulo. Sin embargo, ICOS, es indetectable en las balsas de membrana, incluso empleando ligandos (CD3 o ICOS) capaces de inducir cambios claros en el citoesqueleto de actina.

En conjunto, en este trabajo resaltamos la importancia de PI3-kinasa de clase IA en la coestimulación de ICOS; no solo confirmamos la importante función de la subunidad catalítica p110 δ , sino que también atribuimos un papel dominante a la subunidad catalítica p110 α , que la convierte en una nueva diana potencial en la terapéutica inmunomoduladora. La investigación adicional de los modelos de ratón seguirá aportando pistas sobre los posibles beneficios y retos de una terapia dirigida a p110 α de PI3-kinasa.

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T

La defensa contra patógenos implica la actuación coordinada de un conjunto de elementos defensivos –moleculares y celulares- de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa que, una vez eliminado el patógeno, se desactivan para no perjudicar al huésped. Entre los elementos defensivos propios de la inmunidad adaptativa destacan los linfocitos T. Éstos, una vez activados, contribuyen de un modo antígeno-específico al desarrollo y control de las respuestas inmunes mediante la secreción de moléculas efectoras (citocinas) y mecanismos de citotoxicidad.

El proceso de activación de los linfocitos T se produce tras una compleja sucesión de interacciones celulares. Se inicia cuando el receptor de los linfocitos T (TCR) reconoce moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) junto al péptido que éstas transportan en la superficie de células presentadoras de antígeno (Antigen-presenting cells, APC). La unión entre el TCR y el péptido junto con la molécula de MHC es específica y reforzada por la unión, de las moléculas de MHC de Clase II y I a los receptores CD4 y CD8, respectivamente, fortaleciendo las interacciones entre el TCR/MHC y el péptido (Davis *et al.* 1988, König 2002).

El proceso de reconocimiento varía si el receptor para antígeno de células T (T-cell receptor, TCR) está formado por un heterodímero α/β o si es del tipo γ/δ . Sin embargo, para que la activación se inicie adecuadamente, se requieren las moléculas CD3 que forman un complejo plurimolecular con el TCR (complejo TCR/CD3) y que transmiten las señales recibidas del TCR hasta el interior celular (Alarcon *et al.* 2003, Rojo *et al.* 2008a). Además se requiere la participación de diferentes moléculas presentes en la membrana de los linfocitos, incluyendo CD4, CD8 y CD28, que facilitan la unión intercelular y potencian la transmisión de señales al interior celular. Por último, diversas moléculas de adhesión fortalecen la unión entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno (McAdam *et al.* 1998, Montoya *et al.* 2002, Rudd 1996).

En ausencia de señales coestimuladoras, la señal mediada por el TCR puede conducir al linfocito a la muerte celular o a un estado de anergia, en la que el linfocito no responde a nuevas estimulaciones. Después de la ocupación de los receptores T por el antígeno, se produce la activación de los linfocitos y la iniciación de eventos tempranos de transducción de señales que finalmente conducen a la reprogramación génica y a la adquisición de funciones efectoras.

Una vez activados los linfocitos T, estos producen citocinas o factores citotóxicos, según se trate de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺. De esta manera se desarrolla la respuesta inmune. Los linfocitos T CD4⁺ colaboran en la posterior activación de otras células como NK, T CD8⁺,

linfocitos B o macrófagos. A su vez los linfocitos T $CD8^+$ tras su activación ejercen su función citotóxica destruyendo células blanco (Figura 1).

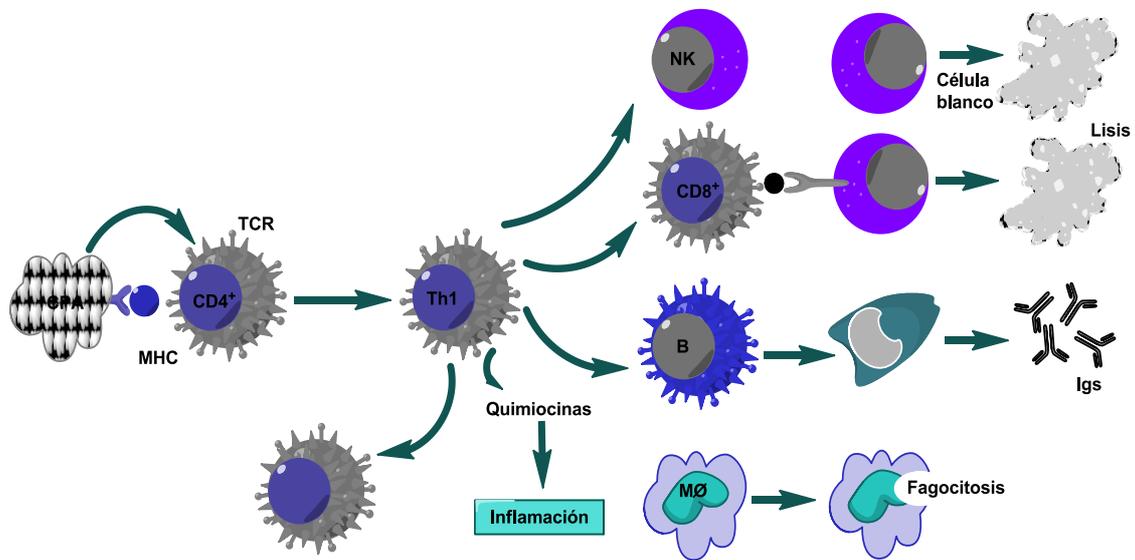


Figura 1. Fases de la respuesta de células T $CD4^+$.

El reconocimiento del antígeno por una célula T ($CD4^+$) induce la secreción de citocinas (IL-2), la expansión clonal y la diferenciación de las células T en células T efectoras o en células de memoria. En la fase efectora, las células efectoras responden al antígeno produciendo citocinas que permiten la activación de macrófagos, de linfocitos B y de células T $CD8^+$ y la inducción de la inflamación. (Abbas *et al.* 1999).

1.1.1 Estímulos mediados por el receptor de células T

Cuando el linfocito T ha sido estimulado a través del complejo TCR/CD3 se produce una rápida activación de proteínas con actividad tirosina cinasa y tirosina fosfatasa (Acuto & Cantrell 2000, June *et al.* 1990a), incrementando la fosforilación en tirosina de las cadenas no polimórficas del CD3. La molécula CD45 a través de su actividad fosfatasa activa por defosforilación a las dos proteínas cinasas de la familia Src (Lck y Fyn) (Cahir McFarland *et al.* 1993, Hegedus *et al.* 1999, Mustelin & Tasken 2003).

La asociación física y funcional del CD4 y del CD8 con el TCR/CD3, hace que la cinasa Lck asociada a estas moléculas se aproxime a la porción citoplasmática de las proteínas del complejo CD3. Fyn, al igual que Lck es otra tirosina cinasa que pertenece a la familia de cinasas Src. Esta cinasa está físicamente asociada al TCR y su actividad está regulada por la ocupación y activación del mismo. Las cadenas del CD3 poseen en sus dominios intracitoplasmáticos motivos de secuencia similares denominados ITAM que se fosforilan por acción de las tirosina cinasas Lck y Fyn (Palacios & Weiss 2004, van Oers *et al.* 1996). Una vez que los ITAM son fosforilados en residuos de tirosinas, se convierten en sitios específicos de

acoplamiento que se unen a proteínas citoplasmáticas con dominios SH₂. La proteína con actividad tirosina cinasa de la familia Syk denominada ZAP-70 se activa cuando a través de sus dominios SH₂ se une a las cadenas que han sido previamente fosforiladas por Fyn o Lck (Chu *et al.* 1998, Mustelin & Tasken 2003).

ZAP-70 acopla señales desde la superficie celular hasta el núcleo por fosforilación de los adaptadores LAT y SLP-76 (Qian *et al.* 1996, Yamasaki & Saito 2005). LAT es una proteína transmembrana cuya función, una vez fosforilada, es organizar complejos multimoleculares en determinados subdominios lipídicos de la membrana plasmática. Estos complejos contienen proteínas claves para la señalización al interior celular como lo es PLC- γ -1 (Acuto & Cantrell 2000, Finco *et al.* 1998). PLC- γ -1 se fosforila en tirosina y se activa dentro de los complejos de la membrana plasmática donde induce la hidrólisis de fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), en metabolitos como inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). De este modo se regula el aumento del calcio intracelular y se activa la proteína cinasa C (PKC) y posiblemente algunas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs).

El aumento de la concentración de calcio intracelular es importante durante las fases iniciales del proceso de activación de la célula T, ya que actúa como segundo mensajero, activando a múltiples cinasas y fosfatasa que dependen de calcio, como la calcineurina (Crabtree & Clipstone 1994, Smith-Garvin *et al.* 2009). Dentro de las múltiples proteínas que son fosforiladas por la PKC o por proteínas dependientes de calcio se encuentran algunos factores de transcripción nucleares como NF-AT (Macian *et al.* 2001, Northrop *et al.* 1994), NF- κ B, o AP-1 (Baier-Bitterlich *et al.* 1996). Estos factores nucleares se unen al promotor de distintos genes, haciéndolos más atractivos a la ARN polimerasa. Como respuesta, se comienzan a transcribir en el núcleo un conjunto de genes que permitirán al linfocito T desarrollar sus funciones efectoras, incluyendo de modo destacado la producción de citocinas (Figura 2).

Las tirosinas cinasas activadas por el TCR también activan vías de señalización a través de Ras y mediadas por LAT (Izquierdo Pastor *et al.* 1995, Wange 2000). Este adaptador fosforilado por ZAP-70 se une a otro adaptador intermediario (Grb-2) que contiene dominios SH₂ y SH₃. Grb-2 se une a proteínas específicas fosforiladas en tirosina a través de su dominio SH₂ y a la proteína de intercambio de nucleótidos de guanina (Sos) mediante su dominio SH₃. La proteína de intercambio actúa sobre la forma inactiva de Ras (Ras-GDP) convirtiéndola en su forma activa (Ras-GTP), de esta manera puede unirse y retener a c-Raf cerca de la membrana plasmática (Downward 1996). Esta acción mediada por Ras, hace que Raf se active y actúe como una cinasa de MAPK (MAPKK) que a su vez activa y fosforila una o más MAPKs, incluyendo a ERK-1 y ERK-2; una vez que las ERKs son activadas, migran al núcleo donde regulan la transcripción de c-fos, que forma dímeros con c-jun para formar el complejo AP-1, que es fosforilado por las JNK en la subunidad c-jun, regulando su actividad transcripcional (Genot *et al.* 1996).

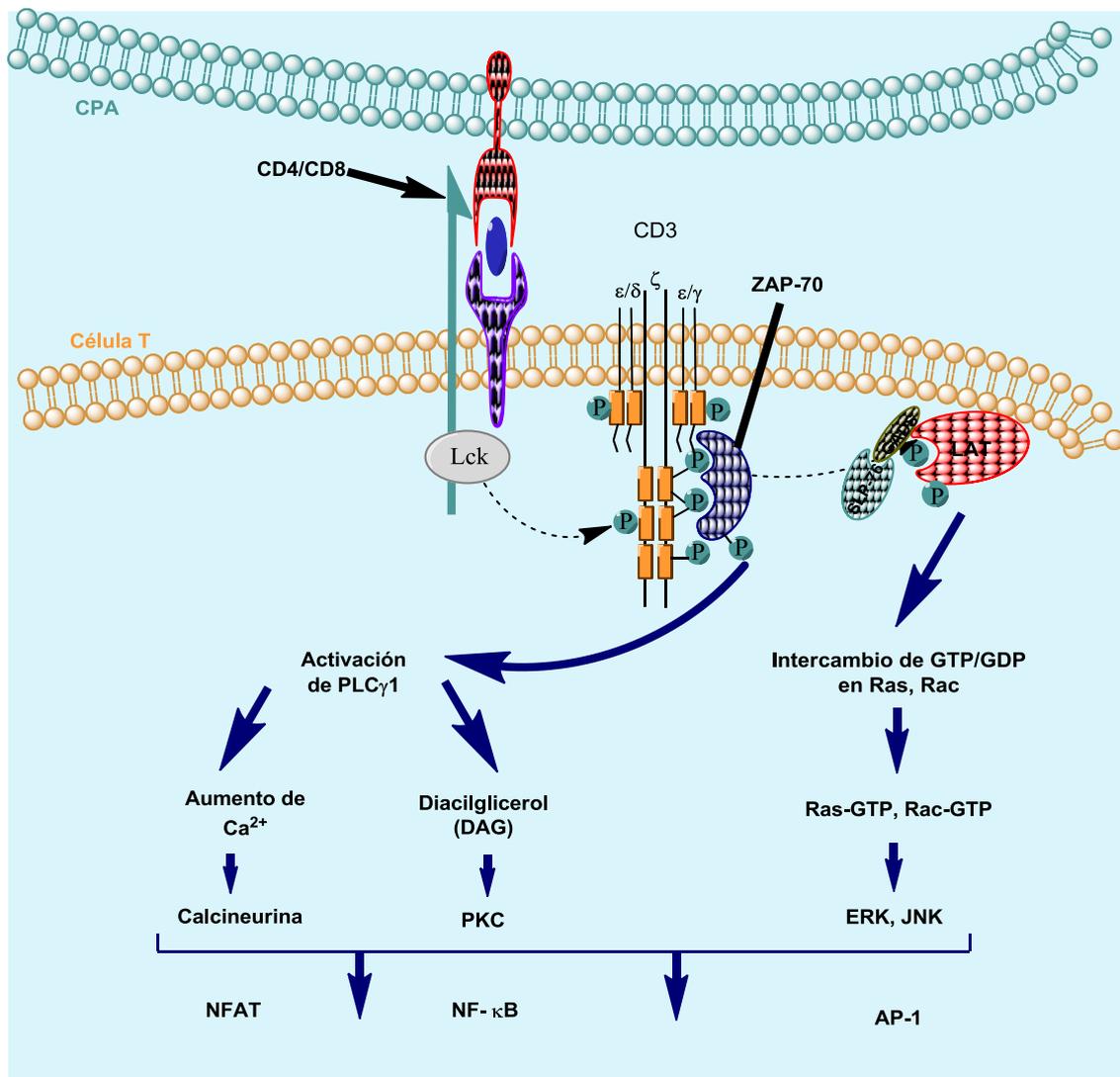


Figura 2. Procesos de señalización celular inducida por la activación de la célula T.

La unión del receptor de la célula T (TCR) a los correceptores del complejo MHC en las células presentadoras de antígeno (CPA) inicia los procesos de señalización que conducen a la fosforilación de las cadenas CD3ε, γ, δ y ζ, del complejo TCR/CD3, a la unión y activación de ZAP-70, a la fosforilación de proteínas adaptadoras y a la activación de enzimas celulares que se encargaran de activar factores de transcripción que estimulan la expresión de genes importantes en la respuesta de la célula T.

Existen otras enzimas que participan en el metabolismo de fosfolípidos, las fosfatidilinositol-3 cinasas, las cuales catalizan la fosforilación de los fosfatidilinositoles, principalmente del P(4,5)P₂ (PIP₂), para dar como producto el PI(3,4,5)P₃ (PIP₃) que es el segundo mensajero de esta ruta (Ward *et al.* 1996). Los productos de PI3-cinasa, en especial PI(3,4,5)P₃, se unen a dominios de homología a pleckstrina (PH), que se encuentran en una gran variedad de moléculas implicadas en diferentes vías de señalización, modificando así su actividad o su localización subcelular (Rameh *et al.* 1997). Una de las dianas mejor caracterizadas de la

acción de estos lípidos fosforilados es la proteína cinasa B (PKB) también denominada Akt (Fayard *et al.* 2010, Reif *et al.* 1997). En las células T, Akt es capaz de fosforilar y activar a su vez una gran variedad de sustratos implicados en la supervivencia celular y la transcripción de diversos genes (BAD, CREB, factores de transcripción E2F, la cinasa I κ B y la procaspasa-9), explicando la importancia de esta cinasa en los procesos de proliferación y diferenciación celular (Alessi & Cohen 1998, Fayard *et al.* 2010).

1.2 PI3-CINASAS

Las PI3-cinasas (Fosfatidilinositol 3-cinasas) son una familia de proteínas que regulan múltiples funciones celulares, ya que son capaces de fosforilar el grupo hidroxilo de la posición 3' del anillo inositol de fosfatidilinositol. Las PI3-cinasas se definen en base a su estructura primaria, regulación y especificidad por el sustrato. Las diferentes isoformas de PI3-cinasa se clasifican en tres grupos: PI3-cinasa de clase I, PI3-cinasa de clase II y PI3-cinasa de clase III.

1.2.1 PI3-cinasas de clase I

Son heterodímeros formados por dos subunidades, una subunidad catalítica y una subunidad reguladora. Las PI3-cinasa son capaces de convertir "in vitro" PI en PI(3)P, PI(4)P en PI(3,4)P₂ y PI(4,5)P₂ en PI(3,4,5)P₃, mientras que "in vivo" su sustrato generalmente es PIP₂.

La activación de PI3-cinasa está regulada negativamente por fosfatasa SHIP y PTEN. La primera tiene actividad 5'fosfoinosítido fosfatasa convirtiendo PI(3,4,5)P₃ en PI(3,4)P₂ y la segunda hidroliza PI(3,4,5)P₃ en PI(4,5)P₂, inactivando así un segundo mensajero en la señalización celular y convirtiéndola en supresor tumoral (Torres & Pulido 2001).

Las PI3-cinasas de clase I se pueden subdividir en enzimas de clase IA y clase IB. Las PI3-cinasas de clase IA son activadas por receptores con actividad tirosina-cinasa asociada, incluyendo receptores de antígenos, moléculas coestimuladoras y receptores de citocinas. En mamíferos se encuentran tres isoformas de la subunidad catalítica (α , β , δ) con pesos moleculares de 110 kDa y codificadas por tres genes diferentes. Las subunidades catalíticas poseen 4 dominios de homología conservados: un dominio de unión a Ras (RBD), un dominio de unión a fosfolípidos de membrana (C2), un dominio implicado en la interacción proteína-proteína (PIK) y un dominio catalítico de cinasa (DC). Este dominio contiene residuos cargados negativamente los cuales son importantes para la actividad enzimática. Las subunidades catalíticas p110 α y p110 β se distribuyen ampliamente en tejidos de mamíferos, mientras que la subunidad catalítica p110 δ tiene una expresión más restringida, especialmente a leucocitos (Vanhaesebroeck *et al.* 1997).

La clase de PI3-cinasa IA también posee una subunidad reguladora con dos dominios SH₂ que permiten la unión a proteínas con fosfotirosina en motivos de secuencia de tipo YxxM. La unión

a fosfotirosina permite la translocación de PI3-cinasa a la membrana plasmática. Existen en mamíferos 5 isoformas de la subunidad reguladora, dos subunidades de 85 kDa (p85 α y p85 β), dos subunidades de 55 kDa (p55 α y p55 γ) y una subunidad de 50 kDa (p50 α) que surgen del procesamiento alternativo de tres genes (Fruman *et al.* 1996). Las isoformas de 85 kDa poseen un dominio SH₃, dos fragmentos ricos en prolina (PRDs) separados por un dominio homólogo BCR y dos dominios SH₂ separados por una secuencia iSH₂ (inter-SH₂); esta secuencia es el sitio de unión con la subunidad catalítica (Figura 3). p55 γ tiene una estructura idéntica a p55 α , y parecida a p50 α , con los dominios SH₂ como en la subunidades p85 pero sin los dominios SH₃ y BCR. Las subunidades p85 α y p85 β se expresan de forma ubicua, la expresión de p55 γ está restringida fundamentalmente al cerebro.

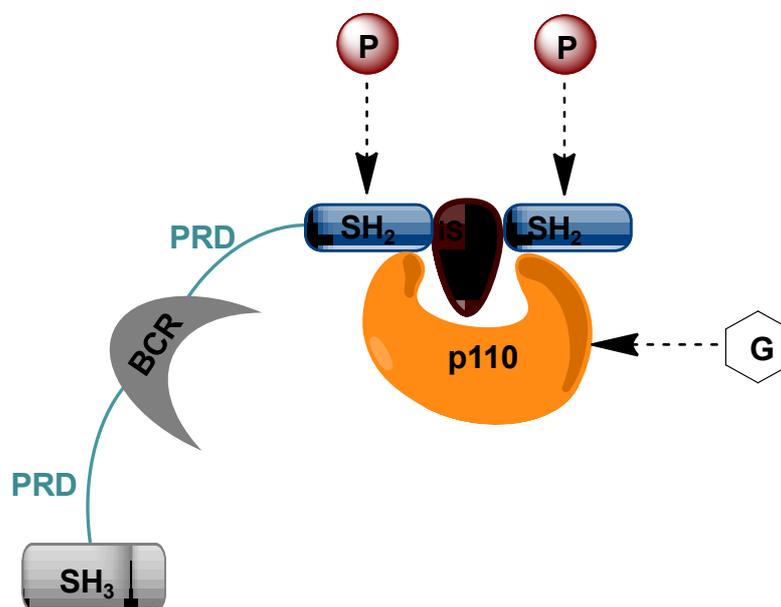


Figura 3. Estructura esquemática del heterodímero p85/p110 de clase IA de PI3-cinasa.

La subunidad p85 tiene un dominio SH₃ (N-terminal), dos dominios PRD y dos dominios SH₂, separados por la secuencia iSH₂, responsable de la unión a la subunidad catalítica p110. Las flechas indican los sitios de unión del heterodímero con los principales activadores de PI3-cinasa: proteínas fosfotirosina (P) y proteínas G (G).

Las PI3-cinasas de clase IB son activadas por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs); solo se ha identificado una subunidad catalítica (p110 γ) formando un complejo con la subunidad reguladora p101 o p84 (Figura 4). La subunidad catalítica p110 γ tiene los dominios RBD, C2, PIK, el dominio catalítico cinasa (DC) y dos dominios de unión a las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G (Leopoldt *et al.* 1998).

Se ha visto que p110 γ se asocia en la mayoría de los tejidos con p101 (Suire *et al.* 2006). En corazón, donde la expresión de p101 es muy baja, p110 γ se asocia con p84. Las subunidades

reguladoras poseen dos dominios, uno de unión a las subunidad catalítica (C) y otro de unión a las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G (G) tras la estimulación de GPCR (Figura 4).

Esta unión a proteínas G produce la translocación desde el citosol a la membrana celular y la estimulación de su actividad cinasa. Es probable que no estén relacionadas directamente con la señalización a través del TCR, aunque pueden promover la supervivencia de las células T por otros sistemas receptor/ligando (Sasaki *et al.* 2000). Por lo tanto, en los linfocitos T se espera que el receptor de células T, inicie señales activando principalmente a PI3-cinasa de clase IA, mientras que las quimiocinas activan a las PI3-cinasa de clase IB (Fruman 2007).

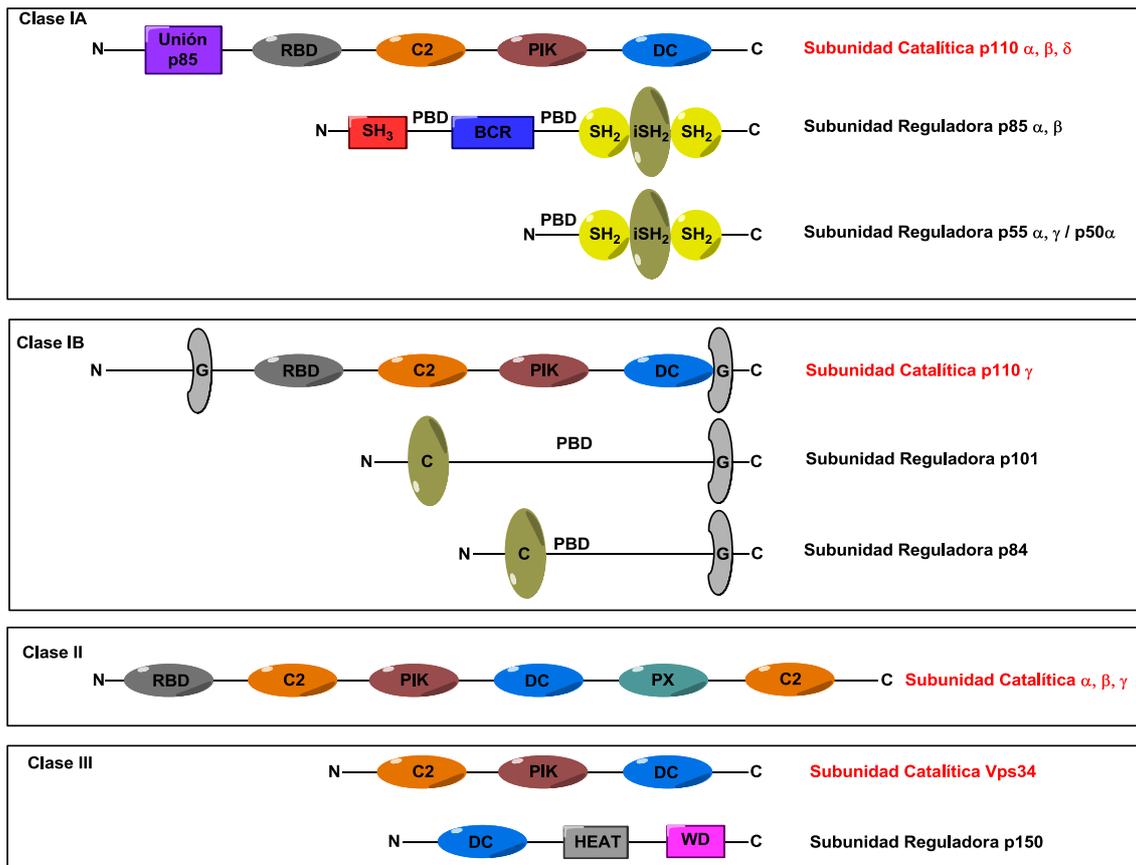


Figura 4. Clasificación y estructura de PI3-cinasa.

Las PI3-cinases se dividen en tres grupos (Clase I-III). Todas las subunidades catalíticas poseen un dominio C2, un dominio catalítico (DC) y un dominio implicado en la interacción proteína-proteína (PIK). Las PI3-cinases de clase I son heterodímeros formados por una subunidad catalítica p110 y una subunidad reguladora. Todas las isoformas de p85 tienen dos dominios SH₂, estos dominios no están presentes en las subunidades reguladoras p101 y p84. Las PI3-cinases de clase II carecen de subunidades reguladoras. Las PI3-cinases de clase II están formadas por una subunidad catalítica Vps34 unida a una subunidad reguladora p150.

1.2.2 PI3-cinasa de clase II y III

Las PI3-cinasa de clase II son moléculas muy grandes (170 kDa), que tienen un extremo C-terminal con un dominio C2 capaz de unirse a lípidos de manera independiente del Ca^{2+} (Arcaro *et al.* 1998), un dominio de homología Phox (PX), un dominio catalítico y un dominio PIK similares al dominio de PI3-cinasa de clase I y en el extremo N-terminal poseen un dominio de unión a Ras (Vanhaesebroeck *et al.* 2010). Son capaces de fosforilar “in vitro” a PI y PI(4)P. En mamíferos existen tres isoformas catalíticas de PI3-cinasa de clase II ($\text{C2}\alpha$, $\text{C2}\beta$ y $\text{C2}\gamma$) codificadas por genes diferentes. $\text{C2}\alpha$ y $\text{C2}\beta$ se expresan de forma ubicua y $\text{C2}\gamma$ se expresa preferencialmente en el hígado (Vanhaesebroeck *et al.* 2001). Esta clase de enzimas no posee subunidad reguladora (Figura 4).

Las PI3-cinasa de clase III son heterodímeros compuestos por una subunidad catalítica (Vps34) y una reguladora (p150 o Vps15) (Figura 4). La subunidad reguladora p150 posee un dominio catalítico (inactivo), dominios de interacción proteína-proteína (HEAT), repeticiones WD, las cuales permiten la interacción con RAB5-GTP (Murray *et al.* 2002). Esta clase de PI3-cinasa es capaz de fosforilar a PI(3)P y está involucrada en el tráfico de proteínas y en procesos como la fagocitosis (Okkenhaug & Vanhaesebroeck 2003).

1.2.3 Papel de PI3-cinasa en la activación de linfocitos T

Existen varios modos de activación de PI3-cinasa en linfocitos T (Figura 5). En el primer modelo, la activación de la molécula coestimuladora CD28 con sus ligandos B7-1 o B7-2 permiten la fosforilación en tirosina del motivo YxxM y la formación de una interacción de alta afinidad entre los dominios SH_2 de la subunidad reguladora p85 de PI3-cinasa y el residuo de tirosina fosforilado de CD28 (Ward & Cantrell 2001). En este proceso es reclutada la subunidad catalítica p110 de PI3-cinasa a la membrana plasmática, donde puede fosforilar PIP_2 generando $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$. En el segundo modelo, están implicadas diferentes proteínas adaptadoras capaces de reclutar a PI3-cinasa a la membrana plasmática en linfocitos T que han sido activados a través del TCR. Después de la activación de algunas proteínas tirosina cinasa (PTKs) como Lck, Fyn y ZAP-70, se fosforilan diversos sustratos incluyendo las proteínas TRIM y LAT, las cuales forman complejos con PI3-cinasa. TRIM interactúa directamente con PI3-cinasa a través de su motivo YxxM. LAT presenta 10 residuos de tirosina, algunos de ellos median la interacción con PI3-cinasa, es posible que p85 interactúe directamente con LAT o por medio de Grb-2 o Cbl (Bruyns *et al.* 1998, Zhang *et al.* 1998a). En el tercer modelo, basado en la señalización a través de citocinas, la cadena β del receptor de IL-2 (IL-2R) recluta PI3-cinasa mediante la fosforilación e interacción de los adaptadores SHP2 y Gab2. La fosforilación de Gab2 y SHP2 es dependiente de la Tirosina 338 de la cadena β del receptor IL-2R, además esta tirosina es importante en la unión al adaptador Shc para la formación del complejo Grb-Gab2 o Grb-2-SHPS (Gu *et al.* 2000). En el cuarto modelo de

señalización a través de quimiocinas, la subunidad catalítica p110 γ de PI3-cinasa es estimulada por las subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G acoplada a receptores de quimiocinas (7TM), además estos receptores pueden activar PTKs, facilitando la fosforilación de adaptadores intermediarios, de manera similar a los dos modelos siguientes (Sotsios & Ward 2000).

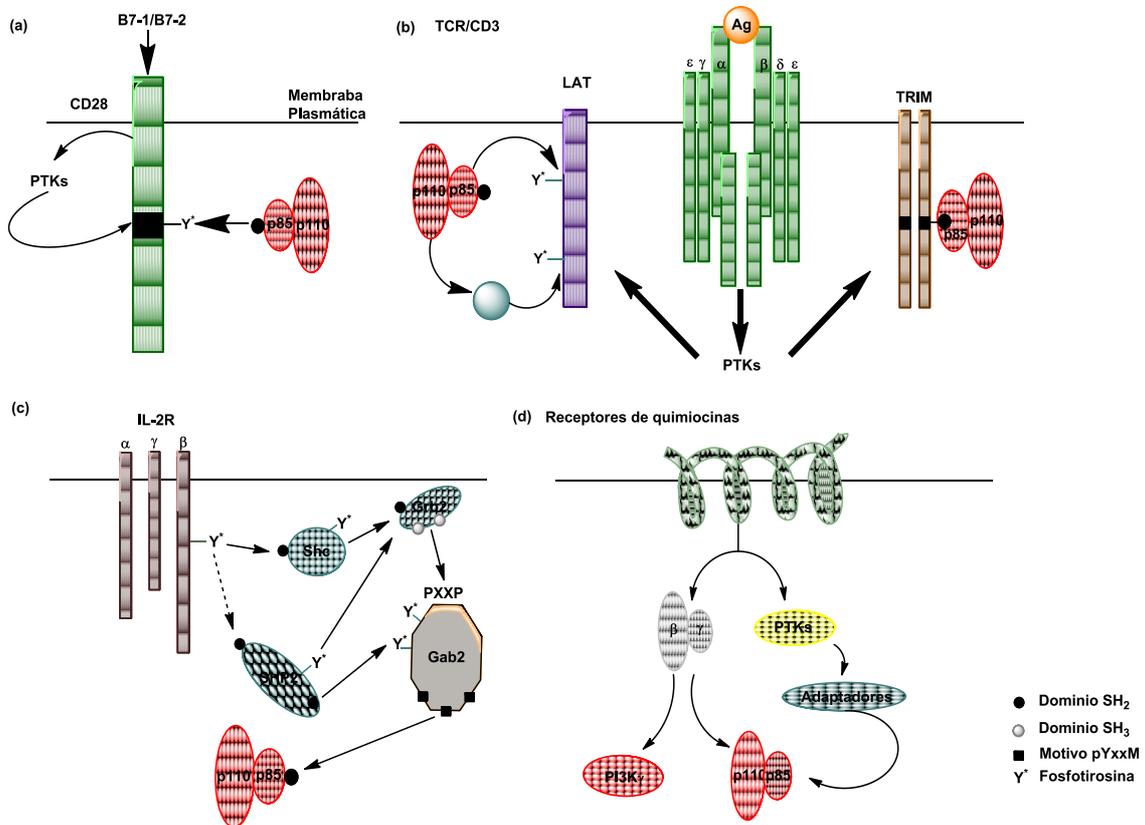


Figura 5. Mecanismos de activación y reclutamiento de PI3-cinasa en linfocitos T.

Existen cuatro modelos en los cuales los receptores de superficie de las células T pueden reclutar y activar a PI3-cinasa. **a)** Por activación de CD28. **b)** Por activación de PTKs a través del receptor de antígenos y de proteínas adaptadoras como TRIM y LAT. **c)** Por señalización a través de la cadena β del receptor de IL-2 (IL-2R). **d)** Por señalización a través de receptores de quimiocinas acoplados a proteínas G (7TM). (Figura obtenida de Ward & Cantrell. *Current Opinion in Immunology*, 2001).

Las isoformas de las subunidades catalíticas p110 están acopladas a diferentes activadores y efectores, y por lo tanto es posible que funcionen de manera diferente (Ward & Cantrell 2001).

El uso de inhibidores farmacológicos de PI3-cinasa, como wortmanina o LY294002 y el análisis de ratones deficientes en las subunidades catalíticas o reguladoras de PI3-cinasa, permiten demostrar la importancia de esta vía en muchos procesos como la progresión del ciclo celular, la motilidad celular y la adhesión celular.

La expresión de la subunidad catalítica p110 δ restringida a leucocitos, le confiere un papel importante en la señalización a través del receptor de células T. La pérdida de la función de

esta subunidad por medio de mutaciones (D910A) genera daños en las señales del TCR y en la fosforilación de AKT dependientes de CD28 (Okkenhaug *et al.* 2006).

Ratones deficientes en p110 γ muestran defectos en la respuesta de macrófagos y neutrófilos frente a las quimiocinas. Además células T de ratones p110 $\gamma^{-/-}$ presentan defectos en la producción de citocinas frente a la activación inducida por el TCR (Sasaki *et al.* 2000).

La capacidad de las quimiocinas para regular el citoesqueleto de actina y la movilidad celular requiere de la actividad de PI3-cinasa; una pérdida en esta respuesta podría perjudicar la capacidad de los linfocitos T para hacer contacto celular, afectando la supervivencia y la capacidad de las células para responder ante un estímulo.

Estudios de la función de PI3-cinasa de clase IA en células T sugieren que la inhibición de esta subclase puede tener un efecto en la autoinmunidad. El estudio inicial de ratones p110 δ^{D910A} que desarrollan una enfermedad inflamatoria intestinal, indica que las células T reguladoras están muy afectadas en este tipo de ratones (Patton *et al.* 2006). De esta manera la identificación de p110 δ como una proteína de señalización intracelular que regula la actividad de las células T reguladoras podría dilucidar el mecanismo molecular responsable de la supresión mediada por este tipo de células.

1.2.4 Papel de PI3-cinasa en la coestimulación

La molécula CD28 proporciona una señal coestimuladora esencial para la activación del linfocito T, aumentando la producción de IL-2, incrementando la proliferación, y evitando la muerte celular. CD28 puede activar a PI3-cinasa de manera independiente del TCR, ya que CD28 posee en la región citoplasmática el motivo YxxM (Y170), el cual proporciona el sitio de acoplamiento para los dominios SH₂ de la subunidad reguladora p85 de PI3-cinasa. La interacción de CD28 con su ligando también tiene un papel importante en la respuesta dependiente del TCR.

Algunos experimentos con ratones transgénicos que expresan un mutante de CD28 donde se ha sustituido la tirosina del motivo YxxM por una fenilalanina (Y170F) han demostrado que CD28 puede coestimular la proliferación de las células T y la producción de IL-2 independiente de su asociación con PI3-cinasa (Burr *et al.* 2001, Okkenhaug *et al.* 2001). Otro estudio encontró que la proliferación y la producción de IL-2 es menor en los ratones mutantes (Harada *et al.* 2001). Sin embargo, células T CD28 mutadas (Y170F) no tienen alterada la capacidad coestimuladora de CD28 "in vivo"; estas células muestran ayudan a las células B durante la respuesta inmune antiviral, previenen la inducción de anergia, y promueven la proliferación de células T y la secreción de IL-2 (Okkenhaug *et al.* 2001). En contraste con la producción de IL-2, estas células T CD28 (Y170F) perdieron la capacidad para promover la supervivencia a través de la inducción de la expresión de Bcl-X_L (Burr *et al.* 2001, Okkenhaug *et al.* 2001).

Es importante resaltar el papel que tiene Akt en la inducción de la expresión de Bcl-X_L después de la activación de PI3-cinasa en células T (Jones *et al.* 2000). La sobreexpresión de una forma

activa de Akt en células T CD4⁺ CD28^{-/-} devuelve a las células la capacidad para secretar IL-2 en respuesta a un péptido antigénico (Kane *et al.* 2001), pero células de T CD4⁺ CD28 (Y170F) disminuyen la fosforilación de Akt y producen niveles normales de IL-2. Aunque la capacidad que tiene CD28 para reclutar PI3-cinasa es importante para regular la producción de IL-2, es posible que CD28 pueda influir en la capacidad del TCR para unirse a PI3-cinasa y activar la vía Akt de manera independientemente de la tirosina 170.

Además del motivo YxxM de unión a PI3-cinasa presente en CD28, existen otras dos regiones ricas en prolina con las cuales puede unirse a dominios SH₃ (Kim *et al.* 1998). Aunque con estas regiones ricas en prolina CD28 no se puede unir directamente al dominio SH₃ de la subunidad reguladora p85, si puede interactuar con Lck y estimular su actividad cinasa (Holdorf *et al.* 2002) y de esta manera estimular la activación de PI3-cinasa a través del TCR (Acuto & Michel 2003). Es decir, tanto CD28 como el TCR contribuyen a la activación de PI3-cinasa.

1.2.5 Interacción de PI3-cinasa con otras moléculas de señalización

La función de los fosfolípidos como mensajeros consiste en permitir el anclaje de proteínas enzimáticas citosólicas a la membrana plasmática, facilitando la interacción con sus sustratos. Los productos de PI3-cinasa interactúan con diferentes moléculas de señalización como tirosina cinasas, GTPasas y Serina/treonina cinasas a través de dominios de homología pleckstrina (PH). Estos dominios son estructuralmente conservados, de aproximadamente 100 aminoácidos y se unen con alta afinidad a Fosfatidilinositoles. A continuación se encuentra una breve descripción de las interacciones entre estas moléculas.

1.2.5.1 Tirosina cinasas

La familia de tirosina cinasas TEC, que incluye Btk, Itk y Tec poseen en el extremo amino terminal un dominio PH de unión a PI(3,4,5)P₃ (Qiu & Kung 2000, Salim *et al.* 1996). El dominio PH de Btk media la translocación de esta cinasa a la membrana plasmática, donde estas cinasas son importantes para la fosforilación y activación de PLC- γ (Saito *et al.* 2003, Scharenberg *et al.* 1998) y la movilización de calcio.

Mientras, PI3-cinasa fosforila a PI(4,5)P₂, PLC- γ hidroliza a estos lípidos para producir IP₃ y DAG, y mediar la liberación del calcio intracelular y la activación de PKC (Ward & Cantrell 2001).

1.2.5.2 Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina

Las proteínas GEFs o factores intercambiadores de nucleótidos de guanina son proteínas importantes en la activación de las pequeñas GTPasas, ya que catalizan el intercambio de la forma unida a GDP (inactiva) a la forma unida a GTP (activa). Estas GTPasas están implicadas

en importantes vías de señalización que afectan a la diferenciación, crecimiento celular y la organización del citoesqueleto de actina.

El gran número existente de GTPasas requiere una multitud de GEFs para asegurar la especificidad en las rutas de señalización. Existen varias familias de dominios GEFs con secuencias y estructuras completamente distintas (Cherfils & Chardin 1999). Los GEFs que regulan a la familia Rho se caracterizan por presentar un dominio DH (homología Dbl) de 200 aminoácidos, que es necesario para la actividad intercambiadora de Rho. También poseen un dominio PH (homología Pleckstrina) adyacente al anterior, que está implicado en las interacciones proteína-proteína y proteína-fosfolípidos.

Las proteínas Rho pertenecen a la superfamilia de proteínas Ras, y comparten un 50-60% de identidad entre ellas y un 30% de identidad con Ras. Las GTPasas de la familia Rho más estudiadas son Rho, Rac y Cdc42. La principal función de estas proteínas es la regulación del ensamblaje del citoesqueleto de actina. De esta manera, ellas juegan un papel en una variedad de procesos celulares dependientes del citoesqueleto de actina, tales como: migración, citocinesis, secreción y morfogénesis, entre otros (Ridley 2001).

PI3-cinasa controla los cambios en el citoesqueleto de actina mediados por Rac, la activación de esta cinasa aumenta los niveles de Rac-GTP (Leevers *et al.* 1999). El mecanismo por el cual PI3-cinasa activa a Rac, no es aún muy claro, sin embargo la actividad GEF de Vav podría estar directamente relacionada (Han *et al.* 1998, Sanchez-Martin *et al.* 2004).

1.2.5.3 Serina/Treonina cinasas

Los productos de PI3-cinasa reclutan a la membrana plasmática a serina treonina cinasas citosólicas que incluyen PDK1, PDK2 y Akt. Akt, es activada en linfocitos T por citocinas, el receptor de antígenos y la molécula coestimuladora CD28 (Leevers *et al.* 1999, Parry *et al.* 1997).

Akt posee un dominio PH en la región N-terminal involucrado en la unión a PI(3,4)P₂ o PI(3,4,5)P₃ (Vanhaesebroeck & Alessi 2000). La expresión de PI3-cinasa es suficiente para desencadenar la activación de Akt en linfocitos. Durante la señalización de citocinas, mediada por PI3-cinasa, PKB y p70S6, se estimula la actividad de factores de transcripción E2F, importantes en el control del ciclo celular (Brennan *et al.* 1999).

La unión de Akt a lípidos no permite la activación "in vitro" de esta cinasa. Sin embargo, la acción de PDK1 y PDK2, las otras dos serina treonina cinasas dependientes de fosfolípidos, permiten su activación mediante la fosforilación de los aminoácidos Tre308 por PDK1 y Ser473 por PDK2. Una vez Akt se encuentra fosforilada y activada puede autofosforilarse en otros residuos y formar un complejo completamente activo e independiente de fosfolípidos que es capaz de disociarse de la membrana plasmática y translocarse al núcleo (Downward 1998, Vanhaesebroeck & Alessi 2000).

Al igual que Akt, PDK1 posee un dominio PH de unión a PI(3,4)P₂ o PI(3,4,5)P₃. A diferencia de Akt, PDK1 parece existir en una conformación activa y aunque es fosforilada “in vivo”, su actividad cinasa “in vitro” no se ve afectada (Alessi *et al.* 1997).

Akt juega un papel muy importante en la regulación de la supervivencia celular, su sobreexpresión retrasa la muerte en diferentes tipos celulares. Se le ha atribuido un papel anti-apoptótico por su acción sobre BAD y la caspasa-9 (Datta *et al.* 1999).

BAD se une a proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-X_L, bloqueando su función. Cuando BAD es fosforilada en los residuos de Ser112 o Ser136, no puede interactuar con estas proteínas y como consecuencia se inhibe la apoptosis. Akt puede fosforilar a BAD en el residuo de Ser136, y de esta manera contribuye a la supervivencia celular (Downward 1999). Sin embargo, existen otras cinasas como PKA y MAP que pueden fosforilar a BAD, es por esto que la inhibición de PI3-cinasa de clase IA no siempre induce apoptosis (Craddock *et al.* 1999).

La caspasa-9, una proteasa iniciadora capaz de activar caspasas efectoras como la caspasa-3, puede ser fosforilada en el residuo de Ser196 e inhibida por Akt (Cardone *et al.* 1998)

Se ha descrito que Akt también interviene en la muerte celular por medio de mecanismos basados en factores de transcripción. Akt fosforila los factores de transcripción de la familia forkhead (FKHR, FKHL y AFX), permitiendo su exportación desde el núcleo hasta el citoplasma, donde quedan retenidos, formando complejos con las proteínas 14-3-3 (Medema *et al.* 2000). La defosforilación de estos factores de transcripción produce su translocación al núcleo y la expresión de genes pro-apoptóticos como el ligando de Fas (Biggs *et al.* 1999, Brunet *et al.* 1999, Woods & Rena 2002).

Akt también activa el factor de transcripción NF-κB; esto se inicia por la fosforilación y consecuente activación de IKKαβ (cinasa inhibidora de NF-κB), que fosforila y marca a IκB (inhibidor de NFκB) para ser degradado mediante el sistema ubiquitina-proteosoma, dejando libre a NF-κB y favoreciendo su translocación al núcleo y su actividad de transcriptor de genes anti-apoptóticos.

Otro efecto de Akt, para favorecer la supervivencia celular, es la inactivación del gen supresor de tumor p53; Akt puede fosforilar y activar a MDM2, una proteína que regula negativamente a p53. MDM2 se encuentra usualmente en el citoplasma y cuando MDM2 es activado por Akt, se transloca al núcleo para unirse a p53, impidiendo su actividad como factor de transcripción de genes pro-apoptóticos (Carroll *et al.* 1999).

Akt media la transducción de señales de la insulina por fosforilación e inactivación de la glucógeno sintasa cinasa (GSK3), una enzima reguladora de la cinasa mTOR y por lo tanto del metabolismo (Beals *et al.* 1997, Marone *et al.* 2008). mTOR regula la traducción proteica, en respuesta a nutrientes y factores de crecimiento, al fosforilar componentes de la maquinaria de la síntesis de proteínas como son p70S6K y 4E-BP (Marone *et al.* 2008, Wendel *et al.* 2004).

1.3 LIGANDOS DE LA FAMILIA B7

Se han descrito siete miembros en esta familia, que son: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), ICOS-L, PD-L₁, PD-L₂, B7-H₃ y B7-H₄. Todos los miembros de esta familia son glicoproteínas transmembrana de tipo I, e interactúan con distintas moléculas de la familia de CD28. Se caracterizan por presentar dos dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina, uno variable (IgV) y el otro constante (IgC), que están codificados por exones individuales; y exones adicionales para los dominios citoplasmáticos y transmembrana. Los dominios de tipo inmunoglobulina poseen aproximadamente 100 aminoácidos de longitud mientras, los dominios citoplasmáticos son cortos (19-62 aminoácidos) y contienen residuos de serina y treonina que podrían ser sitios de fosforilación en las vías de señalización.

Los genes que codifican para B7.1 y B7.2 están estrechamente relacionados, así como los genes que codifican para PD-L₁ y PD-L₂, mientras que los genes que codifican para ICOS-L, B7-H₃ y B7-H₄ no están ligados.

B7.1 y B7.2 se unen a CD28 y CTLA-4, pero sus funciones en la respuesta inmune no son iguales, debido a sus diferentes interacciones con CD28 y CTLA-4 y su patrón de expresión. La interacción B7.1-CTLA-4 es de mayor afinidad en comparación con la interacción B7.2-CTLA-4. Mientras, CD28 se une de manera más eficaz a B7.2 que a B7.1 (Collins *et al.* 2002). Las afinidades de unión de ICOS-L a su receptor son similares a las de B7.1-CD28 (Brodie *et al.* 2000). PD-L₁ y PD-L₂ se unen al mismo receptor PD-1, pero PD-L₂ se une con mayor afinidad (Youngnak *et al.* 2003).

Los ligandos B7 tienen diferentes funciones inmunes, la expresión de B7.1, B7.2 y PD-L₂ se limita a células linfoides mientras que ICOS-L, PD-L₁, B7-H₃ y B7-H₄ tienen un patrón de expresión más amplio.

Todos los ligandos B7 se expresan en células presentadoras de antígeno, incluyendo células dendríticas, macrófagos y células B (Carreno & Collins 2002). Se detectan bajos niveles de B7.2 en las células B en reposo, dendríticas y macrófagos, su activación resulta en un aumento en la expresión de B7.2.

ICOS-L se puede expresar tanto en células hematopoyéticas como no hematopoyéticas; este ligando se expresa de forma constitutiva en células B de ratón, en macrófagos de bazo y peritoneo (Yoshinaga *et al.* 1999), y en una subpoblación de células de bazo CD3⁺ (Greenwald *et al.* 2005). También se ha detectado la expresión de ICOS-L en áreas de los órganos linfoides ricas en células B, incluyendo los folículos y la zona marginal del bazo, los folículos de las placas de Peyer y la médula en el timo. Además se ha detectado en varios órganos no linfoides como el cerebro, los riñones, los testículos, los pulmones y el músculo esquelético (Yoshinaga *et al.* 1999).

La expresión de PD-L₁ y PD-L₂ está regulada por citocinas: IL-4 e IL-13 regulan PD-L₂ mientras, el IFN- γ regula a PD-L₁. B7-H₃ y B7-H₄ están expresados constitutivamente en ratones, pero no en humanos (Carreno & Collins 2002).

Esta familia participa en la respuesta inmune, a través de la unión a los receptores de la familia CD28, generando señales inhibitoras o coestimuladoras. Las señales coestimuladoras complementan la activación de la célula T inducida por el receptor de antígeno. Un ejemplo de señales coestimuladoras o coinhibidoras lo proporciona los ligandos B7.1 y B7.2 y sus receptores CD28 y CTLA-4. La interacción entre los ligandos B7.1 y B7.2 con el receptor CD28 induce una mayor activación, expansión, diferenciación y supervivencia en las células T; estudios con ratones deficientes en B7.1, B7.2 o CD28 demuestran su incapacidad para generar una respuesta inmune eficaz (Borriello *et al.* 1997, Lenschow *et al.* 1996). Sin embargo, ratones deficientes en CTLA-4 presentan un fenotipo autoinmune severo, la ausencia de los ligando B7.1 y B7.2 en estos ratones elimina este fenotipo (Mandelbrot *et al.* 1999). Lo anterior demuestra que la interacción B7/CTLA-4 contrarresta la interacción B7/CD28, regulando de manera adecuada el receptor de células T y las señales coestimuladoras.

1.4 RECEPTORES DE LA FAMILIA CD28

Los miembros de la familia CD28 tienen un dominio extracelular similar al dominio de la región variable de las inmunoglobulinas (IgV) por el que se unen a su ligando expresado en la célula presentadora de antígeno, una región hidrofóbica transmembrana y una cola citoplasmática corta con posibles sitios de unión a dominios SH₂ y SH₃ (Wang & Chen 2004). Los miembros de esta familia incluyen CD28, ICOS, PD-1, CTLA-4 y BTLA-4. Son todas ellas moléculas con importantes funciones en la amplificación (CD28, ICOS) o la inhibición (PD-1, CTLA-4, BTLA-4) de las respuestas inmunitarias.

En cuanto al análisis filogenético de esta familia se puede decir que CD28, ICOS, y CTLA-4 se agrupan en el cromosoma 2q33 y tienen una cisteína sin aparear que les permite homodimerizar en la superficie de las células T. La cola citoplasmática de estos receptores posee el motivo YxxM de unión a dominios SH₂. Mientras que, PD-1 y BTLA se encuentran en distintas localizaciones en el genoma (2q37 y 3q13, respectivamente) y son muy similares entre sí. Es posible que PD-1 y BTLA-4 se encuentren como monómeros en la superficie celular, ya que no poseen el residuo de cisteína sin aparear, necesario para homodimerizar (Riley & June 2005).

1.4.1 CD28 y CTLA-4

La glicoproteína CD28 de 44 kDa, se expresa constitutivamente en el 80% de la superficie de células T humanas (en todas las células CD4 y aproximadamente en el 50% de las células CD8) y en prácticamente el 100% de las células T murinas. CD28 y CTLA-4 se unen a los mismos ligandos de la familia B7, comparten el motivo YxxM y el motivo MYPPPY en su región citoplásmica (Peach *et al.* 1994, Rudd & Schneider 2003), este último motivo no está presente en ICOS (Figura 6).

Los niveles de expresión de CD28 aumentan después de la activación de la célula T (June *et al.* 1990b). En cambio, CTLA-4 no se expresa en células T en reposo, pero su expresión es inducida luego de la activación de la célula T (Rudd & Schneider 2003).

Es probable que varias vías de señalización tengan un papel importante en el control de la expresión de CTLA-4. Algunos estudios han comprobado que en células murinas T CD28^{-/-} no se expresan cantidades significativas de CTLA-4 en la superficie celular y que la adición de IL-2 exógena aumenta la expresión de CTLA-4, lo que sugiere que CD28 regula la expresión de CTLA-4 (Walunas *et al.* 1994). También se ha demostrado que las integrinas tienen un papel importante en la regulación de la expresión de CTLA-4, ya que la adición de ligandos de integrina como ICAM-1 o 1-VCAM produce un aumento en la expresión de CTLA-4 (Damle *et al.* 1994).

En cuanto a la co-señalización mediada por CD28, es importante decir que el motivo YxxM de la cola citoplasmática de CD28 permite la unión a proteínas de señalización intracelular como PI3-cinasa y Grb-2; la fosforilación en tirosina de dicho motivo permite la unión a PI3-cinasa (August & Dupont 1994) mientras que el residuo de asparagina permite la unión a Grb-2 y a GADS (Watanabe *et al.* 2006). CD28 además se une a Itk, Tec y Lck ((Rudd & Schneider 2003, Schneider *et al.* 1995) (Figura 6).

Como resultado de la unión de CD28 con su ligando, la tirosina del motivo YxxM es fosforilada, posiblemente por las proteínas tirosina cinasa p56lck y p59fyn (Raab *et al.* 1995); este evento induce la activación de PI3-cinasa, la cual fosforila lípidos que contienen inositol, generando PIP₂ y PIP₃. Las numerosas intervenciones moleculares de esta enzima permiten la activación eficiente de la vía Ras y de PLC- γ .

Finalmente se produce la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), principalmente JNKs y ERKs, las cuales activan los factores de transcripción de la familia AP-1, Jun y Fos. AP-1 forma parte del complejo de unión al elemento de respuesta al CD28; AP-1, con NFAT y NF- κ B promueven la transcripción del gen de la IL-2. CD28 además de incrementar la producción de IL-2 también incrementa la producción de IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ , TNF- α y GM-CSF. Dichas citocinas actúan como factores de crecimiento ejerciendo una acción autocrina y paracrina.

CD28 previene la apoptosis y ayuda a mantener la supervivencia celular regulando positivamente el gen BCL-X_L (Boise *et al.* 2010). Además modula la diferenciación de los linfocitos T hacia clones Th1/Th2. Ensayos “in vivo” e “in vitro” en los cuales se bloquea la interacción B7/CD28 con la proteína de fusión hCTLA-4-Ig, muestran una desviación hacia la producción de citocinas Th1, pues no se produce IL-4 (Seder *et al.* 1994).

A diferencia de CD28, CTLA-4 es un regulador negativo de la función de las células T; CTLA-4 regula la tolerancia periférica por diferentes mecanismos:

Primero, inhibe la activación de células T patológicas por modulación de la señalización del TCR, específicamente en la fosforilación de la cadena ζ , compite con la molécula coestimuladora CD28 por los ligandos B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86) para inhibir su efecto coestimulador. Además puede interactuar directamente con el complejo TCR-CD3 en la sinapsis inmunológica para interrumpir la activación de célula T al unirse y bloquear el inmunoreceptor de tirosina basado en un motivo de activación (ITAM) (Harper *et al.* 1991).

Segundo, las células T reguladoras expresan constitutivamente CTLA-4 que se une a células efectoras para alterar la transducción de señales y la posterior liberación de citocinas. La unión de CTLA-4 con su ligando produce la liberación de TGF- β , lo cual ha sido propuesto como uno de los mecanismos de acción de las T reguladoras.

Tercero, las cascadas de señalización de CTLA-4 afectan el patrón de expresión de citocinas. También se ha propuesto otro mecanismo en el cual CTLA-4 podría usar el complejo LYP/Grb-2 para inhibir la activación de las células T. Este complejo podría unirse con los dominios SH₂ o SH₃ a CTLA-4 y así inhibir la activación de las células T (Thompson & Allison 1997).

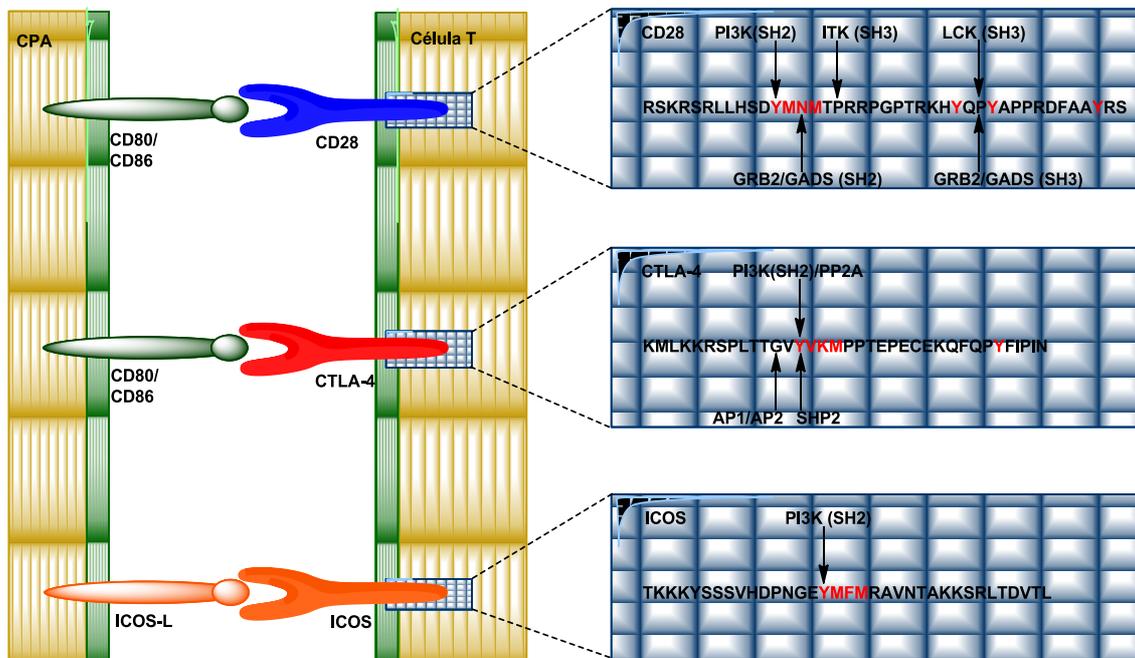


Figura 6. Representación de los dominios citoplasmáticos de CD28, ICOS y CTLA-4.

El motivo YxxM presente en los tres receptores, una vez fosforilado en tirosina, permite la unión al dominio SH₂ de la subunidad reguladora p85 de PI3-cinasa. Este motivo en CD28 es YMNMT, la asparagina (N) permite además la unión al dominio SH₂ de Grb-2 y posiblemente también a GADS. De manera similar CTLA-4 tiene un motivo GYVKM, que cuando no está fosforilado se une a los complejos adaptadores tetraméricos AP1 y AP2. CD28, CTLA-4, pero no ICOS poseen motivos ricos en prolina. CD28 tiene un motivo PRRP con el cual puede unirse a la cinasa ITK, y un motivo C-terminal PYAPP de unión al dominio SH₃ de Lck, Grb-2 o GADS (Figura obtenida de Rudds *et al.* *Nature Reviews in Immunology*, 2003).

1.4.2 ICOS

ICOS (*Inducible Costimulator*, CD278), es una molécula coestimuladora de la familia CD28, relacionada estructuralmente con CD28 que fue descrita por primera vez en linfocitos T activados. ICOS es una glicoproteína homodimérica de 50-65 kDa, formada por dos cadenas polipeptídicas de tipo I unidas por puentes disulfuro (Redoglia *et al.* 1996), aunque existe una fracción expresada de forma monomérica. La secuencia de ICOS humano consta de 199 aminoácidos y en ratón consta de 200 aminoácidos. ICOS humano presenta un 24% de homología con CD28 y solo un 17% con CTLA-4 (Hutloff *et al.* 1999) (Beier *et al.* 2000). Sin embargo, ICOS es incapaz de unirse a B7.1 y B7.2 y su ligando es la molécula: ICOS-L (B7h o B7RP-1).

En ratón, ICOS posee un 19% de identidad con CD28 y un 72% de identidad con la secuencia de ICOS humana (Mages *et al.* 2000). El gen de ICOS se encuentra localizado en el cromosoma 2q33-34 humano y en el cromosoma 1 del ratón, próximo a los genes de CTLA-4 y CD28 (Rojo *et al.* 2001).

1.4.2.1 Expresión y estructura de ICOS

ICOS se expresa típicamente en células T activadas, después de 4-6 horas de activación “in vitro” con antígenos, mitógenos, anti-CD3, anti-TCR, ésteres de forbol con ionóforos de calcio, entre otros. Alcanza su máximo de expresión los días 2-7 después de su activación (Rojo *et al.* 2001). La señal del TCR y citocinas como IL-2 e IL-4 en células T murinas, o IL-12 e IL-23 en células T humanas puede aumentar aún más la expresión de ICOS (Wassink *et al.* 2004, Yagi *et al.* 2003). Aunque la interacción B7/CD28 no es esencial para inducir la expresión de ICOS, si puede promover un aumento en los niveles de ICOS (van Berkel *et al.* 2005, Villegas *et al.* 2002).

Aunque ICOS es una molécula inducible se puede encontrar en una fracción apreciable de las células T de las placas de Peyer de ratón y las amígdalas humanas; y también se expresa de manera estable en una baja proporción de linfocitos T de sangre periférica o de órganos linfoides secundarios (bazo y ganglios linfáticos). ICOS no se expresa en células B, en macrófagos ni en fibroblastos (Rojo *et al.* 2001). También se ha observado que, en condiciones adecuadas, ICOS puede favorecer la diferenciación de linfocitos T con capacidad reguladora, el mantenimiento de poblaciones de linfocitos T reguladores, o la capacidad T reguladora de la pequeña población CD4⁺ ICOS⁺ presente en los órganos linfoides secundarios, que tiene un papel supresor en el desarrollo de Encefalomiелitis Alérgica Experimental (EAE) (Mesturini *et al.* 2006, Rojo *et al.* 2008b).

ICOS es un marcador de diferentes funciones efectoras “in vivo”, ya que el patrón de expresión de ICOS está relacionado con el patrón de expresión de citocinas; el análisis de la pequeña población de células T CD4⁺ de ratón que expresan ICOS muestra que las células que expresan niveles altos de ICOS producen principalmente IL-10; las células productoras de IL-4,

IL-5 e IL-13 presentan una expresión media de ICOS y las células productoras de IL-2, IL-3, IL-6 e IFN- γ presentan una baja expresión de ICOS (Lohning *et al.* 2003).

El coestimulador inducible tiene una estructura similar a la de otros miembros de la familia CD28 (Figura 7), formada por un péptido señal de 20 aminoácidos, un dominio de tipo Ig variable con cuatro cisteínas conservadas (42, 63, 83, 109), un pequeño péptido conector que incluye la cisteína 137, un dominio transmembrana (residuos 141 a 164 de ICOS humano) y un dominio citoplasmático de 35 aminoácidos (Hutloff *et al.* 1999, Mages *et al.* 2000).

ICOS posee el motivo YxxM presente en CD28 y en CTLA-4, el cual media la asociación a la subunidad reguladora de PI3-cinasa. A diferencia de CD28 y CTLA-4, el dominio extracelular de ICOS carece del motivo MYPPPY necesario para la unión a B7.1 y B7.2. Además carece de los dos motivos citoplasmáticos PxxP presentes en CD28 implicados en la unión a proteínas con dominios SH₃ como Grb-2 o Lck (Figura 6) (Hutloff *et al.* 1999, Peach *et al.* 1994, Yoshinaga *et al.* 1999).

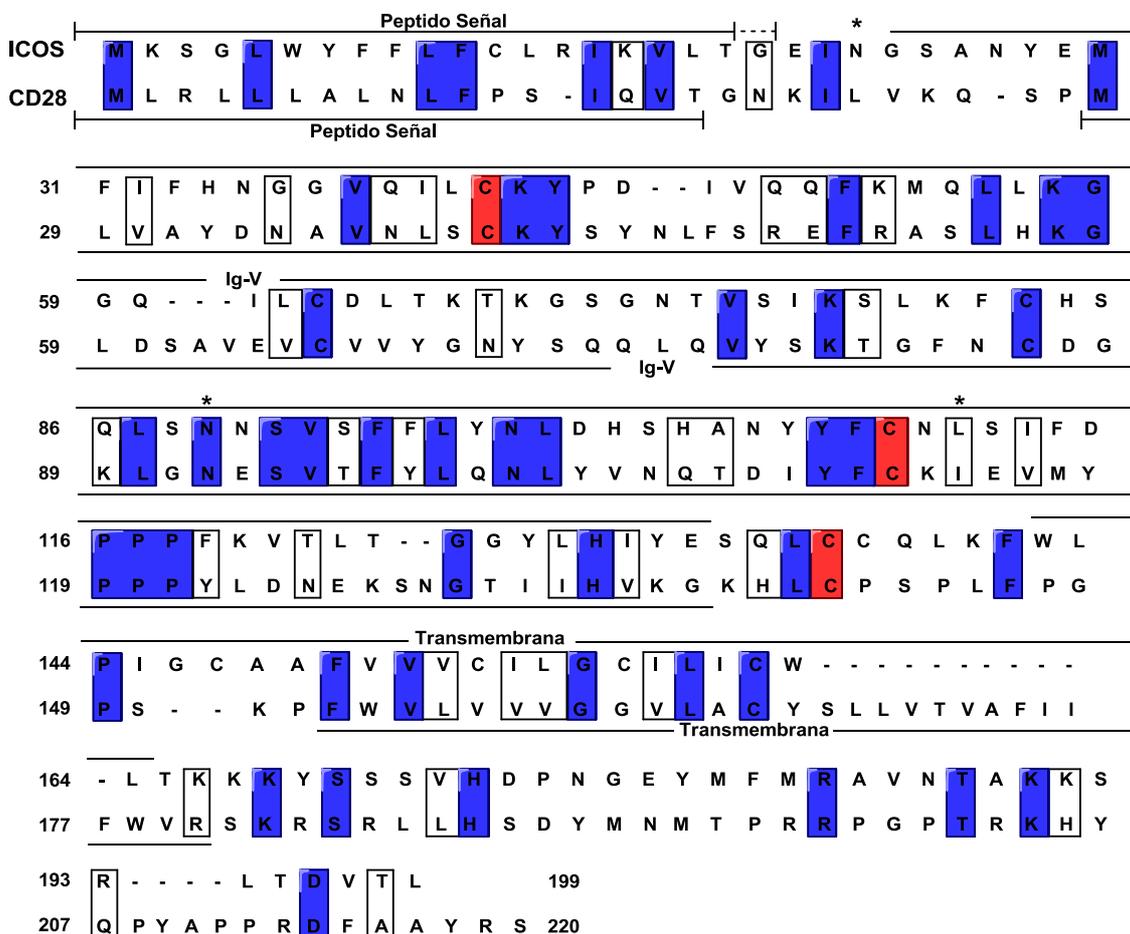


Figura 7. Alineación de la secuencia de ICOS y CD28.

Los residuos de aminoácidos idénticos se encuentran en color azul, los residuos de cisteínas en color rojo, los residuos conservados se indican dentro de recuadros y los posibles sitios de N-glicosilación con un asterisco. (Figura obtenida de Hutloff *et al.* *Molecular Immunology*, 1999).

1.4.2.2 Señalización a través de ICOS.

La activación a través del TCR y una coestimulación adecuada inician una serie de eventos moleculares en las cascadas de señalización que conducen a la transcripción de genes en el núcleo. El coestímulo de ICOS genera un aumento en las señales mediadas por el complejo TCR/CD3, como son la fosforilación en tirosina de la cadena ζ del TCR, ZAP-70 y Vav (Feito *et al.* 2003).

A pesar de las diferencias en las moléculas de asociación intracelular, ICOS y CD28 comparten vías de señalización similares en células T periféricas. La fosforilación de ERK1/2, Akt, PDK1, y p38 se produce después de la estimulación de CD28, así como después de la estimulación de ICOS, posiblemente a través de la activación de PI3-cinasa (Arimura *et al.* 2002). Además, ICOS mejora las cascadas de señalización esenciales para muchas funciones celulares incluyendo la secreción de citocinas, principalmente la vía de la cinasa MAP Ras/Raf/MEK/ERK y la vía JNK y p38 (Feito *et al.* 2003).

La cola citoplasmática de ICOS (21 aminoácidos) es más corta que la de CD28 (41 aminoácidos) y contiene dos residuos de tirosina de los cuales el residuo de tirosina 180 se encuentra dentro del motivo YxxM (Y₁₈₀MFM); como se ha dicho anteriormente la fosforilación en el residuo de tirosina permite la unión a PI3-cinasa.

Se ha demostrado que ICOS co-precipita eficazmente con PI3-cinasa (Coyle *et al.* 2000, Feito *et al.* 2003). La diferencia de aminoácidos entre ICOS y CD28 en la posición tres del motivo YxxM está implicada en la falta de co-señalización de ICOS para inducir la secreción de IL-2 (Harada *et al.* 2003).

En comparación con CD28, ICOS es más eficiente en la activación de Akt a través de PI3-cinasa (Arimura *et al.* 2002), por esto es posible que ICOS esté implicado en la prevención eficiente de la apoptosis en las células que lo expresan.

1.4.2.3 Efecto de ICOS en la respuesta de las células T “in vitro”

CD28 es el principal activador de las células T “naive” aumentando su capacidad proliferativa en respuesta a antígenos, la producción de IL-2 y la supervivencia celular. Estudios en células T deficientes en CD28 demuestran una disminución en la proliferación en respuesta al antígeno (Green *et al.* 1994, Noel *et al.* 1996).

Al igual que CD28, células T activadas con células presentadoras de antígenos deficientes en ICOS-L tienen una reducción en la proliferación y la producción de IL-2, es decir, ICOS-L es requerido para la activación, diferenciación y expresión de citocinas efectoras (Nurieva *et al.* 2003b).

Al igual, que en células murinas, las células T periféricas humanas pueden ser activadas “in vitro” fácilmente y proliferar por señales mediadas por el TCR y por ICOS. El bloqueo de estas

señales resulta en una proliferación celular reducida; sin embargo el bloqueo de CD28 muestra una mayor inhibición de la proliferación celular (Aicher *et al.* 2000).

Cuando la interacción ICOS-ICOS-L es bloqueada por ICOS-Ig, las células T CD4⁺ producen más IFN- γ y menos IL-4 e IL-10. Esto demuestra que la coestimulación de ICOS es importante en la activación de células T y en el desarrollo de las células Th2 (McAdam *et al.* 2000).

Además de la inducción de proliferación, ICOS también está implicado en la supervivencia de las células T. Así, se ha observado una reducción en la muerte de células T estimuladas a través del TCR y con ICOS (Riley *et al.* 2001).

En resumen, la inducción de la proliferación “in vitro”, la supervivencia celular y la diferenciación son características compartidas por ICOS y por CD28. CD28 es crucial para la producción de IL-2, mientras que ICOS es muy poco eficiente en la producción de IL-2 pero muy eficiente en la producción de citocinas como IL-4 e IL-10.

1.4.2.4 Efecto de ICOS en la respuesta de las células T “in vivo”

Tanto ICOS como CD28 median la expansión de células T “in vitro”. También se ha demostrado una disminución en la expansión de células T “in vivo” después del bloqueo de ICOS en ratones CTLA-4^{-/-} (van Berkel *et al.* 2005). Además, la ligación de ICOS “in vivo” induce la expansión de células T CD4⁺ en cuanto a número de células T y activación (Hutloff *et al.* 1999, Yoshinaga *et al.* 1999). Tanto CD28 como ICOS desempeñan un papel en la expansión de células T “in vivo”, que por consiguiente afecta la diferenciación y las funciones efectoras de los linfocitos T CD4⁺.

ICOS y CD28 tienen un papel importante en la respuesta inmune de enfermedades relacionadas con Th1 y Th2. Ratones deficientes en CD28 e ICOS presentan problemas con la formación de centros germinales durante la infección con virus o bacterias. Los ratones que son defectuosos para la vía B7/CD28 no forman centros germinales y no inducen niveles significativos de IgG (Ferguson *et al.* 1996, Shahinian *et al.* 1993). Aunque se observan centros germinales primarios en ratones ICOS-L^{-/-} o ICOS^{-/-}, estos son más pequeños y no se desarrollan centros germinales secundarios grandes; esto va acompañado de una reducción en el suero de anticuerpos de isotipo IgG1 e IgG2a (Dong *et al.* 2001).

Pacientes deficientes en ICOS padecen hipogammaglobulinemia severa y alteraciones en la homeostasis celular B, que conduce a infecciones bacterianas recurrentes, siendo una de las causas del síndrome de inmunodeficiencia común variable (Warnatz *et al.* 2006). Al parecer la homeostasis de las células T no se ve afectada en estos pacientes, pero hay una disminución en la producción de IL-10 que puede contribuir a una escasa formación de centros germinales.

Por lo tanto, ICOS juega un papel importante en la diferenciación de las células B, el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas, la formación de los centros germinales y el desarrollo de células B de memoria. Así, ICOS tiene un papel crucial en la respuesta inmune humoral.

1.5 PAPEL DEL CITOESQUELETO EN LA ACTIVACIÓN DE LA CELULA T

Se ha descrito que CD28 actúa sobre dos aspectos muy importantes para la activación de los linfocitos T por antígeno: La redistribución de los "rafts" lipídicos y la modificación del citoesqueleto de actina. Estos efectos están poco estudiados en relación con ICOS, por lo que uno de los objetivos de nuestro trabajo ha sido determinar su importancia en la coestimulación por ICOS.

El citoesqueleto de actina está formado por microtúbulos y filamentos; está regulado por proteínas de unión (ARPs) a actina globular (G-actina) o filamentosa (F-actina).

La red de filamentos puede unirse formando las fibras de estrés que determinan y mantienen la estructura celular. Los filamentos participan en el movimiento celular proporcionando una fuerza de locomoción que resulta de la polimerización de actina; por otro lado los microfilamentos contribuyen al transporte intracelular. El sistema de microtúbulos regula la secreción polarizada de moléculas efectoras y contribuye a la endocitosis del receptor así como el mantenimiento de estructuras dependientes de F-actina.

Existen proteínas motoras de actina denominadas miosinas, con capacidad para desplazarse por los microfilamentos, convirtiendo la energía química derivada de la hidrólisis de ATP en movimiento mecánico. En la estructura de las miosinas se distingue el extremo N-terminal con actividad ATPasa y su dominio de unión a la actina, la región central donde se localizan las cadenas ligeras reguladoras y que en algunos casos tienen capacidad de unión a calmodulina, y el extremo C-terminal muy variable que confiere a las distintas miosinas sus peculiaridades funcionales (Baker & Titus 1998).

Varios procesos celulares como la adherencia, la formación de la sinapsis inmunológica y el establecimiento de la polaridad celular, que son necesarios para iniciar y mantener la activación de los linfocitos T; dependen del citoesqueleto de actina.

Como se ha comentado anteriormente, la activación a través del TCR genera una serie de eventos de señalización que incluyen la fosforilación de tirosinas, la activación de PLC- γ y el flujo del calcio, la activación de PKC, la activación de las vías de señalización SAK/JNK y MAPK y la translocación al núcleo de factores de transcripción (Acuto & Cantrell 2000).

Del mismo modo, el TCR media procesos y cascadas de transducción de señales que conducen a la reorganización del citoesqueleto, que es esencial para la propagación de las diversas cascadas de activación de enzimas implicadas en la activación de la célula T. Estos cambios en el citoesqueleto incluyen la polimerización de actina, reorganización dinámica de la matriz de actina y la formación de lamelipodia y uropodos (Henning & Cleverley 1999). Adicionalmente, las células T polarizan sus microtúbulos (MTOCs), la producción de citocinas y los mediadores citotóxicos hacia las células presentadoras de antígeno (Lowin-Kropf *et al.* 1998). En sentido contrario, la dinámica del citoesqueleto de actina es importante para los eventos de señalización de la célula T, porque existe una correlación entre la inducción de la

reorganización del citoesqueleto y la fosforilación en tirosina (Beemiller & Krummel 2010, Tskvitaría-Fuller *et al.* 2003, Viola *et al.* 1999).

La activación del receptor de células T provoca la asociación de F-actina con la cadena ζ del TCR (Rozdzial *et al.* 1995). Las cadenas ζ asociadas a este receptor, después de la activación del TCR presentan diferentes patrones de fosforilación.

Varias moléculas involucradas en el citoesqueleto como ezrina, talina, vinculina, paxilina, fibrina, la cinasa FAK, Pyk2 y la cadena ligera de miosina son fosforiladas gracias a la activación del TCR (Billadeau *et al.* 2007, Krawczyk & Penninger 2001, Rudd 1999). También se ha observado que tubulina interacciona con ZAP-70 y co-precipita con Vav (Huby *et al.* 1995).

La activación del receptor de antígeno en la célula T también conduce al reclutamiento de moléculas de señalización y del complejo TCR/CD3 a las balsas lipídicas de la membrana (Xavier *et al.* 1998). En presencia de señales coestimuladoras se induce la formación de la sinapsis inmunológica (SI o SMAC), la cual es una estructura compleja formada en la región de contacto entre la célula presentadora de antígeno y la célula T, en la que se estructuran de un modo ordenado los receptores para antígeno, co-receptores, moléculas de adhesión, moléculas de señalización intracelular y balsas lipídicas. La formación de SMAC, el reclutamiento de receptores y balsas lipídicas depende de la organización del citoesqueleto de actina y miosina (Grakoui *et al.* 1999, Krawczyk & Penninger 2001).

1.5.1 Microdominios de membrana

La compartimentalización de las membranas depende de la composición lipídica y del contenido de proteínas capaces de organizar los lípidos. La combinación de proteínas y lípidos dentro de las membranas hace posible la existencia de regiones submicroscópicas. De esta forma se originan microdominios de membrana en los que se concentran, según su afinidad, determinados tipos de lípidos y proteínas.

Las balsas lipídicas o "rafts" son dominios de membrana de pequeño tamaño (10-200 nm), enriquecidos en esteroides y esfingolípidos, muy dinámicos y heterogéneos en su composición proteica y cuya función es la de compartimentalizar las membranas para distintos procesos celulares como el tráfico intracelular de membranas, la formación de uniones celulares o el desarrollo de subdominios polarizados en la célula necesarios durante la migración, la organogénesis y la angiogénesis (Billadeau *et al.* 2007, Krawczyk & Penninger 2001).

Los microdominios de membrana también llamados, GEMs (dominios de membrana enriquecidos en glicolípidos) o DIGs (dominios enriquecidos en glicolípidos insolubles en detergentes) forman grandes complejos no covalentes resistentes a la disociación por

detergentes no iónicos a 4°C (Billadeau *et al.* 2007, Cinek & Horejsi 1992). Esta característica ha permitido su aislamiento en gradientes de sacarosa.

En los linfocitos T, los microdominios de membrana están implicados en la activación de inmunorreceptores. El co-receptor CD4, y cinasas de la familia Src, como Lck y Fyn, se encuentran en estos microdominios incluso antes de los eventos de activación inducidos por el TCR. Después de la activación celular, las formas fosforiladas de ZAP-70, PLC- γ y las cadenas ζ del TCR de 21 y 23 kDa, o del adaptador LAT (Linker of Activated T cells) se distribuyen en microdominios de membrana (Montixi *et al.* 1998, Xavier *et al.* 1998).

El reclutamiento de proteínas a microdominios de membrana implica la palmitoilación o la miristoilación de proteínas. De hecho, la segregación constitutiva de Lck y Fyn en las balsas depende de la acilación N-terminal (Rodgers *et al.* 1994). Además, la segregación de LAT en las balsas está acompañada por palmitoilación de la cisteína 26 pero no de la cisteína 29. Esta palmitoilación de LAT en cisteína 26 es necesaria para su fosforilación en tirosina (Zhang *et al.* 1998b).

El reclutamiento del TCR a “rafts” lipídicos está estrechamente relacionado con las modificaciones en el citoesqueleto de actina: El 30-40% de la cadena ζ del TCR se localiza en la fracción insoluble en células T en reposo, pero alrededor del 90% de estas cadenas se asocian con la fracción insoluble, “rafts”, y/o filamentos de actina polimerizados después de la activación del TCR (Caplan & Baniyash 1995, Caplan *et al.* 1995). El reclutamiento dependiente de actina del complejo TCR/CD3 a las balsas lipídicas es una estrategia utilizada por las células T para asegurar la organización molecular de proteínas de señalización que concentran segundos mensajeros y proteínas adaptadoras y excluyen a los reguladores negativos como CD45, conduciendo a una señalización eficaz del TCR y a la activación del linfocito T (Beemiller & Krummel 2010, Meiri 2005, Rodgers *et al.* 1994).

1.5.2 La familia de Rho-GTPasas como reguladores del citoesqueleto

La familia de Rho GTPasas está compuesta por proteínas monoméricas con un tamaño aproximado de 20 kDa, representadas en la especie humana por al menos 23 miembros, de las cuales Rho, Rac, y Cdc42 son las mejor caracterizadas. Las Rho GTPasas regulan la dinámica de actina y microtúbulos, la adhesión celular, la morfología celular así como la formación de lamelipodios y filopodios, y por lo tanto cualquier proceso que requiera motilidad (Ridley 2001)

La mayoría de las Rho GTPasas se encuentran entre una conformación activa unida a nucleótidos de guanosina trifosfato (GTP) o una conformación inactiva unida a guanosina difosfato (GDP) (Etienne-Manneville & Hall 2002).

Existen tres tipos de proteínas que regulan la actividad de las Rho GTPasas: Los factores de intercambio de nucleótidos de guanosina (GEFs, Guanosine Exchange Factors), que activan las Rho GTPasas; las proteínas GAPs (GTPase Activating Protein), que activan la hidrólisis del

GTP, lo que conlleva a la inactivación de las Rho GTPasas; y por último, las proteínas reguladoras GDI, que inhiben el intercambio de GDP por GTP, manteniendo a la GTPasa en una conformación inactiva (Burrige & Wennerberg 2004, Reif & Cantrell 1998).

Se ha encontrado que Vav1 actúa como intermediario entre la estimulación del TCR y la activación de las Rho GTPasas Rac1, Cdc-42 y RhoA, funcionando como una proteína GEF (Bustelo 2001, Crespo *et al.* 1997).

Rac1 está implicada en la formación de lamelipodios, mientras que Cdc42 y Rho G estimulan la extensión de filopodios. La activación de Rho A promueve la formación de fibras de estrés y el ensamblaje/desensamblaje de las adhesiones focales (Nobes & Hall 1995). Las Rho GTPasas actúan normalmente en la membrana plasmática, donde pueden anclarse debido a que están modificadas postraduccionalmente por prenilación. En algunos tipos celulares se ha descrito que Rac1 y Rho se localizan en balsas lipídicas y/o caveolas (Gingras *et al.* 1998, Michaely *et al.* 1999).

Una vez activada, las GTPasas Rho interactúan con proteínas efectoras para generar una respuesta celular (Figura 8).

Los principales efectores de Rac y Cdc42 promueven cambios en el citoesqueleto de actina. La serina treonina cinasa p65PAK es comúnmente activada por Rac y Cdc42, juega un papel importante en la regulación de la dinámica de actina y la adhesión celular durante la migración. p65PAK regula las adhesiones focales, con la ayuda de PIX y GIT1 (Obermeier *et al.* 1998). Además, p65PAK fosforila y activa a la cinasa LIM, que a su vez fosforila e inactiva a cofilina, una proteína de unión a actina que despolimeriza el extremo negativo de los filamentos, regulando su longitud.(Arber *et al.* 1998).

Los miembros de la familia WASP/SCAR/WAVE son reguladores de la polimerización de la actina (Takenawa & Miki 2001). En su estado activado, cada una de estas proteínas es capaz de estimular a Arp2/3, que puede iniciar la polimerización de actina (Weaver *et al.* 2003). Cdc42 activa a WASP y N-WASP directamente (Rohatgi *et al.* 1999) mientras que, Rac activa a la familia Scar/WAVE de manera indirecta (Eden *et al.* 2002).

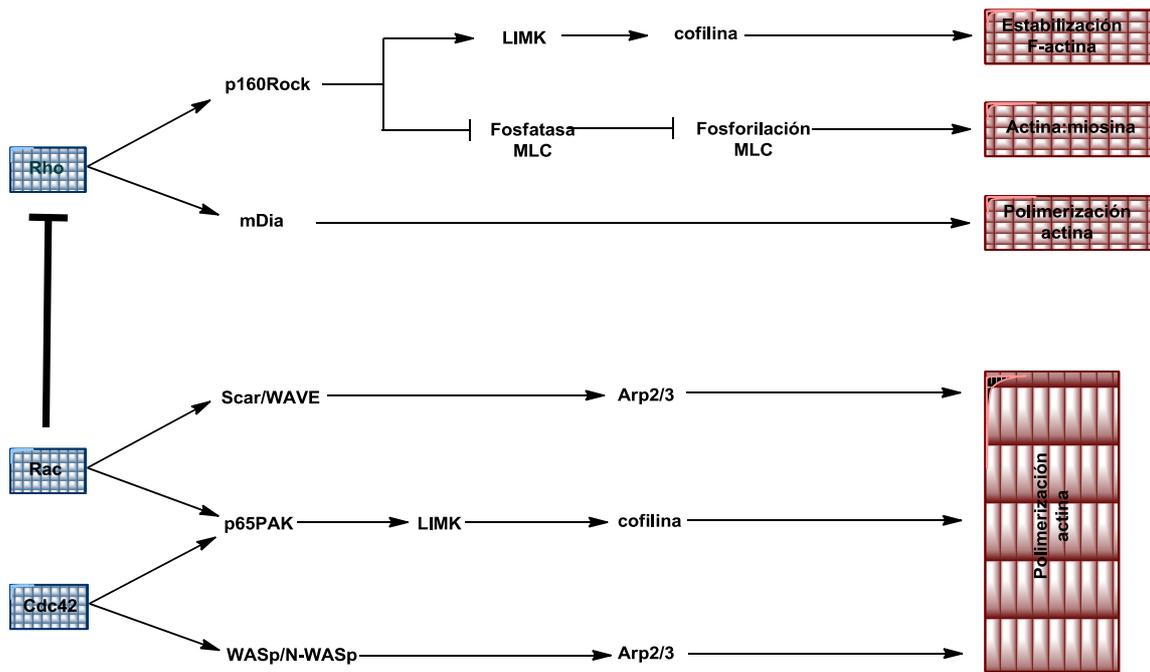


Figura 8. Mecanismo de regulación de los filamentos de actina por las Rho GTPasa.

Rho promueve el ensamblaje actina:miosina en los filamentos a través de mDia y p160ROCK. Mientras que Rac y Cdc42 regulan la polimerización de actina a través de la familia WASP/Scar/WAVE y la cinasa p65PAK (Figura obtenida de Raftopoulou & Hall. *Developmental Biology*, 2004).

Un efector de Rho que participa en el ensamblaje de los filamentos actina:miosina es la serina treonina cinasa p160ROCK. Rho y p160ROCK son esenciales para la migración en leucocitos (Alblas *et al.* 2001). En su estado activo, p160ROCK, al igual que p65PAK, puede fosforilar y activar a LIMK, la cinasa encargada de fosforilar e inactivar a cofilina, estabilizando los filamentos de actina. Además, p160ROCK interactúa y fosforila la cadena ligera de miosina (MLC) y a la subunidad reguladora (MBS) de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina. Esta fosforilación disminuye la actividad de la fosfatasa de MLC (Kawano *et al.* 1999). Finalmente, se incrementa la fosforilación de un residuo crítico en MLC, lo cual induce un cambio conformacional en la miosina aumentando su unión a los filamentos de actina y subsecuentemente la formación de fibras de estrés (Raftopoulou & Hall 2004).

Además, Rho activa es capaz de reclutar a la formina mDia a sitios específicos de la membrana produciendo un incremento local de profilina, lo que conduce a la polimerización de actina (Raftopoulou & Hall 2004, Watanabe *et al.* 1999). También se ha demostrado que Rac-GTP inhibe la función de Rho en muchos tipos celulares (Sander *et al.* 1999).

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Los receptores ICOS y CD28 son moléculas de señalización intracelular en linfocitos T que presentan semejanzas estructurales y funcionales. CD28 posee el motivo YMNM en su región citoplasmática, que tras su fosforilación se une e induce la activación de PI3-cinasa. ICOS presenta un motivo similar YMFM adecuado para la unión a la subunidad reguladora p85 de PI3-cinasa. Es por esto que nuestro objetivo principal es estudiar la coestimulación por ICOS de la activación por TCR/CD3; particularmente para detectar posibles señales exclusivas de ICOS y no de otras moléculas de la familia de CD28. Esto nos ha llevado a estudiar la asociación de las subunidades catalíticas de PI3-cinasa de clase IA a ICOS, desarrollando los siguientes objetivos:

1. Identificar las moléculas que se unen al dominio citoplasmático de ICOS de ratón por medio de péptidos fosforilados en el motivo de tirosina YMFM.
2. Determinar la abundancia relativa de las subunidades de PI3-cinasa en inmunoprecipitados con ICOS.
3. Conocer el efecto del silenciamiento (siARN) y de la inhibición de las subunidades catalíticas de PI3-cinasa de clase IA en la estimulación y la coestimulación por ICOS de señales tempranas y tardías de activación de linfocitos T, incluyendo fosforilación de cinasas como Akt y ERK, o secreción de citocinas.
4. Estudiar el papel de las subunidades catalíticas de PI3-cinasa de clase IA en la supervivencia de linfocitos T.
5. Analizar los cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por ICOS, las proteínas implicadas en dicho proceso y su relación con la localización de ICOS en las balsas lipídicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Animales de laboratorio

Se utilizaron ratones machos BALB/CByJ1co (H-2^d) y C57BL/6J1co (H-2^k) de diez a catorce semanas de edad, criados en el animalario del Centro de Investigaciones Biológicas.

3.1.2 Líneas celulares

SR.D10

Es una línea celular murina derivada espontáneamente en los cultivos del clon D10.G4.1 de células T CD4⁺ de ratones AKR/J (Ojeda *et al.* 1995), específica para la conalbumina de clara de huevo de gallina en el contexto de antígenos de histocompatibilidad IA^k (Kaye *et al.* 1983). El clon D10.G4.1 deriva del clon TAKR.D10 y este último de la línea celular D10. Estas líneas fueron proporcionadas por el Dr. C.A. Janeway (Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA).

H4.A5

Es un mutante negativo (ICOS⁻) de la línea SR.D10, generado por irradiación y selección negativa (Diez-Orejas *et al.* 1994).

COS-7

Fibroblastos procedentes de riñón de mono africano (*Cercopithecus aethiops*), utilizada frecuentemente para expresar concentraciones elevadas de una proteína de forma transitoria.

Líneas productoras de interleucinas

Se ha utilizado la línea X63Ag8-653 transfectada con los plásmidos BMGNeomIL-4 o BMGNeomIL-2 (Karasuyama & Melchers 1988) para la producción de IL-4 o IL-2 recombinante de ratón en los sobrenadantes del cultivo. Esta línea fue proporcionada por los Drs. C.A. Janeway y F. Melchers.

Hibridomas productores de anticuerpos monoclonales

Se utilizaron diferentes hibridomas para obtener anticuerpos monoclonales. Las líneas fueron proporcionadas por el Dr. C. A. Janeway. Los anticuerpos se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo por precipitación con sulfato amónico y cromatografía en columnas de

proteínas A-sefarosa o proteína G-sefarosa. A continuación se resumen los anticuerpos monoclonales producidos y sus características.

Anticuerpo	Especie	Isotipo	Especificidad (Referencia)
YCD3-1	Rata	IgG2b	CD3 _c de raton (Portolés y col., 1989)
GK 1.5	Rata	IgG2b	CD4 de ratón (Dialynas y col., 1983)
M1/70	Rata	IgG2a	CD11b de ratón (Springer y col., 1979)
37.51	Hámster Sirio	IgG2	CD28 de ratón (Springer y col., 1979)
Y-19	Rata	IgG2c	CD90 (Thy-1) de ratón (Jones & Janeway, 1981)
C398.4A	Hámster Armenio	IgG	ICOS humano/ratón (Redoglia y col., 1996; Buonfiglio y col., 2000)
11B11	Rata	IgG1	IL-4 de ratón (Ohara y Paul, 1985)

3.1.3 Estirpes bacterianas

DH5 α

Se ha utilizado para la amplificación y mantenimiento de ADN plasmídico: F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17 (rK- mK+), λ -.

TOP 10

Se ha utilizado para clonación: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu) 7697 galE15 galK16 rpsL (StrR) endA1 λ -.

3.1.4 Anticuerpos policlonales

Suero normal de ratón y rata. Inmunoglobulinas de suero de ratón

Se utilizaron sueros completos e inmunoglobulinas purificadas por cromatografía en columnas de proteína A-sefarosa.

Anticuerpo anti-ZAP-70

Suero de conejo generado por inmunización repetida con la proteína de fusión de GST y los residuos 266-344 de ZAP 70 murina. Presenta reactividad cruzada frente a ZAP-70 humano (Feito *et al.* 2003).

Anticuerpo anti-Lck

Suero de conejo generado por inmunización con la proteína de fusión de GST y los residuos 22-51 de Lck humana (Jimenez-Perianez *et al.* 2005).

Anticuerpo anti-ICOS

Suero de conejo generado por inmunización con la proteína de fusión GST y los residuos de Thr18 a Ser132 de la región citoplasmática de ICOS de ratón (Acosta *et al.* 2011).

Anticuerpo anti-Vav

Suero de conejo generado por inmunización con la proteína de fusión de GST y los residuos 738-845 de onco-Vav1 murina (Acosta *et al.* 2011).

Anticuerpo anti-CD3 ϵ

Suero de conejo generado por inmunización con la proteína de fusión GST unida al segmento extracelular de CD3 ϵ de ratón (Jimenez-Perianez *et al.* 2005).

Anticuerpo anti-CD4

Suero de conejo inmunizado con el péptido con los residuos Gly50 a Gly63 de CD4 acoplado a ovoalbúmina (Bello *et al.* 2007).

3.1.5 Otros anticuerpos

Especie	Isotipo	Especificidad (Referencia)
Conejo	Policlonal	Akt 1/2/3 (H-136, sc8312, Santa Cruz Biotechnology)
Ratón	IgG1	B7H2 (1017B-7, R&D Systems)
Conejo	Policlonal	Erk 2 (C-14, sc154, Santa Cruz Biotechnology)
Cabra	Policlonal	Ig de conejo (A0545, Sigma)
Conejo	Policlonal	Ig de ratón (A9309, Sigma)
Cabra	IgG	IgG de ratón (A11004, Molecular probes)
Rata	IgG1	IFN- γ de ratón, captura ELISA (R4-6A2, BD Biosciences)
Rata	IgG1	IFN- γ de ratón-Biotina, captura ELISA (XMG1,4, Nuestro laboratorio)
Rata	IgG2a	IL-2 de ratón, captura ELISA (18161D, BD Pharmingen)
Rata	IgG2b	IL-2 de ratón-Biotina, detección ELISA (18172D, BD Pharmingen)
Rata	IgG1	IL-4 de ratón, captura ELISA (11B11, Nuestro laboratorio)
Rata	IgG1	IL-4 de ratón-Biotina, detección ELISA (BVD6-24G2, 554390, BD Biosciences)
Rata	IgG1	IL-10 de ratón, captura ELISA (JES5-2A5, 551215, BD Pharmingen)
Rata	IgG2b	IL-10 de ratón-Biotina, detección ELISA (JES5-16E3, 554465, BD Pharmingen)
Conejo	Policlonal	p38 (H-147, sc7149, Santa Cruz Biotechnology)
Cabra	Policlonal	p55 γ (N-13, sc48644, Santa Cruz Biotechnology)
Conejo	Policlonal	p85 (06195, Upstate Biotechnology)
Conejo	Policlonal	p110 α (H-201,sc7174, Santa Cruz Biotechnology)
Ratón	IgG1	p110 α (611398, BD Biosciences)
Conejo	IgG	p110 α (C73F8, 4249, Cell Signaling Technology)
Conejo	Policlonal	p110 β (S-19, sc602, Santa Cruz Biotechnology)
Conejo	Policlonal	p110 δ (H-219, sc7176, Santa Cruz Biotechnology)
Conejo	Policlonal	p-Akt-Ser473 (9271, Cell Signaling Technology)
Conejo	Monoclonal	p-Akt-Thr308 (244F9, 4056S, Cell Signaling Technology)
Conejo	Policlonal	p-Thr-p-TyrErk (V6671, Promega)
Conejo	Policlonal	p-Thr-p-Tyr p38 (9211S, N.E.Biolabs)
Ratón	IgG2b	p-Tyr (558008, BD Biosciences)
Ratón	IgG2b	V5 (R96025, Invitrogen)
Ratón	IgG1	Vinculina (V9131, Sigma)

3.1.6 Medios de cultivo

Medio Click

Se empleó para cultivo de hibridomas, COS-7 y linfocitos T CD4⁺. La base es el medio DMEM (Eagle modificado por Dulbecco, Gibco) suplementado con: Suero fetal bovino inactivado al 10%, aminoácidos esenciales MEM 50x a 1,5x final (Gibco), aminoácidos no esenciales MEM 100x a 3x final (Gibco), 1 ml/100 ml de precursores de ácidos nucleicos 100x (adenosina, citosina, guanosina, uridina) a 0,1 mg/ml final de cada uno de los precursores diluidos en agua (Peck & Bach 1973), vitaminas MEM 100x a 1x final (Gibco), piruvato sódico 100 mM a 2,5 mM final (Gibco), L-glutamina 200 mM a 2 mM final (Gibco), HBSS 10x (solución compensada de sales de Hank) a 0,15x final (Gibco) para compensar el aumento de volumen de los aditivos, 2-mercaptoetanol 0,1 M en agua a 40 μ M final, gentamicina a 40 μ g/ml final (Gibco) y ajustando el pH (7,0-7,4) con NaOH (Peck & Bach 1973).

Medio con Interleucinas

Para el cultivo de la línea SR.D10 se utilizó el medio Click, suplementado adicionalmente con: IL-1 α de ratón (25 pg/ml, Peprotech), IL-2 de ratón (10 U/ml) e IL-4 de ratón (20 U/ml).

Medio LB

Para el cultivo de bacterias: Bactotripsina 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 85 mM; pH 7,5. Para la preparación de LB sólido se le añadió agar al 1,5% (p/v).

Medio SOB completo

Bactotripsina 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM y MgCl₂ 10 mM.

Medio SOC

Medio SOB completo más glucosa al 0,37%.

3.1.7 Vectores

pEGFP-C2-RhoA, pEGFP-C2-Rac1, pEGFP-C2-Cdc42

GFP fusionado a las formas inactivas o dominantes negativos de las GTPasas (N19-RhoA, N17-Rac-1 y N17-Cdc42). Las GTPasas codificadas presentan mutaciones puntuales que alteran la tasa de intercambio GDP/GTP dando lugar a la proteína permanente inactiva (unida a GDP) (Coso *et al.* 1995). Estas construcciones fueron proporcionadas por el Dr. J. Teixidó (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid).

pEGFP-C2-Vav

Un fragmento de 1000 pb fue liberado de pKES18 (ADNc del extremo 3' de Vav) y ligado a pEGFP-C2. Este vector codifica para la proteína GFP fusionado al dominio SH₃-SH₂-SH₃ de Vav (Zugaza *et al.* 2002). Esta construcción trunca fue proporcionada por el Dr. X. Bustelo (Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Salamanca).

pcDNA 3.1/V5-His Topo

Este vector lleva unido covalentemente una topoisomerasa (vector activado) que estabiliza el complejo y, gracias a su actividad ligasa, puede insertar directamente el producto de la PCR. Además, la zona en la que el plásmido aparece abierto contiene residuos T que son complementarios a la adenina que añade la polimerasa en el extremo 3' del producto de PCR. De forma que la reacción de ligación se produce por apareamiento A-T, el inserto se une con igual probabilidad en las dos orientaciones. El vector forma parte del kit de clonación *pcDNA 3.1/V5-His TOPO TA* (Invitrogen).

3.1.8 ARN de Interferencia o silenciamiento (siARN)

Se emplearon los siguientes ARN interferentes (20 nucleótidos, Ambion, Applied Biosystems) específicos para la secuencia del ARNm de las subunidades catalíticas de PI3-kinasa p110 α y p110 δ de ratón:

PIKca: "Silencer[®] Select siRNA s71604", 1 μ M

Secuencia sentido: GACACUACUGCGUAACUAUtt

Secuencia antisentido: AUAGUUACGCAGUAGUGUctg

PIKcd: "Silencer[®] Select siRNA s71605", 2 μ M

Secuencia sentido: GGAUGAAGCUGGUUGUUCtt

Secuencia antisentido: UGAACAACCAGCUUCAUCCgc

Control negativo: "Silencer[®] Select Negative Control #1

3.1.9 Péptidos

Los péptidos usados fueron sintetizados por el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas. Los péptidos sintetizados corresponden a la cola citoplasmática de ICOS y CD28 de ratón (fosforilados (pY) o no fosforilados (Y) en el residuo de tirosina del motivo YxxM), según se indica a continuación. La secuencia de estos péptidos biotinilados es:

ICOS: GSSVHDPNSE Y₁₈₁MFMAAVNTNKKSLAGVT-Biotina

ICOSpTir: GSSVHDPNSEpY₁₈₁MFMAAVNTNKKSLAGVT-Biotina

sICOSpTir: VHDPNSEpY₁₈₁MFMAAVNTNK-Biotina

CD28pTir: RLLQSDpY₁₈₉MNMTPRRPLTRKPYQPYAPAR-Biotina

3.1.10 Tampones

Tampones para manejo de células

PBS: Solución salina con tampón fosfato: NaCl (0,13 M), KCl (2,7 mM), HPO₄Na₂ (8 M) y HPO₄K (1,4 mM); en agua destilada; pH 7,2.

PBS/Hepes/Glucosa/Ca²⁺/Mg²⁺: Hepes (10 mM, pH 7,2), SO₄Mg (1 mM), Cl₂Ca (1 mM), Glucosa (50 mM) y Rojo fenol en PBS.

PBS-EDTA para selección magnética: PBS pH 7,2, EDTA (2 mM), BSA (0,5%).

Tampones para transfección

Tampón CaCl₂: CaCl₂ (2,5 M, Sigma) en agua destilada.

Tampón HBS 2x: Hepes (50 mM), NaCl (280 mM), Na₂HPO₄ (1,5 mM); en agua destilada; pH 7,05 ajustado con NaOH 5 N.

Tampones para activación de células con pervanadato

Tampón pervanadato: Na₃VO₄ (5 mM) en medio Click; pH 7 ajustado con HCL (1 N), H₂O₂ (1 M) y reposo durante 20 min.

PBS/EDTA/OV: PBS, EDTA (0,5 mM) y Na₃VO₄ (1 mM).

Tampones para ELISA de citocinas

Tampón de bloqueo: PBS, FCS (10%).

Tampón de lavado: PBS, Tween 20 (0,05%).

Tampones para lisis celular e inmunoprecipitación

Tampón de lisis Tritón: Tris/HCl (50 mM), NaCl (300 mM), Tritón X-100 (1%, Sigma); pH 7,6.

Tampón de lisis CHAPS: Tris/HCl (50 mM), NaCl (300 mM), CHAPS (10 mM, Pierce); pH 7,6.

En los dos tampones se añadieron inhibidores de proteasas como: PMSF (1 mM), Aprotinina (10 µg/ml), Leupeptina (10 µg/ml). Se añadió también MgCl₂ (1 mM), EGTA (1 mM) y Na₃VO₄ (1 mM) como inhibidor de fosfatasa.

Tampón de lavado Tritón: Tris/HCl (50 mM), NaCl (300 mM), Tritón X-100 (0,1%, Sigma); pH 7,6.

Tampón de lavado CHAPS: Tris/HCl (50 mM), NaCl (300 mM), CHAPS (2 mM, Pierce); pH 7,6.

Tampones para electroforesis en gel de poliacrilamida e "immunoblot"

Tampón gel inferior: Tris base (1,5 mM), SDS (0,4%); en agua destilada; pH 8,8.

Tampón gel superior: Tris base (0,5 M), SDS (0,4%); en agua destilada; pH 6,8.

Tampón para electrodos: Tris base (0,025 M), Glicina (0,192 M), SDS (1%); en agua destilada; pH 8,3.

Tampón de muestra: Tris base (62,5 mM), Glicerol (10%), SDS (2,3%), 2-mercaptoetanol (5%) y trazas de azul de bromofenol (0,05%); en condiciones reductoras pH 7,6.

Tampón de transferencia: CAPS (10 mM, Sigma) en agua; pH 11.

Tampón de lavado TBST: Tris/HCl (20 mM, pH 7,6), NaCl (150 mM) y Tween 20 (0,05%).

Tampón de lavado PBST: PBS, Tween 20 (1%).

Tampón de "stripping": Tris/HCl (62,5 mM), SDS (70 mM), 2-mercaptoetanol (0,68%); pH 6,7.

Tampón de bloqueo PBSTL/TBSTL: PBST mas Leche desnatada (3%) o TBST mas Leche desnatada (2%) y Gelatina tipo A (Sigma, G-6144) (0,5%).

Tampón anticuerpo primario: PBST o TBST con Gelatina (0,2%) y Azida sódica (0,1%)

Tampones para manejo de ADN

Tampón TAE 1x: Tris-acetato (40 mM), EDTA (2 mM); en agua destilada; pH 8,0.

Bromuro de Etidio: 0,5 mg/ml en Tampón TAE.

Tampón para tinción de actina y vinculina

Tampón de fijación: p-formaldehído 4% en Na₂HPO₄ (0,05 M), NaH₂PO₄ (0,05 M) en agua destilada, disuelto por agitación a 60-70°C; pH 7,0.

Tampón de permeabilización: PBS, Saponina (0,1%)

Tampón de bloqueo: PBS/ BSA (1%)

Tampón anticuerpos: PBS/BSA (4%)

Tampón para aislamiento de balsas lipídicas:

Tampón MBS: MES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5.

Tampón de lisis: MES 25 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 0,5%, PMSF 1 mM, Aprotinina 10 µg/ml, Na₃VO₄ 1 mM, pH 6,5.

3.1.11 Otros reactivos y productos

Se emplearon inhibidores específicos de distintas subunidades catalíticas de PI3-cinasa incluyendo p110 α (inhibidor IV (PI-103), inhibidor VIII (PIK-75)), p110 β (inhibidor VI (TGX-221)) y p110 γ (inhibidor II); todos ellos de Calbiochem. El inhibidor de p110 α (A66) fue suministrado por Sellech Chemicals. El inhibidor de p110 δ (IC87114) fue proporcionado por Symansis Pty (Nueva Zelanda). El inhibidor general de PI3-cinasa (LY294002) fue obtenido de Sigma.

Los inhibidores de Akt (Inhibidor IV e Inhibidor V (Triciribine)), el inhibidor de Lck (inhibidor II), el inhibidor de calmodulina (W-7), el inhibidor de la cinasa de Rho (H-1152), el inhibidor de la activación de NF- κ B (IKK inhibitor, Wedelolactone) y la citocalasina D fueron suministrados por Calbiochem. El inhibidor de la actividad ATPasa de miosina (Blebbistatina), el inhibidor de MLCK (ML-7), el inhibidor de caspasas (Z-VAD-fmk), el inhibidor de autofagia (3-MA) y el inhibidor de la GTPasa dinamina (Dynasore) fueron suministrados por Sigma.

También se emplearon estreptavidina-sefarosa, proteína A acoplada a HRPO, faloidina-FITC y toxina del cólera acoplada con fluoresceína (CBT-FITC) de Sigma. La proteína A-sefarosa y G-sefarosa se obtuvo de GE Healthcare, y la IL-7 de Peprotech.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Aislamiento de linfocitos T CD4⁺ de ratón

Los bazo de ratones C57BL/6 fueron extraídos en condiciones de esterilidad y triturados mediante presión suave con un émbolo de jeringa sobre una rejilla de acero, en una placa de Petri con medio de cultivo. Los eritrocitos presentes fueron lisados por choque hipotónico con agua, añadiendo inmediatamente un volumen de PBS 10x por cada 9 volúmenes de agua añadidos. Después de lavar las células tres veces con medio, la suspensión se pasó por filtro estéril de nylon (30 µm) y se recontaron las células.

Tras resuspender las células en PBS-EDTA para selección magnética, el proceso de selección de linfocitos T CD4⁺ se realizó por selección negativa (CD4⁺ T Cell Isolation Kit II, 130-095-248, Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células T no-CD4⁺, T-CD8⁺, T γ / δ , células B, NK, células dendríticas, monocitos y eritrocitos, fueron indirectamente marcados con un cocktail de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina (contra CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ / δ y glicoporina A), utilizado como reactivo primario y microbeads conjugadas con anticuerpos anti-biotina como reactivo secundario. Las células T CD4⁻ y no T quedaron retenidas en la columna magnética del separador, mientras las células T CD4⁺ no marcadas pasaron a su través.

El rendimiento de células T CD4⁺ obtenido del bazo fue del 15-20% del total de células iniciales.

3.2.2 Aislamiento de linfocitos T CD4⁺ Naive de ratón

Una vez preparada la suspensión de células del bazo de ratones C57BL/6, como se indicó arriba, se realizó el proceso de selección magnética de linfocitos T CD4⁺ Naive con el kit "*CD4⁺ CD62L⁺ T Cell Isolation Kit II*" (130-093-227, Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El proceso se realiza en dos etapas, la primera consiste en el aislamiento de linfocitos T CD4⁺ por selección negativa como se describió anteriormente, y la segunda etapa consiste en el aislamiento por selección positiva de la fracción de células T CD4⁺ CD62L⁺ por marcaje directo con microesferas anti-CD62L (L-selectina). El rendimiento de células T CD4⁺ CD62L⁺ obtenido del bazo fue del 60% del total de CD4⁺.

3.2.3 Obtención de blastos a partir de linfocitos T CD4⁺

Los linfocitos T CD4⁺ purificados (10⁶ células/ml) de ratones BALB/c se activan en medio con concanavalina A (2,5 μ g/ml, Sigma) e IL-2 (10 U/ml), en presencia de células de bazo singeneicas (5 x 10⁵ células/ml) de las que se eliminan previamente las células T mediante incubación con anticuerpos anti-CD90 (30 min a 4°C), lavado y resuspensión en complemento de conejo (suero de conejo joven, 15% final, 1 ml/bazo) y posteriormente en mitomicina C (40 μ g/ml final, Sigma) con incubación por 30 minutos a 37°C, lavado y filtrado por nylon de 30 μ m. Tras 48 horas de cultivo en estufa a 37°C, 5% CO₂, las células activadas se lavaron, se resuspendieron en medio y se centrifugaron sobre Percoll (GE Healthcare) al 50%; los blastos de la interfaz de Percoll (0-50%) se lavaron nuevamente y se expandieron por 48 horas más (0,4 x 10⁶ células/ml) en medio con IL-2 (20 U/ml). Transcurrido este periodo se midió la pureza por citometría de flujo (\geq 90% de CD4⁺ y \geq 80% de ICOS⁺).

3.2.4 Activación celular por anticuerpos adsorbidos a esferas de poliestireno

Se incubaron esferas de poliestireno de 4,5 μm de diámetro (Polibead[®] Polystyrene microspheres, Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Germany) con anticuerpos (anti-CD3, anti-ICOS, anti-CD3 mas anti-ICOS o un control sin anticuerpo). Para la activación de células SR.D10 se utilizaron anticuerpos anti-CD3 a 0,5 $\mu\text{g/ml}$, anti-ICOS a 5 $\mu\text{g/ml}$ y para la activación de blastos se utilizaron anticuerpos anti-CD3 a 10 $\mu\text{g/ml}$ y anti-ICOS a 20 $\mu\text{g/ml}$, durante toda la noche en agitación constante y a 4°C. Tras la incubación las esferas se lavaron dos veces con medio de cultivo. Las células se resuspendieron en este medio con esferas en una relación 1:1. Inmediatamente se incubaron en baño a 37°C. Pasados 10 minutos de incubación, o el tiempo indicado, se detuvo la activación con PBS/EDTA/OV muy frío. Finalmente las células se centrifugaron y se lisaron para análisis por “immunoblot”.

En su caso, se realizó la activación en presencia de distintos inhibidores farmacológicos con el fin de analizar las señales tempranas de activación (p-Akt, p-Erk) por “immunoblot”, o con células nucleofectadas con siARN (ver apartado 3.2.7), o bien las células fueron activadas durante 4 horas con el fin de analizar la producción de interleucinas en los sobrenadantes.

3.2.5 Activación celular por anticuerpos adsorbidos a placas de cultivo

El anticuerpo disuelto (anti-CD3) a una concentración adecuada en PBS (10 $\mu\text{g/ml}$), se añadió a una placa de cultivo de 24 pocillos fondo plano (Costar, 3524) en un volumen de 500 μl . La placa se incubó toda la noche a 4°C, a continuación se lavo con PBS y se añadieron las células a una concentración final de 2×10^6 células/ml en un volumen final de 1 ml de medio de cultivo. La activación en algunos casos se realizó en presencia de inhibidores farmacológicos.

En los casos en los que se utilizó anti-CD28, éste se añadió en forma soluble a una concentración final de 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Las células se incubaron a 37°C, 5% CO_2 y 95% de humedad durante 72 horas, transcurrido este tiempo, se estudió la proliferación celular, y con los sobrenadantes del cultivo se determinó la concentración de citocinas.

3.2.6 Medida de proliferación celular

Se utilizó el método colorimétrico descrito por Mosmann en 1983 (Mosmann, 1983). A 100 μl de cultivo se le añadieron 20 μl de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolio; Sigma, M-2128) a 0,4 mg/ml final en PBS. El anillo tetrazólico se rompe por enzimas mitocondriales generando precipitados azul oscuro de formazán, que son disueltos por adición de una solución de isopropanol conteniendo HCl 0,04 N (100 $\mu\text{l/pocillo}$). Esta reacción se produce solo en células vivas (2-4 horas a 37°C) y se puede cuantificar midiendo la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro (Labsystems iEMS Reader MF).

3.2.7 Silenciamiento con siARN

Las células SR.D10 se resuspendieron (5×10^6 células/100 μ l) en la solución de nucleofección recién preparada (Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit V, VCA-1003, Lonza). Se añadieron los siARN para las subunidades catalíticas de PI3-cinasa (siARN p110 α , ID: s71604, 1 μ M; siARN p110 δ , ID: s71605, 2 μ M; siARN control negativo 1-2 μ M) y se colocó la mezcla en una cubeta de nucleofección siguiendo el protocolo del fabricante. Tras la nucleofección en el Nucleofector Amaxa (programa T-20), se recogieron las células cuidadosamente y se diluyeron ($3,3 \times 10^6$ células/ml) en medio Click con interleucinas precalentado a 37°C y se distribuyeron en placas de cultivo (24 pocillos, BD Falcon) para su incubación a 37°C y 5% CO₂.

Pasadas 40 horas de la nucleofección, las células fueron lavadas, pasadas por un filtro de 30 μ m para eliminar agregados, recontadas y activadas con esferas de poliestireno recubiertas de anticuerpo.

Linfocitos T CD4⁺ CD62L⁺ “naive” (6×10^6 células/100 μ l) fueron nucleofectados con el kit (Amaxa mouse T Cell Nucleofector[™] Kit, VPA-1006, Lonza) y los siARN para las subunidades catalíticas de PI3-cinasa (siARN p110 α , ID: s71604, 2 μ M; siARN p110 δ , ID: s71605, 2 μ M; siARN control negativo 2 μ M). La nucleofección se realizó con el Nucleofector Amaxa y el programa X-01.

3.2.8 Transfección de COS-7 con fosfato cálcico

Este método se basa en la introducción de un coprecipitado de fosfato cálcico y DNA exógeno en la célula. Este precipitado se forma al mezclar dos soluciones, una salina que contiene cloruro cálcico y otra que contiene el fosfato. El ADN presente queda incorporado en los cristales del precipitado formado, adhiriéndose a la superficie de las células y entrando en ellas por endocitosis. Las células COS-7 se sembraron el día antes teniendo en cuenta que alcanzaran una confluencia entre el 20-40% en el momento de transfección. El medio Click se cambió 4 horas antes de la transfección de manera que estuviera fresco. Se preparó una mezcla ADN/CaCl₂ de 500 μ l: 450 μ l con el ADN a transfectar (pcDNA3.1/V5-His/TOPO/p110 α o pcDNA3.1/V5-His/TOPO/p110 δ , 40 μ g, ver apartado 3.2.24), mas 50 μ l de CaCl₂ (250 mM). A continuación se añadió la mezcla de ADN/CaCl₂ sobre un volumen (500 μ l) de HBS 2x. Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, para que se formara el precipitado de fosfato cálcico/ADN. La solución anterior se añadió gota a gota sobre las células mientras que se agitaba la placa. Transcurridas 4 horas de incubación de las células con el precipitado, se realizó un choque con glicerol al 10% en medio Click (2 ml/placa) durante 3 minutos, después se lavaron las células 3 veces con PBS y se les añadió medio Click fresco. Al cabo de 48 horas de incubación, las células fueron tripsinizadas, lisadas y los lisados empleados en ensayos de inmunoprecipitación con anticuerpos (p.e. anti-p85 PI3-K, anti-V5) para su análisis posterior por “immunoblot”.

3.2.9 Adhesión, elongación celular y tinción de F-Actina

Se colocaron cubreobjetos de vidrio de 10 mm de diámetro en placas de cultivo de 24 pocillos, los cuales se incubaron durante toda la noche y a 4°C con 0,3 ml de anticuerpo anti-ICOS o poli-L-lisina (10 µg/ml en PBS). Tras lavar los cristales con PBS, se añadieron las células (250.000-300.000/muestra) en 0,5 ml de PBS/Hepes/Glucosa/Ca²⁺/Mg²⁺, pH 7,2 (en presencia o ausencia de inhibidores). Después de unos segundos de centrifugación se incubaron las células a 37°C durante 40 minutos o por el tiempo indicado, se lavaron las células con PBS fijándolas a continuación 5 minutos con paraformaldehído al 4% precalentado a 37°C y lavando de nuevo con PBS. Para determinar la presencia y distribución de la actina polimerizada, las células fijadas se permeabilizaron primero durante 5 minutos con PBS/Saponina 0,1%. A continuación, las células fueron teñidas por 30 minutos con faloidina-FITC o faloidina-Texas Red (50 nM). Finalmente se lavaron las células con PBS/Saponina 0,1% y se montaron con Vectashield (Vector Laboratories) sobre un portaobjetos. Se tomaron imágenes celulares con un microscopio Axioplan universal (Carl Zeiss, Jena, Germany) usando un objetivo de 40x y una cámara digital Leica DFC 350 FX. Las imágenes fueron analizadas usando Adobe PhotoShop 6.0 (Adobe). La cuantificación de la elongación y de la superficie de contacto (área celular) se realizó con el software Image J 1.38x (National Institutes of Health). El índice de elongación celular se midió para cada célula determinando la razón entre el valor de la longitud máxima de la célula y el segmento mayor perpendicular al primero. Una célula no elongada, con forma regular, tiene un índice de elongación de 1, éste valor se incrementa en las células elongadas.

En células que expresan dominantes negativos de GTPasas y de Vav

Células SR. D10 (5 x 10⁶ células/100 µl) fueron nucleofectadas (Amaya[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit V, VCA-1003, Lonza) usando el programa X-01 y con 5 µg de plásmidos control (pEGFP-C2), o de plásmidos codificando formas dominantes negativas de las GTPasas RhoA (pEGFP-C2-RhoA (N19)), Rac1 (pEGFP-C2-Rac1 (N17)) y Cdc42 (pEGFP-C2-Cdc42 (N17)) o de Vav (pEGFP-C2-Vav (SH₃-SH₂-SH₃)). Las células fueron incubadas en medio Click con interleucinas durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Una vez se comprobó la eficiencia de la nucleofección por análisis de expresión de GFP en el citómetro, las células fueron incubadas sobre cristales recubiertos con anti-ICOS, fijadas y analizadas al microscopio para determinar la elongación tamaño celular y distribución de la actina como se ha descrito previamente.

3.2.10 Tinción de vinculina

Una vez adheridas las células a los cubreobjetos y teñidas con faloidina-FITC se realizaron dos lavados con PBS y se bloquearon los cristales con PBS/BSA (1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de bloquear se incubaron las células durante 1 hora y a temperatura ambiente con 0,3 ml de anticuerpo anti-vinculina (1/400; anticuerpo primario)

diluido en PBS/BSA (4%). Tras la incubación se realizaron 2 lavados y se incubaron las células durante 20 minutos y a 4°C con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (anti-IgG Alexa Fluor 568, 1/1200) diluido en PBS/BSA (4%); finalmente se lavaron las células 3 veces con PBS y se montaron con Vectashield (Vector Laboratories) sobre un portaobjetos. Se tomaron imágenes celulares con el microscopio confocal ultraespectral Leica TCS-SP2-AOBS-UV, usando el objetivo de 63x a intervalos de 1 μm . Se realizaron controles para eliminar la señal de fondo. El uso de cada fluororomo por separado permitió comprobar la ausencia de cruce de señales entre los canales.

3.2.11 Detección de balsas lipídicas por fluorescencia

Para la visualización de balsas lipídicas o la polimerización de actina, las células fueron estimuladas con microesferas de poliestireno (descrito anteriormente), o con el anticuerpo adsorbido a cubreobjetos. Las esferas ($20\text{-}40 \times 10^6/\text{ml}$ en PBS) fueron incubadas con anticuerpos (mAb anti-CD3, YCD3-1, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o M1/70, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ como control negativo más el anticuerpo anti-ICOS C398.4A o el anticuerpo control a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación fueron lavadas con PBS y mezcladas con células T (proporción 1:1 célula:esfera, 10^8 células/ml), durante 20 minutos a 37°C. Las células estimuladas fueron colocadas sobre cristales recubiertos con poli-L-Lisina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS, toda la noche, 4°C). Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, se realizaron dos lavados con PBS, y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 5 minutos a 37°C. Para detectar el gangliósido GM-1, un marcador de balsas lipídicas, se tiñeron las células con la subunidad B de la toxina colérica conjugada con fluoresceína (CTB-FITC, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS/0,1% Suero fetal Bovino) durante 30 minutos a 4°C. Tras esta incubación las células fueron lavadas nuevamente dos veces con PBS y montadas sobre portaobjetos con Vectashield. Para la tinción de F-Actina se realizó el método descrito anteriormente.

En algunos ensayos, las células SR.D10 se incubaron con esferas recubiertas de anti-ICOS o de Poli-L-Lisina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a una proporción célula:esfera de 1:4 (10^8 células/ml), durante 5 minutos en hielo. Después las células ($0,25\text{-}0,3 \times 10^6$ células) resuspendidas en 0,5 ml de PBS/Hepes/Glucosa/ $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, fueron colocadas en placas de 24 pocillos con cubreobjetos recubiertos con poli-L-Lisina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, toda la noche, 4°C). Después de unos segundos de centrifugación se incubaron las células durante 30 minutos a 37°C, se lavaron, se fijaron y se tiñeron como se describió anteriormente.

El análisis se realizó por microscopia confocal con el microscopio confocal ultraespectral Leica TCS-SP2-AOBS-UV, usando el objetivo de 63x a intervalos 0,5 μm . Las señales de sondas diferentes fueron tomadas en paralelo. Cien células fueron analizadas para cada condición. El procesamiento de imágenes fue realizado con Adobe Photoshop (Adobe Systems, Mountain

View, CA). Algunas imágenes fueron analizadas con el microscopio Axioplan Universal (Carl Zeiss, Jena, Germany) usando el objetivo de 40x y la cámara digital Leica DFC 350 FX.

3.2.12 Muerte celular

Se analizó en células SR.D10 así como en linfocitos T CD4⁺. Las células una vez aisladas y lavadas con medio Click, se colocaron (10⁶ células/ml) en placas de 24 pocillos en presencia o ausencia de diversos estímulos e inhibidores y se incubaron durante 24, 48 o 72 horas. También se midió la muerte celular a tiempo 0. Tras la incubación se lavaron las células con PBS y se realizó la detección de células apoptóticas por la unión de Anexina y de la integridad de la membrana celular por la incorporación de yoduro de propidio con el kit *Anexina V-FITC/Ioduro de Propidio* (Bender MedSystems) por el método descrito por el fabricante. Una vez teñidas las células fueron analizadas en el citómetro FC500.

Las células con apoptosis tardía fueron las dobles positivas (Anexina V-FITC/Ioduro de propidio) mientras que las células con apoptosis temprana fueron las positivas para Anexina V-FITC pero negativas para yoduro de propidio. Como controles negativos se utilizaron células sin Anexina V-FITC ni yoduro de propidio, con Anexina V-FITC sola o con yoduro de propidio sólo. En algunos ensayos se utilizaron células activadas con IL-2, IL-7, anti-CD3 y anti-CD3 más anti-CD28.

Para estudiar la apoptosis en células silenciadas para las subunidades catalíticas de PI3-cinasa p110 α y p110 δ , linfocitos T CD4⁺ CD62L⁺ “naive” fueron nucleofectados con los siARN como se describe en el apartado 3.2.7. Una vez nucleofectadas, las células fueron resuspendidas en medio Click (10⁶ células vivas/200 μ l) y distribuidas en placas de cultivo (96 pocillos, Costar, 3799) para su incubación a 37°C y 5% CO₂ durante 24, 48 o 72 horas. Tras la incubación se midió la apoptosis con el kit *Anexina V-FITC/Ioduro de Propidio* (Bender MedSystems).

3.2.13 Lisis celular

Las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en tampón de lisis CHAPS (2 x 10⁷ células/ml), se incubaron en hielo durante 20 minutos y centrifugaron a 1000 xg. Los lisados sobrenadantes se pueden utilizar en el momento o almacenar a -20°C para su análisis posterior.

3.2.14 Ensayo de interacción y precipitación (“pull-down”)

Unión de péptidos biotinilados a esferas de estreptavidina sefarosa

Esferas de estreptavidina-sefarosa (100 μ l, lavadas previamente con tampón de lisis CHAPS) se incubaron rotando durante 2 horas a 4°C con 50 μ g de péptido (ICOS, ICOSpTir, sICOSpTir, o CD28pTir) en un volumen de 0,5 ml. Posteriormente se centrifugaron (500 xg, 2 min) y se lavaron tres veces con tampón de lisis CHAPS.

Preaclarado y “pull down”

Para los ensayos de proteómica, el lisado celular ($4-8 \times 10^8$ células) fue preaclarado con esferas de estreptavidina-sefarosa ($100 \mu\text{l}$, lavadas previamente con tampón de lisis) por rotación durante 1 hora a 4°C ; el lisado fue centrifugado a $1000 \times g$ 5 min.

El sobrenadante (lisado preaclarado) fue incubado durante 4 horas con las esferas de estreptavidina-sefarosa con péptidos asociados, con rotación y a 4°C . Trascurrido este tiempo, las esferas fueron lavadas 4 veces ($500 \times g$, 2 min) con tampón de lavado CHAPS y extraídas con tampón de muestra para electroforesis en gel. Para los ensayos de electroforesis bidimensional, el último lavado se realizó con agua destilada, y la extracción se realizó con tampón de rehidratación para electroforesis bidimensional.

Para los ensayos de “inmunoblot” con proteínas obtenidas por “pull-down” se utilizaron $2-4 \times 10^7$ células y $15-20 \mu\text{g}$ del péptido unido a $15-20 \mu\text{l}$ de esferas de estreptavidina-sefarosa.

3.2.15 Electroforesis bidimensional

Para la identificación de las proteínas que interaccionan con las secuencias citoplásmicas de ICOS, la muestra resultante del “pull-down” con los péptidos se separó habitualmente por electroforesis bidimensional. Esta técnica separa proteínas utilizando dos tipos de electroforesis sucesivas sobre la misma muestra. En primer lugar se realiza un isoelectroenfoque (IEE) que consiste en la separación de las proteínas en función de su punto isoelectrónico (pI) en un gradiente de pH inmovilizado (IPG). Posteriormente se realiza la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) atendiendo a su masa molecular. De esta forma se obtiene al final un mapa de puntos (spots) que representan las proteínas distribuidas en dos dimensiones.

Para el isoelectroenfoque la muestra fue resuspendida en tampón con urea (7 M), tiourea (2 M), Tritón X-100 (4%), DTT (100 mM), anfolitos (Bio-Lyte 3-10, BioRad) y azul de bromofenol ($140 \mu\text{l}/\text{muestra}$). Se centrifugó y el sobrenadante ($125 \mu\text{l}$) se utilizó para la rehidratación de la tira de IPG (7 cm ReadyStrip™ IPG strips, pH 3–10, Bio-Rad) durante 12 horas a temperatura ambiente sobre cubetas con aceite mineral. Tras la rehidratación se enfocaron las tiras utilizando un sistema de enfoque eléctrico (15 minutos, 250 V; 1 hora, 1000 V; 1 hora, 8000 V; 500 V hasta que se alcanzan los voltios/hora deseados, entre 8000-13000 voltios/hora). Una vez terminado el isoelectroenfoque es necesario el equilibrado de las IPGs antes de la separación de las proteínas en SDS-PAGE. Para ello las tiras fueron introducidas durante 10 minutos en una solución de equilibrado con urea (6 M), SDS (2%), Tris-HCl (375 mM, pH 8,8), glicerol (20%), DTT (130 mM) y azul de bromofenol. Posteriormente, las tiras se introdujeron durante otros 10 minutos en la misma solución, pero con iodoacetamida (135 mM). Tras equilibrar las tiras se pasó a realizar la segunda dimensión en geles de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS (SDS-PAGE).

3.2.16 Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas

Los puntos de interés encontrados en los geles fueron extraídos por “*Proteome Works Plus Spot Cutter System*” (Bio-Rad, Hercules, USA) y depositados en placas de 96 pocillos donde fueron digeridos con tripsina usando Digest Pro MS (Intavis AG, Cologne, Alemania).

Luego se realizaron los análisis mediante el espectrofotómetro Autoflex Smartbeam TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania).

La identificación de proteínas se realizó combinando los espectros MS y sus correspondientes MS/MS, recopilados a través del programa Bio Tools 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) y usando MASCOT (Matrix Science, UK) como motor de búsqueda sobre las bases de datos MSDB o NCBI nr.

Todo el proceso se realizó en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas.

3.2.17 Aislamiento de balsas lipídicas

Se utilizaron entre $40\text{-}50 \times 10^6$ células activadas o no con anticuerpos ($10 \mu\text{g/ml}$, durante 15 minutos, 37°C). Después de dos lavados con PBS, las células fueron lisadas en 1 ml de tampón (MES 25 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 0,5%, PMSF 1 mM, Aprotinina $10 \mu\text{g/ml}$, Na_3VO_4 1 mM, pH 6,5). El lisado fue mezclado con igual volumen de sacarosa al 85% en MBS (MES 25 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5) y colocado en un tubo de ultracentrifuga donde se realizó un gradiente con 5 ml de sacarosa al 35% en MBS y 4 ml de sacarosa al 5% en MBS. Se centrifugó el tubo durante 16-19 horas a 4°C y $200.000 \times g$. Después de la centrifugación se recogieron fracciones de 1 ml cada una, empezando desde la parte superior. La fracción insoluble (fracción derivada de las balsas lipídicas) corresponde a las fracciones 3-6 y la fracción soluble (fracción de proteínas no asociadas a balsas lipídicas) en las fracciones 10-12. Se realizó un pool de cada uno de estos dos tipos de fracciones, se precipitaron con acetona fría y se resuspendieron en tampón de muestra para la posterior separación por SDS-PAGE y análisis por “inmunoblot”.

3.2.18 Inmunoprecipitación

El lisado celular (10^7 células/ $20 \mu\text{l}$) fue preaclorado con esferas de inmunoglobulina normal de ratón acoplada a sefarosa, por rotación durante 30 minutos a 4°C . Después de centrifugar 5 minutos a $1000 \times g$, los lisados preaclorados se inmunoprecipitaron durante 1 hora a 4°C con el anticuerpo unido previamente (toda la noche, 4°C) a esferas de sefarosa. Los inmunoprecipitados se lavaron cuatro veces con tampón de lavado y se extrajeron con tampón de muestra para electroforesis.

Para la inmunoprecipitación de las subunidades de PI3-quinasa, se utilizó tampón de lisis CHAPS, proteína A-sefarosa y 5 µg de anticuerpo. Para la inmunoprecipitación con el anticuerpo V5, se utilizó tampón de lisis Tritón, proteína G-sefarosa y 3 µg de anticuerpo.

Para la inmunoprecipitación de ICOS expresado en superficie, células SR.D10 (2×10^7 células/ml) fueron incubadas con anticuerpo anti-ICOS (10 µg/ml) durante 15 minutos y lavadas. Luego fueron tratadas o no con el inhibidor de fosfatasa pervanadato (10 µl de pervanadato/100 µl con 10^7 células) durante 5 minutos a 37°C. Después de la incubación la reacción fue detenida con PBS/EDTA/OV frío (Bello *et al.* 2007). Finalmente las células fueron lisadas en tampón de lisis CHAPS, preaclaradas y precipitadas con proteína A-sefarosa.

3.2.19 Electroforesis SDS-PAGE e “inmunoblot”

Las muestras procedentes de lisados celulares, ensayos de “pull down” o inmunoprecipitados se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 o 12% en presencia de SDS (SDS-PAGE) usando el sistema de electroforesis “mini-PROTEAN3” y/o “mini-PROTEAN-Tetra” (Bio-Rad) y aplicando una corriente constante de 25 mA por gel.

Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF (Inmobilon P, Millipore), empleando cubetas de transferencia Tran-Blot (Bio-Rad), en tampón de transferencia CAPS a una corriente constante de 320 mA durante 1 hora. Las proteínas inmovilizadas en la membrana fueron bloqueadas a temperatura ambiente y agitación con una solución de PBSTL o TBSTL, dependiendo del antígeno a detectar. En los casos en los que se quería detectar motivos fosforilados se añadió ortovanadato de sodio (1 mM final) al tampón TBSTL. Tras dos horas de bloqueo las membranas fueron lavadas 2 veces (15 minutos cada vez) con TBST o PBST y se incubaron durante toda la noche a 4°C y en agitación con el anticuerpo de interés diluido a la concentración adecuada para cada ensayo. Tras lavarse las membranas 4 veces con TBST o PBST se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa (anti-ratón HRPO, anti-conejo HRPO, Proteína A HRPO), diluido en tampón TBSTL o PBSTL. Finalmente, se lavaron las membranas 4 veces con TBST o PBST y se procedió a la detección de la señal por quimioluminiscencia (Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate system, Pierce) y autoradiografía en películas KODAK X-OMAT UV film ó AGFA Curix RP2 Plus Medical X-Ray Film reveladas en un AGFA Curix RP-2. En algunos casos las membranas fueron utilizadas nuevamente, para esto se eliminaron los anticuerpos ya unidos con un tampón reductor (tampón de “stripping”) durante 30 minutos a 56°C.

El análisis densitométrico de las bandas obtenidas fue realizado con el programa Image J (Image J 1.38x; National Institutes of Health).

3.2.20 Tinción de plata

El gel obtenido tras la electroforesis se fijó durante 20 minutos con metanol al 50% y ácido acético al 10% en agua. Después se realizaron dos lavados de 10 minutos cada uno, el primero con una solución de metanol al 50% en agua y el segundo solo con agua. El gel se sensibilizó por incubación de 1 minuto en una solución de tiosulfato sódico al 0,02% y se realizaron dos lavados con agua destilada de un minuto cada uno. Posteriormente, el gel se colocó en una solución de nitrato de plata al 0,1% en agua y se mantuvo a 4°C durante 20 minutos. A continuación se realizaron dos lavados de un minuto cada uno con agua. Por último, el gel se reveló con una solución de carbonato sódico al 2% en formalina (Formaldehído al 35% en agua) al 0,04%. En este paso se sustituyó varias veces la solución por una fresca hasta la aparición de las diferentes bandas proteicas. Finalmente, el gel se fijó utilizando una solución de ácido acético al 5% en agua y se conservó en una solución de ácido acético al 1% y a 4°C (Shevchenko *et al.* 1996).

3.2.21 Obtención y purificación de anticuerpos

Las proteínas de los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas se precipitaron con sulfato amónico al 45% de saturación (27,5 g/100ml) en agitación continua durante 1 hora. Los precipitados se centrifugan (10.000 xg, 10 minutos), el sedimento se resuspende en sulfato amónico al 45% de saturación y se vuelve a centrifugar. El sedimento se resuspende esta vez en un pequeño volumen de agua y se dializa 4 veces frente a PBS. Se centrifuga nuevamente y el sobrenadante se esteriliza por filtración y se almacena a 4°C.

Los anticuerpos monoclonales se purificaron por cromatografía de afinidad con columnas de Proteína A-sefarosa. Una vez equilibrada la columna con tampón de unión se pasa el sobrenadante diluido v:v en tampón de unión, luego se lava la columna con tampón de unión hasta que desciende la absorbancia del eluido. Entonces se extraen los anticuerpos con tampón de elución, el anticuerpo eluido se dializa frente a tres cambios de PBS y se mide la concentración en espectrofotómetro a 280 nm.

Los anticuerpos policlonales de conejo fueron purificados de la misma forma, pero sustituyendo la proteína A-sefarosa por el antígeno correspondiente acoplado a CNBr-sefarosa, y empleando tampón de elución conteniendo 10% de dioxano.

3.2.22 Cuantificación de interleucinas mediante ELISA de captura

Se realizaron ensayos de ELISA con anticuerpos anti-IL-2 de ratón (18161D, captura y 18172D, detección, BD Pharmingen), anti-IL-4 de ratón (11B11, captura; y biotin-BVD6-24G2, detección, BD Biosciences), anti-IL-10 de ratón (JES5-2A5, captura; y biotin-JES5-16E3, detección, BD Pharmingen) y anti-IFN- γ de ratón (R4-6A2, captura y XMG1,4, detección, BD Biosciences) que reconocen epítomos no solapantes en las interleucinas. El anticuerpo de captura (5 μ g/ml en

PBS) fue adsorbido en placas de 96 pocillos (Costar, 3590) durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación se lavaron los pocillos con PBST y se realizó una incubación de 2 horas con una solución bloqueante (PBS/FCS 10%). Se volvieron a lavar 4 veces los pocillos con PBST y se les añadió los sobrenadantes objeto de estudio (50 µl) con diluciones seriadas, y se incluyeron controles negativos y positivos de concentraciones conocidas. Se incubaron las placas durante 16 horas a 4°C, se lavaron nuevamente las placas con PBST y se incubaron con el anticuerpo de detección biotinilado en solución de bloqueo (2 µg/ml, 50 µl/pocillo). Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se realizó de nuevo un lavado. Los complejos formados se detectaron incubando la placa 1 hora a temperatura ambiente con 50 µl/pocillo de estreptavidina-peroxidasa diluida 1/500 en solución de bloqueo. Se hizo el último lavado y se cuantificó la interleucina detectada por colorimetría, utilizando el sustrato de peroxidasa orto-fenilén-diamina (Sigma Fast OPD, 100 µl/pocillo). La reacción se detuvo con H₂SO₄ (3 N, 100 µl/pocillo) y mediante espectrometría se midió la densidad óptica de la placa a 492 nm. Los datos de densidad óptica obtenidos para la muestras se interpolaron con los datos obtenidos de las curvas patrón. Las diluciones se hicieron por triplicado. Los resultados son la media de la concentración de interleucina deducida de la titulación de cada sobrenadante.

3.2.23 qRT-PCR

Extracción de ARN

Para llevar a cabo la extracción de ARN se utilizó el “*mirVana™ miRNA Isolation Kit*” (Ambion, Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Síntesis de ADN

Se utilizó el kit “*ThermoScript™ RT-PCR System*” (Invitrogen), mediante el cual se amplifica una primera hebra de ADNc a partir de ARN total. El protocolo consistió en mezclar 200 ng de ARN con 1 µl (50 ng) de cebador “random hexamers”, 2 µl de mezcla de dNTPs (10 mM) y agua libre de RNasa hasta un volumen de 12 µl. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 65°C y un minuto en hielo; paralelamente se realizó la mezcla de reacción para la síntesis de ADNc que incluye, por cada reacción, 4 µl de *RT buffer* 5x, 1 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de *RnasaOUT™*, 1 µl de *ThermoScript™* y 1 µl de agua libre de RNasa. Se añadieron 8 µl de la mezcla a cada tubo de ARN/*primer*/dNTP y se programó el termociclador con la siguiente secuencia: 25°C 10 minutos, 50°C 30 minutos, 85°C 5 minutos. Finalmente se añadió 1 µl de *RNasa H* a cada tubo y se incubó por 20 minutos a 37°C.

Una vez obtenido el ADNc y comprobada su integridad, se amplificó mediante PCR a tiempo real, utilizando las parejas de cebadores, correspondientes a los genes codificadores de β-Actina, p85α, p85β, p110α, p110β, p110γ y p110δ.

Los cebadores utilizados fueron:

Actina de ratón
CTAAGGCCAACCGTGAAAAG (Sentido)
ACCAGAGGCATACAGGGACA (Antisentido)
PI3-cinasa p85α
GAATGTTGACTCTATACAGAACACAA (Sentido)
CATCTCCAAGTCCACTGACG (Antisentido)
PI3-cinasa p85β
CCCTTGGATGGATCTTCTGA (Sentido)
GGGTCAGGTGGGGAGAAC (Antisentido)
PI3-cinasa p110α
GACAAGAACAAGGGCGAGAT (Sentido)
CAGTACCCAGCGCAGGAC (Antisentido)
PI3-cinasa p110β
AGAAGCTGGCTTGGACCTG (Sentido)
CAGAGCGATCTCCTGTTGCT (Antisentido)
PI3-cinasa p110γ
AACAATCTCCGCCACAA (Sentido)
CACTCCAGACTTTCCTTTATCTTCTT (Antisentido)
PI3-cinasa p110δ
AGCTGCTCCAAAGATATCCAGT (Sentido)
TGCTTTAGCGCCTCTTCCT (Antisentido)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el *LightCycler* (Roche), en una mezcla de reacción de 2 μ l de ADNc, 2 μ l de *LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I* (Roche), cebadores (500 nM), MgCl₂ (1 mM) y agua hasta completar 20 μ l. Para cada muestra se realizaron tres replicas técnicas.

Los datos obtenidos se analizaron por el método comparativo CT ("cycle threshold") con un software versión *lightcycler* (Roche Diagnostics Inc.) y normalizado con controles normales de β -actina de ratón.

3.2.24 Clonación de las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ de PI3-cinasa

El ARN total de las células fue extraído y utilizado como molde para obtener ADNc con el kit “*ThermoScript™ RT-PCR System*” (Invitrogen), como se describió anteriormente, pero con 1 μ l de cebador Oligo (dT)₂₀ 50 μ M.

PCR

Las secuencias de DNA codificantes de p110 α y p110 δ de ratón se clonaron a partir del producto de PCR. Los cebadores utilizados para la amplificación de un producto de tamaño aproximado a 3180 pares de bases fueron los siguientes:

PI3-cinasa p110 α	
5´	ATGCCTCCACGACCATCTTCG 3´ (Sentido)
5´	GGAGTTCAAAGCATGCTGCTT 3´ (Antisentido)
PI3-cinasa p110 δ	
5´	ATGCCCCCTGGGGTGGACT 3´ (Sentido)
5´	GGACTGTCGGTTATCCTTGGACAC 3´ (Antisentido)

La solución de PCR contiene ADNc (70 ng), buffer 10x, dNTPs (250 μ M), MgCl (2,5 μ M), cebadores (100 ng), Taq polimerasa (2 U, Invitrogen) y agua hasta completar el volumen de reacción a 50 μ l. Los ciclos fueron: uno de desnaturalización inicial de 94°C durante dos minutos y posteriormente 30 ciclos con 94°C 1 minuto, 65°C 1 minuto, 68°C 2 minutos, y una extensión final a 68°C durante diez minutos.

Electroforesis en gel de agarosa

Antes de clonar, los productos obtenidos por PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0,7% en tampón TAE 1x. Se utilizó un marcador de DNA (Lambda DNA/Hind III Markers, Promega) como marcador del tamaño de las bandas. Para cada muestra se cargaron 5 μ l de producto de PCR y 1 μ l de *Buffer de carga* 6x (Blue orange 6x Loading Dye, Promega). A continuación se procedió a la separación por electroforesis (BioRad Power Pak 3000) durante 30 min a 90 V. La banda de ADN se visualizó en transiluminador GEL DOC XR, Bio-Rad) utilizando el programa “Quantity One” de Bio- Rad.

Clonaje del producto de PCR

El kit utilizado para la clonación fue el *pcDNA 3.1/V5-His TOPO TA* (Invitrogen). Se mezcló el plásmido pcDNA3.1/V5-His TOPO, con el producto de PCR directamente y una solución salina suministrada en el kit siguiendo las recomendaciones del fabricante. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Transformación de bacterias competentes

Se realizó la transformación de bacterias competentes TOP10 (Invitrogen, EE.UU.) mediante choque térmico. Para ello, se descongelaron las bacterias en hielo, se añadió la mezcla de clonación (4 μ l) y se incubó durante 20 minutos en hielo. Seguidamente se mantuvieron 30 segundos a 42°C e inmediatamente después, se pasaron a hielo durante 2 minutos. Tras añadir a las bacterias el medio SOC, éstas se incubaron 1 hora a 37°C en agitación. A continuación se sembraron en placas de LB con ampicilina (50 μ g/ml) (Sigma) y se incubaron durante 18 horas en una estufa a 37°C.

Selección de colonias

Para seleccionar las bacterias que contenían el vector con el inserto correctamente orientado, se aislaron varias colonias resultantes de la transformación por extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina estándar de “minipreps” (*High Pure Plasmid Isolation kit*, Roche Diagnostics), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. A partir de cultivos de bacterias de 4 ml en LB con 50 μ g/ml de ampicilina se obtuvieron 80 μ l de plásmido a una concentración de 200 μ g/ml.

Se realizó análisis de restricción para definir la lectura del inserto clonado. Las construcciones cuyo patrón de digestión coincidía con el deseado fueron analizadas por secuenciación en Secugen S.L. (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid) con el fin de analizar la presencia de mutaciones. Debido al gran tamaño de esta proteína (3180 pb), no puede ser determinada la secuencia completa de nucleótidos en un solo proceso de secuenciación ya que habitualmente se tienen lecturas de hasta 900 pb. Por esto se realizaron dos secuenciaciones parciales, la primera con los cebadores T7 y BGH reverse, los cuales hibridan en el vector a ambos lados del sitio de clonaje y la segunda secuenciación con cebadores diseñados a partir del fin de la primera secuenciación:

PI3-cinasa p110α	
5´	CCAACCTTGATGCTGATGGCCAA 3´ (Sentido)
5´	TCCATGATTCGGATGATCTGAA 3´ (Antisentido)
PI3-cinasa p110δ	
5´	CTCATCTGACCATGGTCCACTC 3´ (Sentido)
5´	AGGCAGCCGTAGGGCGTCAT 3´ (Antisentido)

Las construcciones clonadas correctamente (pcDNA3.1/V5-His/TOPO/p110 α , pcDNA3.1/V5-His/TOPO/p110 δ) se purificaron usando el sistema *Plasmid Purification MAXI kit JET star* (GENOMED Genycell Biotech España SL) y el protocolo descrito en el kit.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 SEÑALES MEDIADAS POR ICOS: PROTEÍNAS ASOCIADAS AL DOMINIO CITOPLASMÁTICO DE ICOS

4.1.1 Identificación de moléculas asociadas a motivos YMxM: Unión de PI3-cinasa de clase IA al péptido de ICOS pYMFM

ICOS y CD28, actúan como moléculas de señalización intracelular en linfocitos T, con semejanzas estructurales y funcionales.

CD28 posee el motivo YMNM en su región citoplasmática, que tras su fosforilación se une e induce la activación de PI3-cinasa. ICOS presenta un motivo similar YMFM (residuos 181-184) adecuado para la unión a la subunidad reguladora p85 de PI3-cinasa.

Con el fin de identificar las proteínas que se unen a este motivo de ICOS de ratón, se sintetizaron péptidos biotinilados de 29 residuos correspondientes a los residuos Gly171 a Thr199 de la secuencia de ICOS de ratón, fosforilados en el residuo Tyr181 del motivo YMFM (ICOS pTir), o no fosforilados (ICOS). Estos péptidos, una vez unidos a esferas de estreptavidina sefarosa, se utilizaron en ensayos de “pull down”. Para ello fueron incubados con lisados celulares de líneas de linfocitos T CD4⁺ (SRD10, un mutante ICOS⁻ de SR.D10 (H4⁻A5)) o de linfocitos T CD4⁺ normales de bazo de ratón, y las proteínas asociadas fueron separadas e identificadas por métodos proteómicos estándar (Figura 9, Tabla 1).

Se detectaron en los ensayos de “pull-down” diferentes subunidades de PI3-cinasa de clase IA unidas al péptido de ICOS fosforilado en el residuo de tirosina 181, en la tabla 1 se muestran las diferentes subunidades detectadas, entre ellas están la subunidad catalítica p110 α y tres subunidades reguladoras (p85 α , p85 β y p50-55 α). En los tres tipos celulares examinados se encontraron resultados similares.

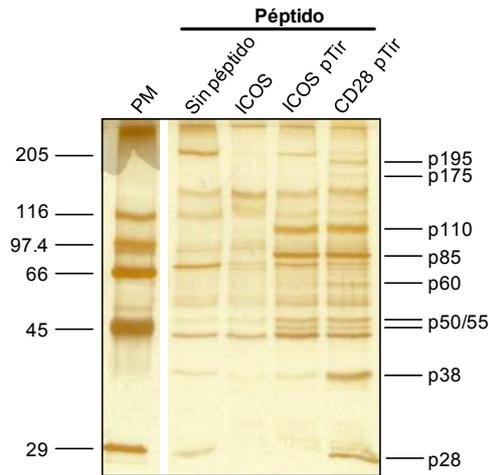


Figura 9. Separación de proteínas asociadas a péptidos de ICOS y CD28 por ensayos de “pull down”.

Separación por SDS-PAGE y posterior tinción de plata de las proteínas asociadas a péptidos obtenidas por ensayos de “pull down”. Péptido de ICOS no fosforilado (ICOS), péptido de ICOS fosforilado (ICOS pTir) y péptido de CD28 fosforilado (CD28 pTir).

Tabla 1. Proteínas unidas al péptido de ICOS fosforilado en ensayos de “pull-down”.

Peso molecular aparente (kDa)	Proteína	Número de acceso	Mascot Score
110	Subunidad catalítica de PI3-cinasa, p110 α	gi 6679317	152
85	Subunidad reguladora de PI3-cinasa, p85 α	gi 129388	164
83	Subunidad reguladora de PI3-cinasa, polipéptido 2, p85b	gi 6679321	164
55	Subunidad reguladora de PI3-cinasa, polipéptido 1, isoforma 1, p55 α	gi 68299809	151
50	Subunidad reguladora de PI3-cinasa, polipéptido 1, isoforma 1, p55 α	gi 68299809	209

La abundancia de las subunidades de PI3-cinasa asociada a péptidos fosforilados de ICOS, fue comparada con la abundancia de cada subunidad en los diferentes tipos celulares, determinada por medio de qRT-PCR (Figura 10).

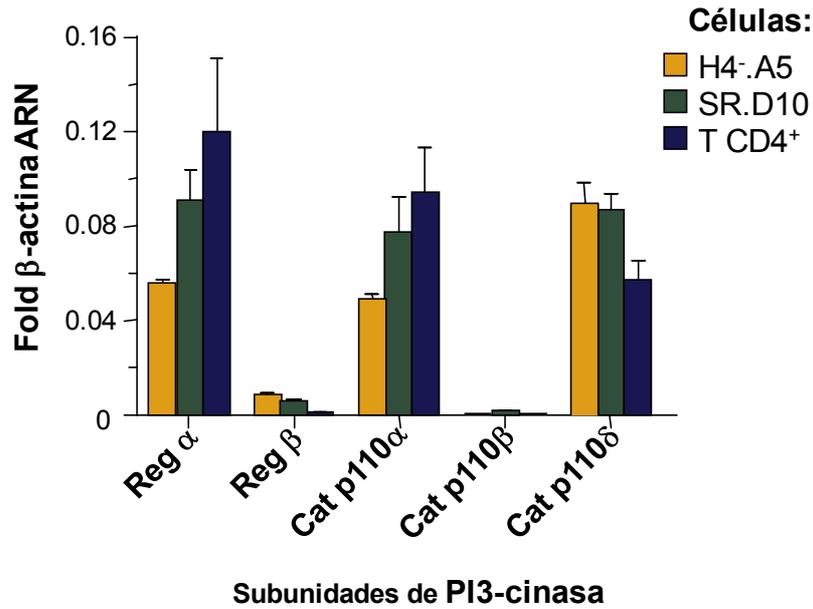


Figura 10. Abundancia de las subunidades de PI3-cinasa de clase IA en diferentes tipos de células T CD4⁺ de ratón.

Niveles relativos de ARNm de las subunidades reguladoras (Reg α; Reg β) y las subunidades catalíticas (Cat p110α; Cat p110β; Cat p110δ) de PI3-cinasa, mediante qRT-PCR de las líneas celulares de linfocitos T CD4⁺ SR.D10 y H4.A5, y en linfocitos T CD4⁺ de bazo de ratón. Media ± E.S de triplicados de un experimento representativo realizado tres veces.

Los resultados obtenidos muestran que el ARNm de la subunidad reguladora α es más abundante en todos los tipos celulares, en comparación con la subunidad reguladora β; los oligonucleótidos empleados para la qRT-PCR no diferencian entre las isoformas de la subunidad reguladora α, por esto no es posible comparar el ARNm en los diferentes tipos celulares con los resultados obtenidos en los ensayos de “pull-down” para las isoformas de las subunidades reguladoras p50-55α que representan cerca de un 30%. Las subunidades catalíticas p110α y p110δ son más abundantes en los tres tipos celulares en comparación con la subunidad p110β.

Para ampliar el análisis de las proteínas asociadas a los péptidos de ICOS por ensayos de “pull-down”, se hicieron “immunoblots”, con anticuerpos específicos para cada subunidad de PI3-cinasa (Figura 11).

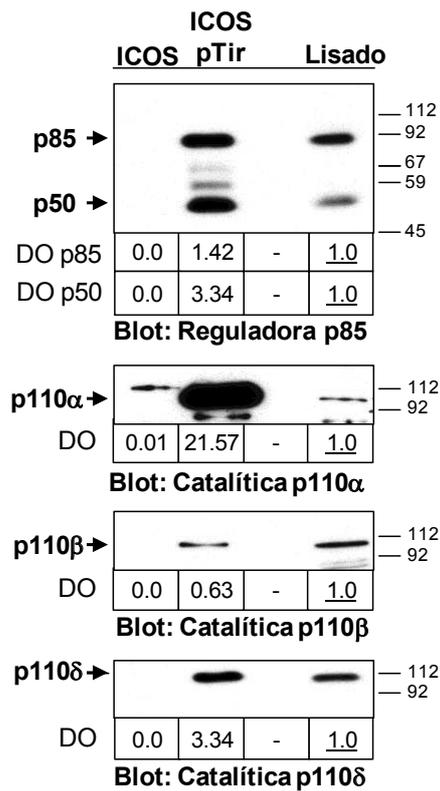


Figura 11. Abundancia relativa de las subunidades de PI3-cinasa de clase IA en ensayos de “pull-down” con péptidos de ICOS.

Comparación de la abundancia relativa de las subunidades reguladoras (p85 α ; p50-55 α) y las subunidades catalíticas (Cat p110 α ; Cat p110 β ; Cat p110 δ) de PI3-cinasa en lisados de células H4.A5 o en “pull-down” con péptidos de ICOS fosforilados (ICOS pTir) o no (ICOS), mediante “inmunoblot”. Los datos son representativos de un experimento realizado 5 veces. El valor de la DO de las diferentes subunidades de PI3-cinasa tiene como referencia la DO del lisado que es igual a 1.

El anticuerpo utilizado para detectar la subunidad reguladora distinguía las diferentes isoformas de la subunidad reguladora α de PI3-cinasa (p85 α , p50-55 α). También se utilizaron anticuerpos específicos para las subunidades catalíticas de PI3-cinasa p110 α , p110 β y p110 δ . Se comparó la densidad óptica (DO) de cada banda, con la correspondiente a la DO del lisado (tomando como referencia la DO del lisado =1).

Según estos resultados las isoformas p50-55 α de la subunidad reguladora se unen preferencialmente a los péptidos fosforilados (ICOS pTir).

Trabajos anteriores han demostrado que la subunidad catalítica p110 δ se expresa exclusivamente en leucocitos (Vanhaesebroeck *et al.* 1997), pero en nuestros estudios de proteómica sólo se había detectado la subunidad catalítica p110 α unida a los péptidos de ICOS fosforilados (Tabla 1). Sin embargo, los niveles de ARNm de las subunidades p110 α y p110 δ en los diferentes tipos de linfocitos T analizados fueron muy similares (Figura 10), por lo que teóricamente había una posibilidad alta de encontrar no solo subunidades p110 α sino también

p110 δ en los ensayos de “pull-down” con los péptidos. Por tal razón se realizaron ensayos de “inmunoblot” de las proteínas obtenidas mediante “pull-down”, utilizando anticuerpos específicos para cada subunidad catalítica de PI3-cinasa (Figura 11). Al comparar la DO de los lisados con lo esperado de acuerdo con los datos de qRT-PCR, se observó que los anticuerpos frente a p110 β y p110 δ eran mejores que el anticuerpo policlonal y monoclonal de p110 α en cuanto al tiempo necesario para detectar las proteínas en los lisados. Para compensar estas diferencias utilizamos el valor de la DO correspondiente a los lisados como referencia para los valores de la DO en el ensayo de “pull-down”. Una vez corregidos los datos con esta referencia, se observó que el péptido de ICOS pTir co-precipita niveles más altos de la subunidad p110 α que de las subunidades p110 β y p110 δ . Los bajos niveles de p110 β se esperaban por los resultados de qRT-PCR, pero no así los bajos niveles de p110 δ .

Se sintetizaron péptidos más cortos (18 residuos, Val174 a Lys191), fosforilados en el residuo de tirosina del motivo YMF α (sICOS pTir) y un péptido de CD28 (29 residuos, Arg183 a Arg211) fosforilado en el residuo de tirosina equivalente (CD28 pTir), para compararlos con el péptido ICOS pTir y determinar si las diferencias en la asociación de las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ era debido a alguna secuencia específica del péptido empleado. Con las proteínas unidas a dichos péptidos (ICOS, ICOS pTir, sICOS pTir, CD28 pTir) por ensayos de “pull-down”, se hicieron “inmunoblot” con anticuerpos específicos para cada subunidad de PI3-cinasa (Figura 12).

Al comparar la DO de cada uno de los péptidos fosforilados con la DO del lisado, se demostró que la subunidad catalítica p110 α presenta una mayor unión a los péptidos fosforilados de ICOS, estos resultados son similares a los obtenidos anteriormente.

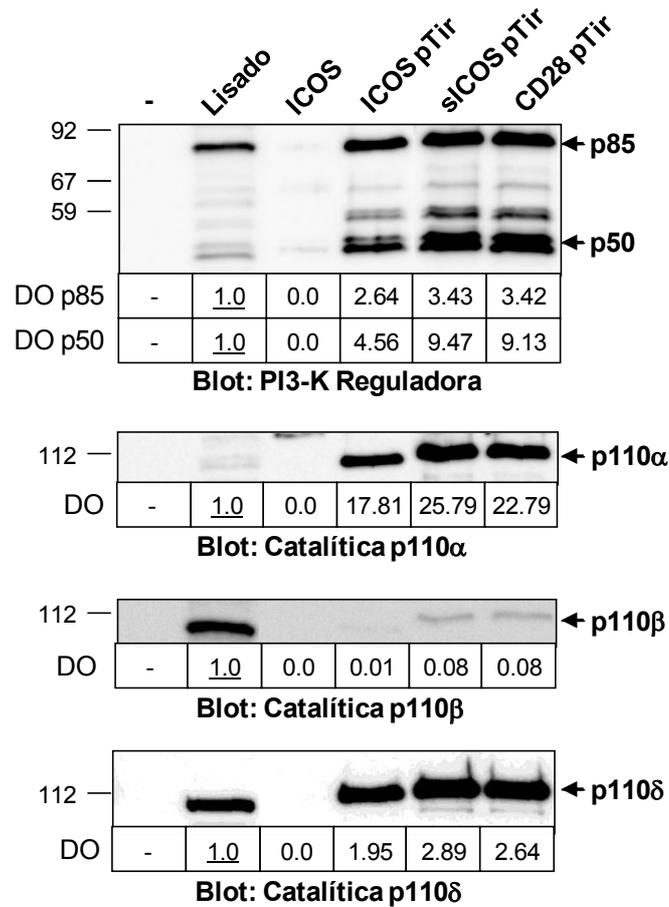


Figura 12. Comparación de las subunidades de PI3-cinasa de clase IA asociadas a péptidos fosforilados (ICOS pTir, sICOS pTir) o no fosforilados (ICOS) y a un péptido de CD28 fosforilado (CD28 pTir) por ensayos de “pull-down”.

Comparación de la abundancia relativa de las subunidades reguladoras (p85 α ; p50-55 α) y las subunidades catalíticas (Cat p110 α ; Cat p110 β ; Cat p110 δ) de PI3-cinasa en lisados de células SR.D10 o en “pull-down”, mediante “immunoblot”. Los datos son representativos de un experimento realizado 3 veces. El valor de la DO de las diferentes subunidades de PI3-cinasa tiene como referencia la DO del lisado que hacemos igual a 1.

4.1.2 Abundancia relativa de las subunidades de PI3-cinasa de clase IA en inmunoprecipitados de ICOS

Quisimos determinar si la asociación selectiva entre las subunidades catalíticas de PI3-cinasa y los péptidos de ICOS pTir encontrada en los ensayos de “pull-down” también se observaba en la molécula de ICOS expresada en la superficie de las células T. Para ello se trató la línea de linfocitos T SR.D10 con un inhibidor de fosfatasa (pervanadato) durante 5 minutos para fosforilar eficientemente todas las moléculas susceptibles, incluyendo ICOS (Figura 13 a). A

continuación se inmunoprecipitaron específicamente las moléculas de ICOS presentes en la superficie celular y se analizaron por “inmunoblot” las isoformas de PI3-cinasa asociadas a ICOS. Se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en ensayos de “pull-down” con péptidos, encontrándose una mayor co-precipitación relativa de la subunidad catalítica p110 α con ICOS, al compararla con p110 δ , basada en la abundancia relativa en los lisados. También se pudo observar que las subunidades reguladoras p50-55 α co-precipitan preferentemente con ICOS (Figura 13 b), un fenómeno que también se observó en los ensayos de “pull-down” (ver figura 11, panel superior).

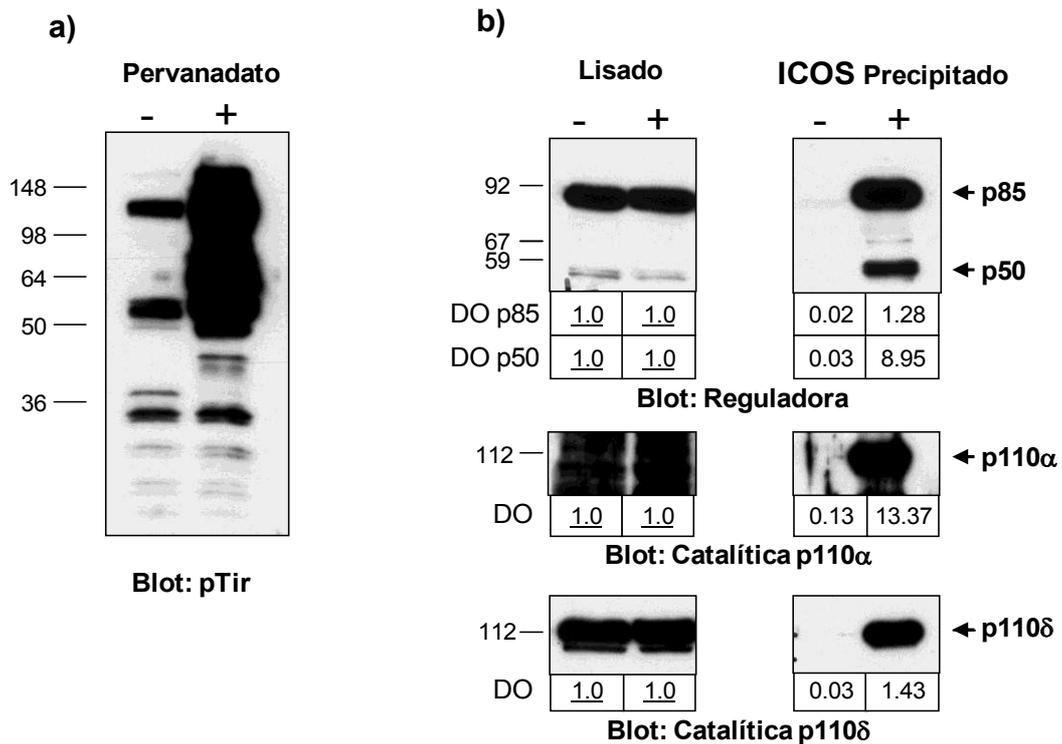


Figura 13. Asociación de las subunidades de PI3-cinasa a inmunoprecipitados de ICOS expresado en la superficie celular antes y después de la inducción de la fosforilación de proteínas intracelulares con pervanadato.

a) Comparación de la fosforilación en tirosinas de lisados de células SR.D10 tratadas (+) o no tratadas (-) con pervanadato 5 min, determinado por “inmunoblot” con anticuerpo anti-fosfotirosina. **b)** Co-precipitación de las subunidades de PI3-cinasa de clase IA en inmunoprecipitados con ICOS, en células SR.D10 tratadas (+) o no (-) con pervanadato 5 min, determinada por “inmunoblot” con anticuerpos específicos para cada subunidad. Los datos son representativos de un experimento realizado 4 veces. El valor de la DO de las diferentes subunidades de PI3-cinasa tiene como referencia la DO del lisado que se hace igual a 1.

4.1.3 La unión diferencial de las subunidades catalíticas de PI3-cinasa a ICOS refleja las diferencias en la unión de estas subunidades a la subunidad reguladora

Con los resultados obtenidos se ha demostrado una mayor asociación de la subunidad catalítica de PI3-cinasa p110 α a los péptidos de ICOSpTir (“pull-down”) y a inmunoprecipitados de ICOS nativo fosforilado; tal vez porque existe una unión preferencial de esta subunidad con la subunidad reguladora de PI3-cinasa. Para comprobar esta hipótesis se hicieron inmunoprecipitaciones de la subunidad reguladora alfa (p85 α , p50-55 α) a partir de lisados de células SR.D10 y se encontró que, efectivamente, la subunidad catalítica p110 α co-precipita mejor con la subunidad reguladora que la subunidad p110 δ (Figura 14 a).

Para comprobar que no era un fenómeno peculiar de una línea de células mantenida en cultivo también se realizaron ensayos con linfocitos T CD4 $^{+}$ aislados de bazo, y con blastos de linfocitos T CD4 $^{+}$ (Figura 14 b). Se encontró que al igual que en las células SR.D10, la subunidad catalítica p110 α tiene una unión preferencial a la subunidad reguladora en estas células. La subunidad catalítica p110 δ es fácilmente detectable en los lisados celulares a diferencia de la subunidad p110 α , demostrando el alto nivel de co-precipitación de p110 α ; estas diferencias se observan de igual modo realizando “inmunoblot” con anticuerpos anti-p110 α policlonales (Figura 14) o monoclonales (Figura 19).

Curiosamente, se detectaron bajos niveles de la subunidad reguladora p50-55 α de PI3-cinasa en blastos de linfocitos T CD4 $^{+}$ en comparación con linfocitos T CD4 $^{+}$ sin activar (Figura 14 c), a pesar de esto la asociación preferencial de la subunidad catalítica p110 α a la subunidad reguladora se mantuvo.

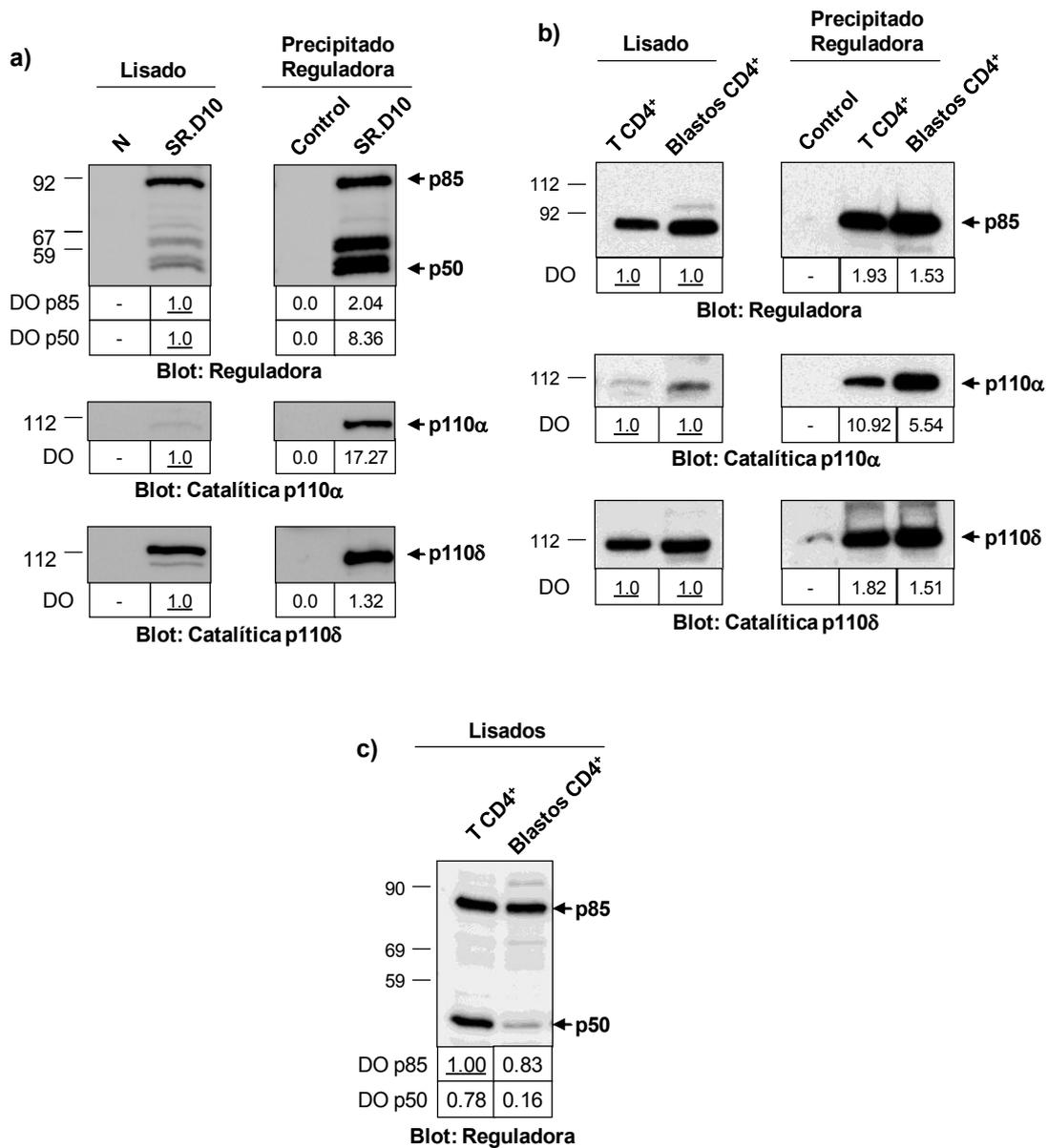


Figura 14. Abundancia de las subunidades catalíticas de PI3-cinasa de clase IA en inmunoprecipitados de la subunidad reguladora alfa comparado con la abundancia en linfocitos T. **a)** Lisados de células SR.D10. **b)** Lisados de linfocitos T CD4⁺ de bazo y blastos de linfocitos T CD4⁺; determinado por “inmunoblot” con anticuerpos específicos para cada subunidad. **c)** Bajos niveles de la subunidad reguladora p50-55 α en blastos de linfocitos T CD4⁺ en comparación con linfocitos T CD4⁺ sin activar. El inmunoprecipitado control (Control) se llevó a cabo con tampón de lisis en lugar de lisado. Los datos son representativos de un experimento realizado 3 veces. El valor de la DO de las diferentes subunidades de PI3-cinasa tiene como referencia la DO del lisado que es igual a 1.

Las diferencias en la asociación de las subunidades catalíticas a la subunidad reguladora pueden ser debidas a diversos factores. En primer lugar, podría haber bajos niveles de proteína

p110 δ a pesar de los resultados de la qRT-PCR, que indicaban niveles de ARNm similares de las dos subunidades p110 α y p110 δ . En segundo lugar, quizás la asociación de p110 δ es más lábil, por lo que una fracción de p110 δ podría actuar de manera independiente de la subunidad reguladora, y por esto no co-precipita con ella. Para despejar algunas de estas dudas, se comparó la presencia o no de p110 δ residual en lisados de células SR.D10 sometidos a tres inmunoprecipitaciones sucesivas (1, 2, 3) con anticuerpos específicos frente a la subunidad reguladora (para eliminar estas subunidades) o con anticuerpos frente a una proteína no relacionada (ZAP-70; C) empleados como control (Figura 15 a).

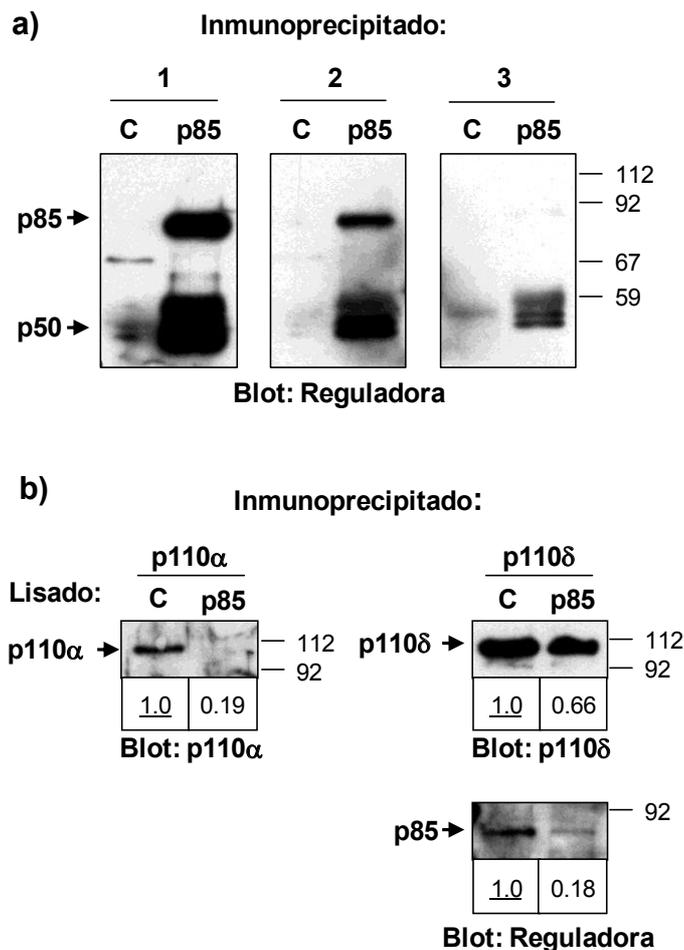


Figura 15. La depleción eficiente de la subunidad reguladora de PI3-cinasa elimina la subunidad catalítica p110 α , pero no p110 δ en células SR.D10.

a) Lisado de células SR.D10 sometido a tres inmunoprecipitaciones sucesivas con anticuerpo control (anti-ZAP70; C) o con anticuerpos específicos para la subunidad reguladora (p85) para eliminarla de los lisados. **b)** Lisados control (C) o lisados a los que se ha eliminado la subunidad reguladora (p85), fueron divididos e inmunoprecipitados con anticuerpos específicos para p110 α y p110 δ . Los datos son representativos de un experimento realizado 3 veces. El valor de la DO de las diferentes subunidades de PI3-cinasa tiene como referencia la DO del lisado que es igual a 1.

Como se observa en la figura 15, las inmunoprecipitaciones sucesivas con anticuerpos frente a la subunidad reguladora son efectivas en su eliminación, ya que en la tercera inmunoprecipitación la presencia de esta subunidad es residual en comparación con la primera inmunoprecipitación. Los lisados obtenidos tras la depleción fueron divididos e inmunoprecipitados con anticuerpos específicos para las subunidades catalíticas α y δ (Figura 15 b). Los bajos niveles de p110 α detectados tras la depleción indican que gran parte de la subunidad catalítica p110 α se elimina junto con la subunidad reguladora, mientras que una fracción apreciable de p110 δ es fácilmente inmunoprecipitable, pero apenas tiene asociadas subunidades reguladoras.

También analizamos si la unión preferencial de p110 α a la subunidad reguladora se mantiene cuando las células expresan las proteínas p110 α y p110 δ de manera exógena y con un epítipo marcador asociado. De este modo se eliminan posibles diferencias en los niveles endógenos y sobre todo, en la calidad de los anticuerpos frente a cada subunidad. Para esto se clonaron las subunidades catalíticas de p110 α y p110 δ en el vector pcDNA 3.1/V5-His Topo y se transfectaron células COS-7. Los lisados celulares de las células transfectadas se inmunoprecipitaron con anticuerpos frente a la subunidad reguladora p85 (Figura 16) y frente al epítipo V5 (Figura 17). Finalmente se analizó por “inmunoblot” y con anticuerpos anti-V5, anti-p85, anti-p110 α y anti-p110 δ la abundancia de las subunidades en los lisados inmunoprecipitados. La inmunoprecipitación con p85 y posterior “inmunoblot” con anti-p85 indica un ligero aumento en la abundancia de la subunidad reguladora en las células transfectadas con pcDNA 3.1/V5-His p110 δ (Figura 16), a pesar de esto al hacer el “inmunoblot” con anti-V5 se observa una mayor abundancia relativa de la subunidad catalítica exógena p110 α a la subunidad reguladora p85, al comparar la DO de cada banda, con la correspondiente al lisado (tomando como referencia la DO del lisado =1) (Figura 16). En el “inmunoblot” para p110 α y p110 δ se observan dos bandas muy cercanas correspondientes a la subunidad catalítica endógena y a la exógena (mayor peso).

En la inmunoprecipitación con anti-V5 y el “inmunoblot con anti-p85 se observa un pequeño aumento no significativo en la abundancia de la subunidad reguladora en las células transfectadas con pcDNA 3.1/V5-His p110 α . Al comparar la DO del precipitado con la DO del lisado se observa una mayor precipitación de la subunidad catalítica p110 α exógena en comparación con p110 δ . En el “inmunoblot” para p110 α y p110 δ se observa en los precipitados una banda de mayor peso correspondiente a la subunidad catalítica exógena (Figura 17). En conjunto, estos resultados sugieren que en la precipitación de las subunidades catalíticas no es evidente la diferencia en la asociación p85/p110 α y p85/p110 δ que sí se observa al analizar los precipitados o los “pull down” con subunidades reguladoras p85.

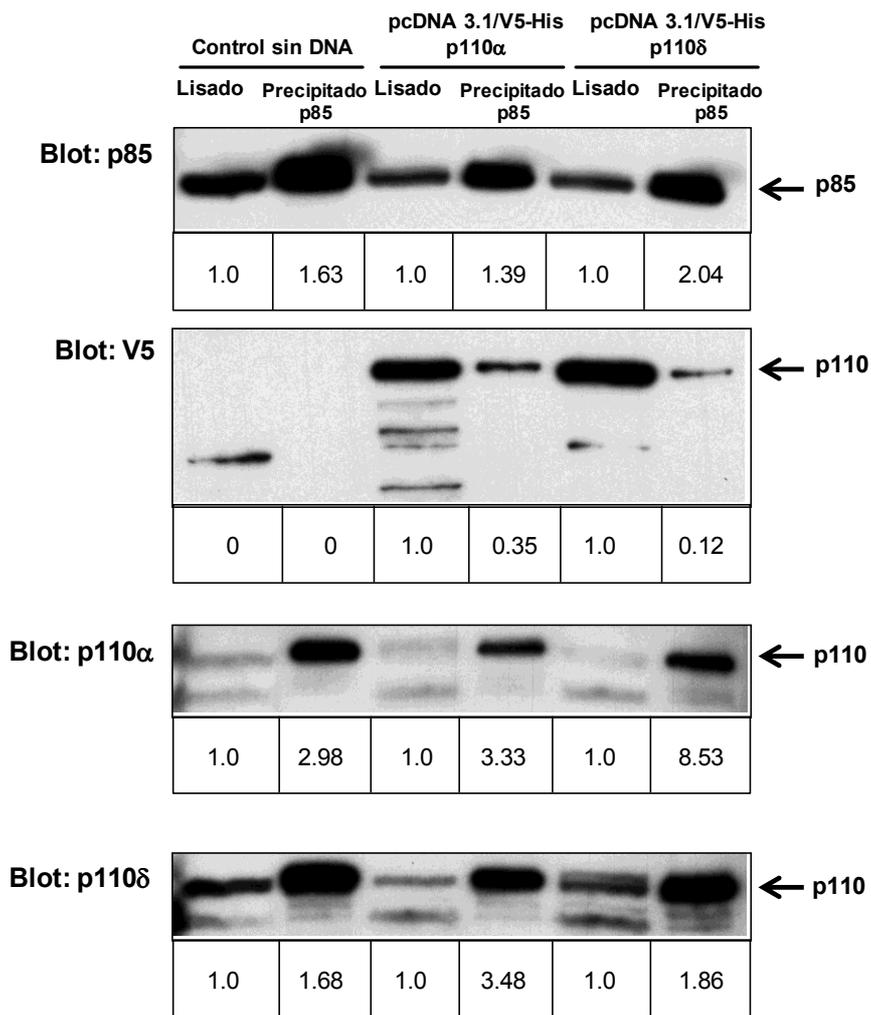


Figura 16. Abundancia de las subunidades catalíticas de PI3-cinasa de clase IA exógena en inmunoprecipitados de la subunidad reguladora alfa.

Células COS-7 fueron transfectadas con 40 μ g de pcDNA 3.1/V5-His p110 α , pcDNA 3.1/V5-His p110 δ y células COS-7 transfectadas sin ADN. Los lisados fueron inmunoprecipitados con anticuerpos frente a la subunidad reguladora y luego analizados por "inmunoblot" con anticuerpos específicos frente a cada subunidad y frente al epítipo V5, presente en el vector de clonación. El valor de la DO de las diferentes subunidades de PI3-cinasa tiene como referencia la DO del lisado que es igual a 1.

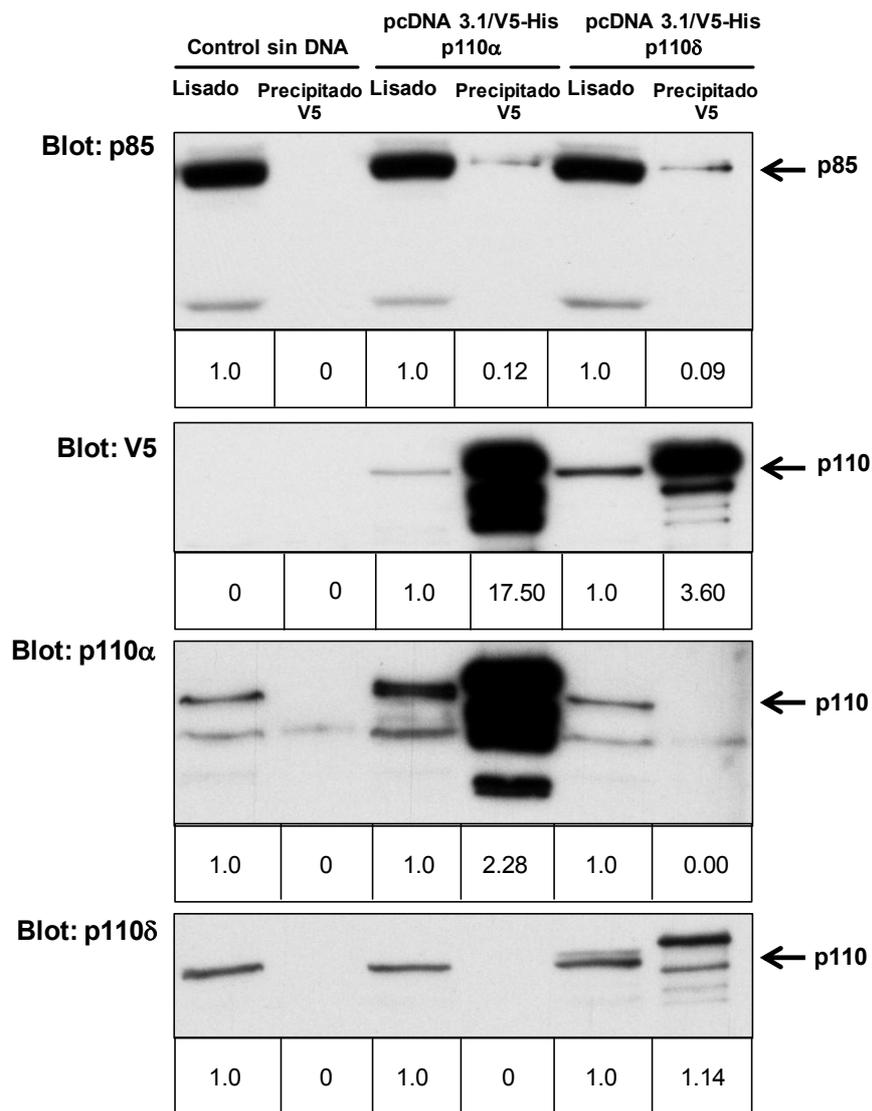


Figura 17. Abundancia de las subunidades catalíticas de PI3-kinasa de clase IA exógena en inmunoprecipitados del epítoto V5 presente en el vector de clonación.

Células COS-7 fueron transfectadas con 40 μ g de pcDNA 3.1/V5-His p110 α , pcDNA 3.1/V5-His p110 δ y células COS-7 transfectadas sin ADN. Los lisados fueron inmunoprecipitados con anticuerpo anti-V5 y luego analizados por "inmunoblot" con anticuerpos específicos frente a cada subunidad de PI3-kinasa y frente al epítoto V5. El valor de la DO de las diferentes subunidades de PI3-kinasa tiene como referencia la DO del lisado que es igual a 1.

4.2 IMPORTANCIA DE LAS SUBUNIDADES CATALÍTICAS DE PI3-CINASA DE CLASE IA EN LA ESTIMULACIÓN Y COESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS T

4.2.1 Efecto del silenciamiento (siARN) de las subunidades catalíticas de PI3-cinasa de clase IA en la estimulación y la coestimulación por ICOS

Para conocer el papel funcional que desempeñan las subunidades catalíticas de PI3-cinasa (p110 α , p110 δ) se evaluó el efecto que tiene el silenciamiento específico con siARN y el uso de inhibidores específicos de isoformas en la activación de TCR y la coestimulación con ICOS. Para esto, células SR.D10 fueron tratadas con siARN específicos para p110 α y con siARN control, y el silenciamiento fue seguido por "inmunoblot" con anticuerpos específicos para cada subunidad. Las células transfectadas con siARN para p110 α , presentaron una clara inhibición en los niveles de p110 α , al compararlas con las células transfectadas con el siARN control (C); los niveles de p110 β cambiaron significativamente, para compensar la pérdida de p110 α mientras que los niveles de p110 δ no cambiaron (Figura 18 a). Después de comprobar el silenciamiento de la subunidad, se estudio el efecto de este en señales tempranas como Akt y Erk, blanco en la coestimulación por ICOS. Para esto, las células fueron activadas durante diez minutos con anticuerpo anti-CD3, o con anti-CD3 mas anti-ICOS, o sin activar (N) (Figura 18 b). Estos resultados demuestran que el silenciamiento de p110 α inhibe la fosforilación temprana de Akt, inducida por anti-CD3/anti-ICOS, confirmando la importancia de p110 α en la coestimulación. La fosforilación de Erk no se vio inhibida, por el contrario se observó un incremento al silenciar p110 α ; estos datos son exclusivos de Erk, porque la fosforilación de otras cinasas como p38 también fue inhibida.

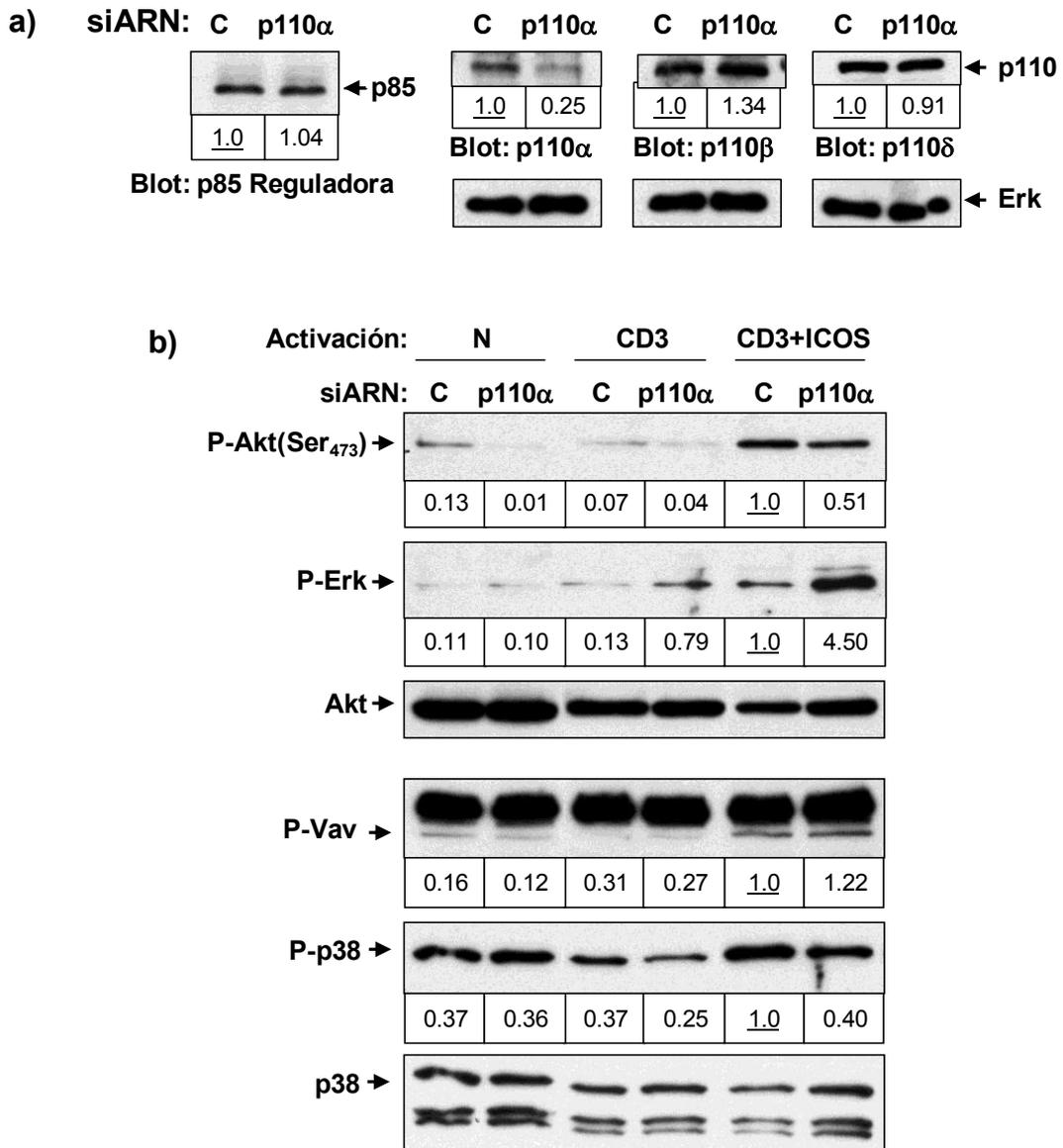


Figura 18. Efecto del silenciamiento de la subunidad catalítica p110 α de PI3-cinasa en la coestimulación por ICOS.

a) Lisado de células SR.D10 transfectadas con siARN control (C) o siARN específico para p110 α , probadas por "inmunoblot" con anticuerpos específicos para cada subunidad. La DO del lisado celular control fue tomada como referencia, con un valor igual a 1. Los datos son representativos de un experimento realizado dos veces. **b)** Células SR.D10 transfectadas con siARN control o siARN de p110 α , fueron activadas 10 min a 37°C con esferas de poliestireno recubiertas con anti-CD3 (0,5 μ g/ml) (CD3) o anti-CD3 más anti-ICOS (5 μ g/ml) (CD3+ICOS) o sin activar (N). Las células fueron lisadas y se realizó "inmunoblot" con anticuerpos específicos para Akt fosforilado (P-Akt Ser473) o Erk fosforilado (P-Erk). La carga de las proteínas fue corregida usando anticuerpo anti-Akt como referencia.

Las células SR.D10 con siARN para p110 α (p110 α) o con siARN control (C), fueron tratadas (+) o no (-) con pervanadato durante 5 min (Figura 19 a), permitiendo la fosforilación de algunos sustratos como ICOS, que posteriormente fueron inmunoprecipitados y analizados por “inmunoblot” con anticuerpos específicos para cada una de las subunidades de PI3-cinasa. El silenciamiento de p110 α produce una inhibición parcial en la unión de esta subunidad a ICOS fosforilado (Figura 19 b). Estos resultados explican la inhibición parcial de la activación de Akt observada en la figura 18 b.

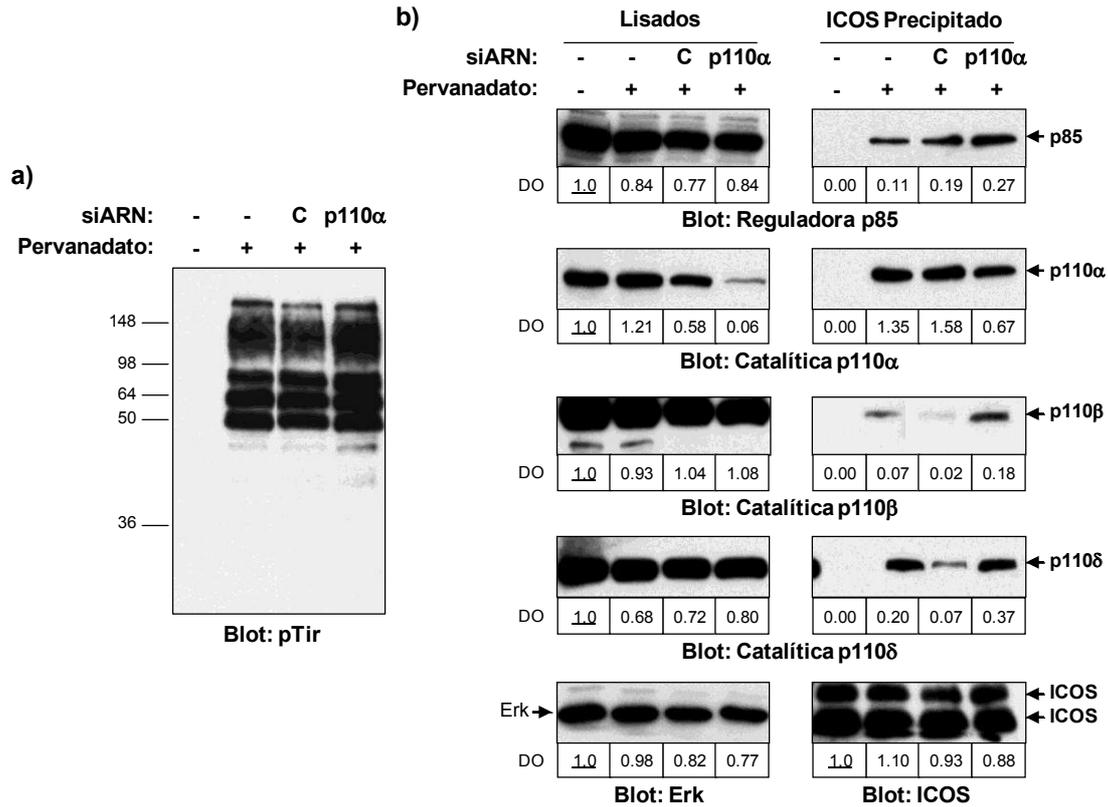


Figura 19. Asociación de las subunidades de PI3-cinasa a inmunoprecipitados de ICOS expresado en la superficie de células tratadas con siARN para la subunidad catalítica p110 α .

Antes y después de la inducción de la fosforilación de proteínas intracelulares con pervanadato. **a)** Comparación de la fosforilación en tirosinas de lisados de células SR.D10 con siARN de p110 α , tratadas (+) o no tratadas (-) con pervanadato 5 min, determinado por “inmunoblot” con anticuerpo anti-fosfotirosina. **b)** Co-precipitación de las subunidades de PI3-cinasa de clase IA en inmunoprecipitados con ICOS, en células SR.D10 con siARN de p110 α , tratadas (+) o no (-) con pervanadato 5 min, determinado por “inmunoblot” con anticuerpos específicos para cada subunidad. El valor de la DO de las diferentes subunidades de PI3-cinasa tiene como referencia la DO del lisado que es igual a 1.

También se estudió el efecto del silenciamiento de la subunidad catalítica p110 δ , ya que estudios previos habían determinado su importancia en la activación de los linfocitos T. Se observó una clara inhibición en la expresión de p110 δ en las células tratadas con siARN p110 δ

(Figura 20 a), mientras p10 α y p110 β cambiaron moderadamente. Cuando las células transfectadas con siARN para p110 δ fueron activadas con anti-CD3 y anti-ICOS, la fosforilación temprana de Akt fue inhibida y, en contraste con el silenciamiento de p110 α , la fosforilación de Erk sí es inhibida (Figura 20 b). La subunidad reguladora no se ve afectada con el silenciamiento de las subunidades catalíticas de PI3-cinasa p110 α y p110 δ .

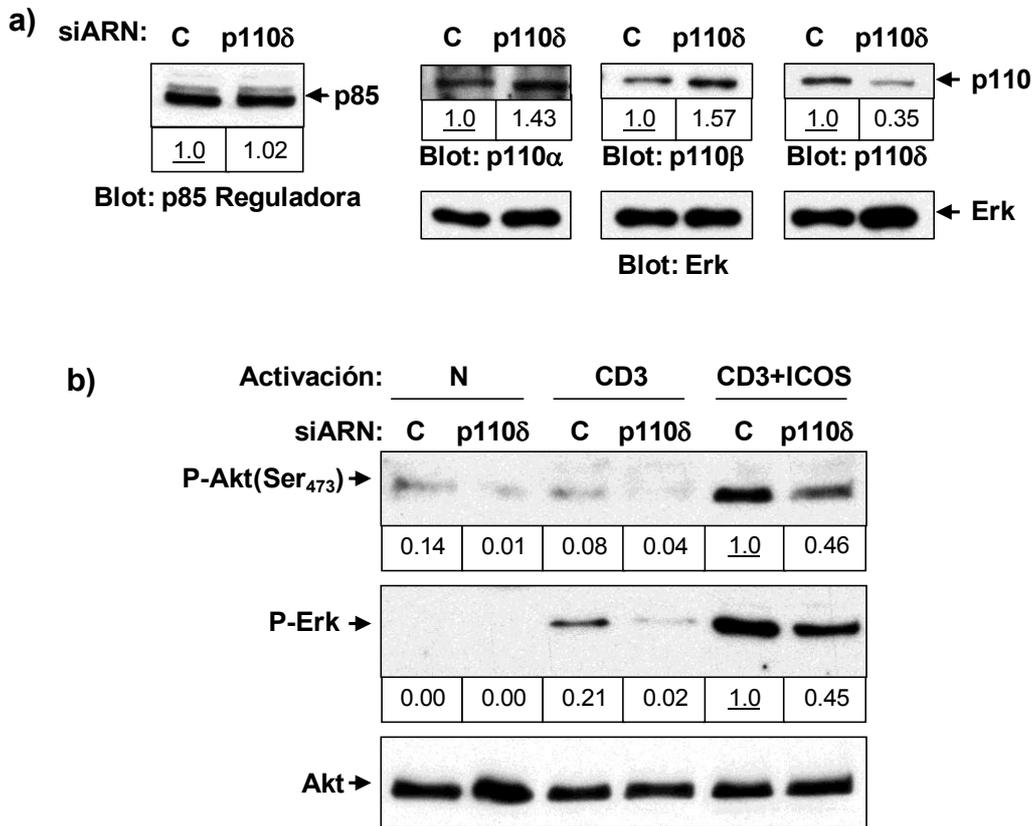


Figura 20. Efecto del silenciamiento de la subunidad catalítica p110 δ de PI3-cinasa en la coestimulación por ICOS.

a) Lisado de células SR.D10 transfectadas con siARN control (C) o siARN específico para p110 δ , probadas por “inmunoblot” con anticuerpos específicos para cada subunidad. La DO del lisado celular control fue tomada como referencia, con un valor igual a 1. Los datos son representativos de un experimento realizado dos veces. **b)** Células SR.D10 transfectadas con siARN control o siARN de p110 δ , fueron activadas 10 min a 37°C con esferas de poliestireno recubiertas con anti-CD3 (0,5 μ g/ml) (CD3) o anti-CD3 mas anti-ICOS (5 μ g/ml) (CD3+ICOS) o sin activar (N). Los lisados celulares fueron analizados mediante “inmunoblot” con anticuerpos específicos para Akt fosforilado (P-Akt Ser₄₇₃) o Erk fosforilado (P-Erk). La carga de las proteínas fue corregida usando anticuerpo anti-Akt como referencia.

También se estudio el efecto del silenciamiento de ambas subunidades catalíticas (p110 α +p110 δ) de PI3-cinasa en las señales tempranas de Akt y Erk. Para esto, las células SR.D10 transfectadas con siARN control (C) y con ambos siARN (p110 $\alpha\delta$), fueron activadas

con anti-CD3 y anti-CD3 mas anti-ICOS. Se observó por “inmunoblot” la disminución clara en los niveles de expresión de las dos subunidades catalíticas p110 α y p110 δ , mientras los niveles de la subunidad reguladora p85 y p50 no se vieron alterados, los niveles de p110 β aumentaron (Figura 21 a).

La activación temprana de Akt y Erk (P-Akt, P-Erk) por anti-CD3 o anti-CD3 mas anti-ICOS en las células silenciadas para las dos subunidades fue inhibida, esto indica que el efecto del silenciamiento de p110 δ en la inhibición de P-Erk es dominante frente al de p110 α (Figura 21 b).

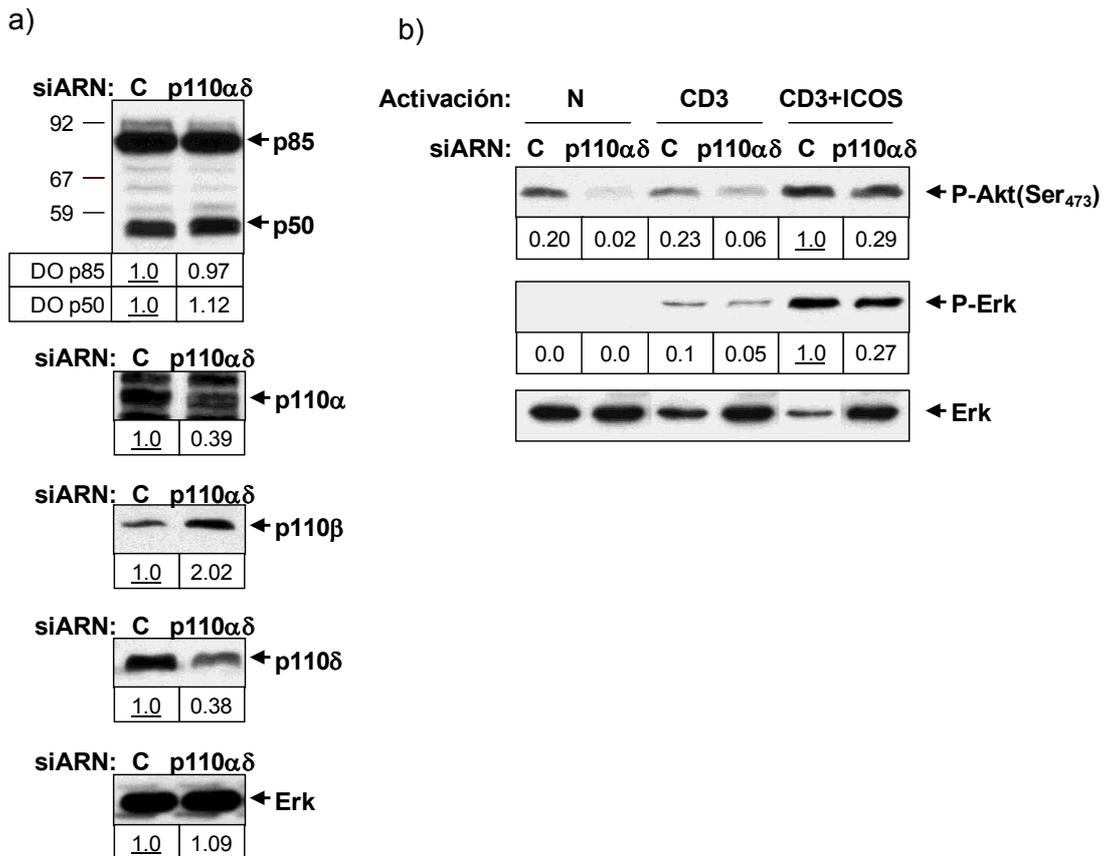


Figura 21. Efecto del silenciamiento de ambas subunidades catalíticas p110 α y p110 δ de PI3-kinasa en la coestimulación por ICOS.

a) Lisado de células SR.D10 transfectadas con siARN control (C) o con los dos siARN (p110 $\alpha\delta$), probadas por “inmunoblot” con anticuerpos específicos para cada subunidad. La DO del lisado celular control fue tomada como referencia, con un valor igual a 1. b) Células SR.D10 transfectadas con siARN control o con los dos siARN de p110 α y p110 δ , fueron activadas 10 min a 37°C con esferas de poliestireno recubiertas con anti-CD3 (0,5 μ g/ml) (CD3) o anti-CD3 mas anti-ICOS (5 μ g/ml) (CD3+ICOS) o sin activar (N). Las células fueron lisadas y analizadas mediante “inmunoblot” con anticuerpos específicos para Akt fosforilado (P-Akt Ser473) o Erk fosforilado (P-Erk). La carga de las proteínas fue corregida usando anticuerpo anti-Erk como referencia.

4.2.2 Papel de las subunidad catalítica p110 α en la coestimulación por ICOS

Para evaluar más a fondo el efecto de las subunidades catalíticas de PI3-quinasa en la coestimulación por ICOS se utilizaron inhibidores farmacológicos frente a cada una de las subunidades. Células SR.D10 fueron activadas durante 4-5 h con esferas de poliestireno recubiertas con anti-CD3 (1 μ g/ml) mas anti-ICOS (5 μ g/ml) o con un anticuerpo control en presencia o ausencia de inhibidores específicos para PI3-quinasa. Posteriormente en los sobrenadantes de cultivo se determinó por ELISA la producción de IL-4 e IL-10 (Figura 22).

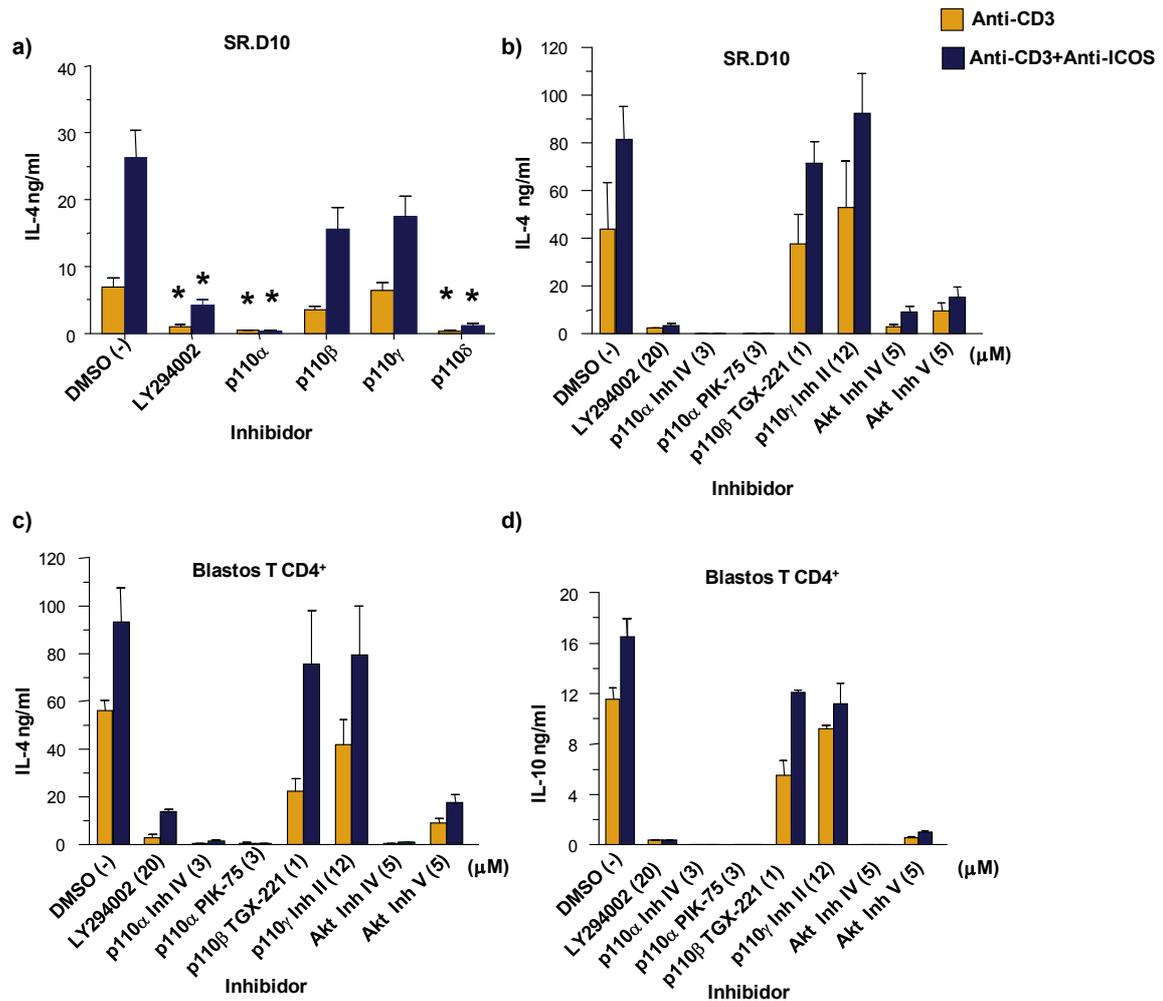


Figura 22. Efecto de inhibidores farmacológicos en la secreción de IL-4 o IL-10 inducida por la coestimulación con ICOS en SR.D10 y blastos de linfocitos T CD4⁺.

a) Sobrenadantes de células SRD.10 activadas con esferas de poliestireno recubiertas de anticuerpos anti-CD3 (barras amarillas) o anti-CD3 más anti-ICOS (barras azules); en presencia de inhibidores específicos para las subunidades catalíticas p110 α (PIK-75) p110 β (TGX-221), p110 γ (Inh II), p110 δ (IC87114) o en ausencia (DMSO) fueron analizados por ELISA para la producción de IL-4. b) Sobrenadantes de células SRD.10 activadas con esferas de poliestireno recubiertas de anticuerpos anti-CD3 (barras amarillas) o anti-CD3 más anti-ICOS (barras azules); en presencia de inhibidores específicos para las subunidades catalíticas de PI3-quinasa y para la cinasa Akt (Inh IV, V) o sin inhibidores (DMSO)

fueron analizados para producción de IL-4 por ELISA. **c)** y **d)** Sobrenadantes de blastos ICOS⁺ de linfocitos T CD4⁺ de ratón activados con esferas de poliestireno recubiertas de anticuerpos anti-CD3 (barras amarillas) o anti-CD3 más anti-ICOS (barras azules); en presencia de inhibidores específicos para las subunidades catalíticas y para la cinasa Akt (Inh IV, V) o en ausencia de inhibidores (DMSO) fueron analizados por ELISA para producción de IL-4 (**c)** o de IL-10 (**d**). Los niveles de IL-4 o IL-10 de células sin activar estaban por debajo del límite de detección y no se representan en la figura. Media ± ES de triplicados de un experimento realizado dos veces con resultados similares.

EL inhibidor general de PI3-cinasa LY294002, inhibió la secreción de IL-4 inducida por la activación TCR/CD3 y por la coestimulación con ICOS. También los inhibidores específicos para la subunidades catalíticas p110 α (PIK-75) y p110 δ (IC87114) inhibieron la secreción de IL-4 en este sistema, a diferencia de los inhibidores de p110 β (TGX221) y de p110 γ , que no causaron un efecto significativo en la producción de IL-4 en células SR.D10 (Figura 22 b) o de IL4 e IL-10 en blastos ICOS⁺ de linfocitos T CD4⁺ de bazo (Figura 21 c.d). Inhibidores de la cinasa Akt, inhibieron claramente la secreción de IL-4 e IL-10 (Figura 22 b.c.d).

El efecto de inhibidores farmacológicos específicos para las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ de PI3-cinasa en las señales tempranas de fosforilación de Akt y Erk también fueron analizados. Para esto, células SR.D10 fueron activadas con anticuerpos anti-CD3 o anti-CD3 más anti-ICOS en presencia o ausencia de inhibidores (Figura 23). El inhibidor de p110 δ IC87114 inhibe eficazmente la fosforilación de Akt inducida por CD3 o CD3 más ICOS, mientras que la fosforilación de Erk fue más resistente al efecto del inhibidor. Al igual que el inhibidor de p110 δ , el inhibidor de p110 α PIK-75 inhibe la fosforilación de Akt y la fosforilación de Erk, resultado contrario al observado con células silenciadas en la subunidad p110 α , donde la fosforilación de Erk aumentó. Esto demuestra que la pérdida de la expresión de la subunidad catalítica p110 α o p110 δ de PI3-cinasa en las células silenciadas genera un desequilibrio en PI3-cinasa y en las señales diana de la coestimulación por ICOS. En cambio, el uso de inhibidores provoca un efecto en la actividad de la subunidad, no en su abundancia.

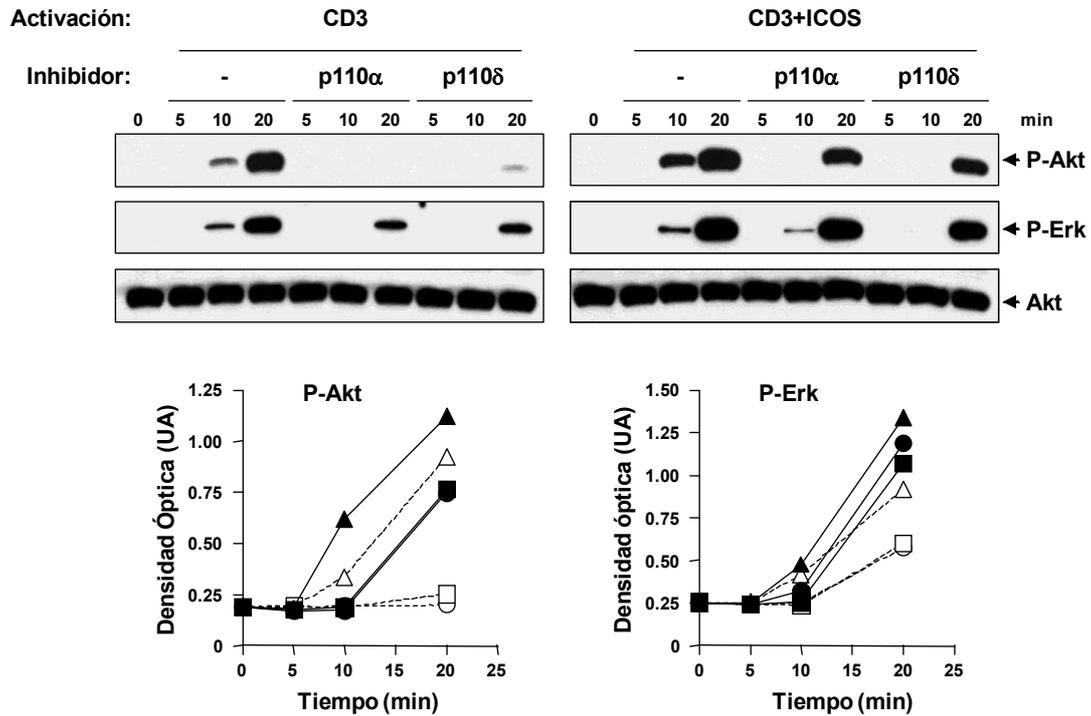


Figura 23. Efecto de inhibidores farmacológicos en las señales tempranas de Akt y Erk inducidas por la coestimulación con ICOS en células SR.D10.

Células SR.D10 fueron activadas con anticuerpo anti-CD3 (0,5 μ g/ml) (CD3) o anti-CD3 mas anti-ICOS (5 μ g/ml) (CD3+ICOS) a diferentes tiempos (0, 5, 10 y 20 min); en ausencia (-) o presencia de inhibidores para las subunidades catalíticas p110 α (PIK-75, 1 μ M) o p110 δ (IC87114, 5 μ M) de PI3-cinasa y analizados mediante "inmunoblot" con anticuerpos específicos para Akt (P-Akt) o Erk (P-Erk). La carga de las proteínas fue corregida usando anticuerpo anti-Akt como referencia. Se representa el valor de la densidad óptica de P-Akt y P-Erk en la parte inferior de la figura, las células activadas con anti-CD3 con símbolos abiertos y las células activadas con anti-CD3 mas anti-ICOS con símbolos cerrados; en presencia del inhibidor para p110 α (círculos), o para p110 δ (cuadrados) o en ausencia de inhibidores (triángulos). UA: unidades arbitrarias. Los datos son representativos de un experimento realizado 2 veces.

4.2.2.1 Efecto diferencial de inhibidores de p110 α en la producción de IFN- γ y la fosforilación de Akt

Estudiamos la producción de citocinas y la fosforilación de AKT y Erk en blastos de células T CD4⁺. Para observar mejor en estas células la producción de citocinas tras de un estímulo por anticuerpos anti-CD3 o anti-CD3 más anti-ICOS, realizamos activaciones de 20-24h. Sin embargo, como se verá más adelante, a estos tiempos se veía comprometida la viabilidad de las células con las concentraciones de inhibidores de p110 α usadas previamente. Por ello empleamos concentraciones menores de inhibidor que en los ensayos de activación para

“inmunoblot”. A las concentraciones empleadas, dos inhibidores de p110 α (PIK-75 y A66) no tuvieron efecto significativo sobre la producción de IL-4 o IL-10 inducida por anti-CD3 y anti-ICOS, pero inhibieron significativamente la producción de IFN- γ , y ligeramente la producción de IL-2 (Figura 24). El inhibidor de p110 δ (IC87114) se empleó a la misma concentración usada en ensayos anteriores, y suprimió la producción de todas las citocinas excepto IL-10. Por tanto, parece que la síntesis de IFN- γ es especialmente sensible a la inhibición de la subunidad catalítica de PI3-cinasa p110 α .

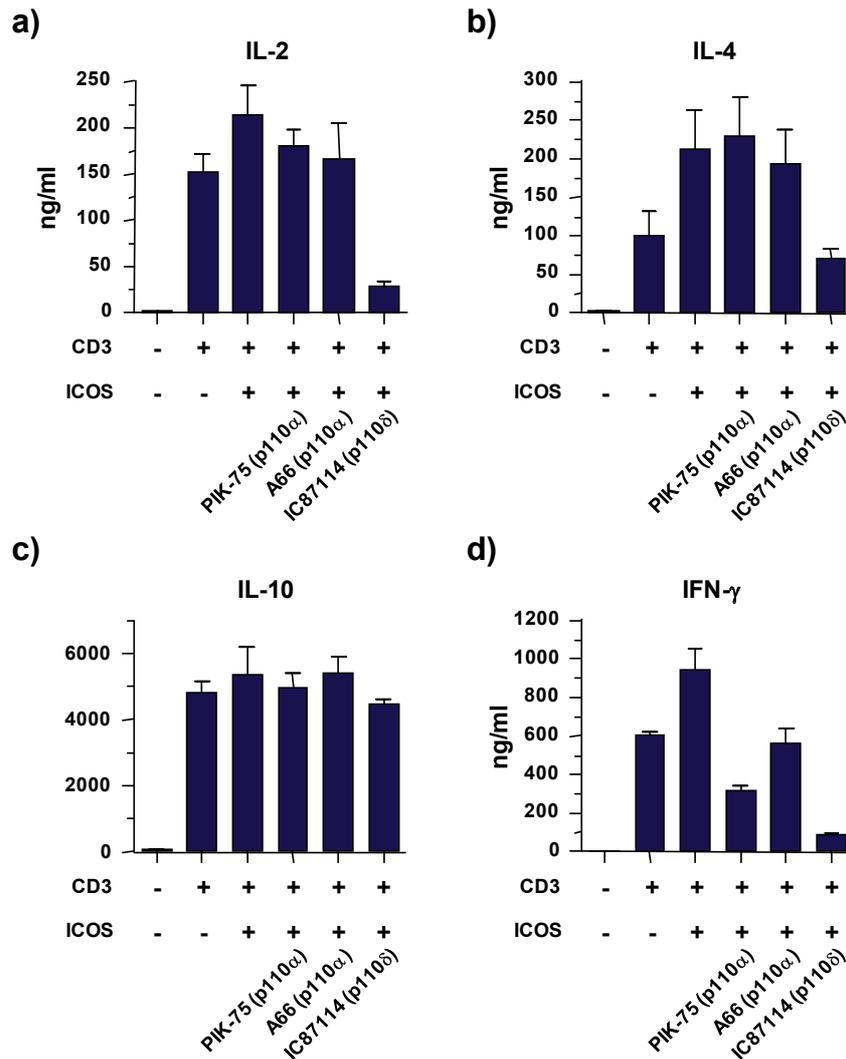


Figura 24. Efecto de la inhibición de las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ en la secreción de IL-2, IL-4, IL-10 o IFN- γ inducida por la coestimulación con ICOS en blastos de linfocitos T CD4⁺.

Sobrenadantes de blastos de linfocitos T CD4⁺ activados en placa con anticuerpos anti-CD3 (10 μ g/ml) o anti-CD3 mas anti-ICOS (20 μ g/ml); en presencia de inhibidores específicos para las subunidades catalíticas p110 α (PIK-75, 0,01 μ M; A66, 1 μ M) y p110 δ (IC87114, 5 μ M) fueron analizados por ELISA para la producción de citocinas. **a)** IL-2. **b)** IL-4. **c)** IL-10. **d)** IFN- γ . Media \pm ES de triplicados de un experimento realizado dos veces con resultados similares.

Ensayamos también el efecto en blastos de inhibidores de PI3-cinasa sobre vías de activación temprana que son dianas muy directas (Akt/PKB) o indirectas (Erk) de la actividad de PI3-cinasa (Figura 25).

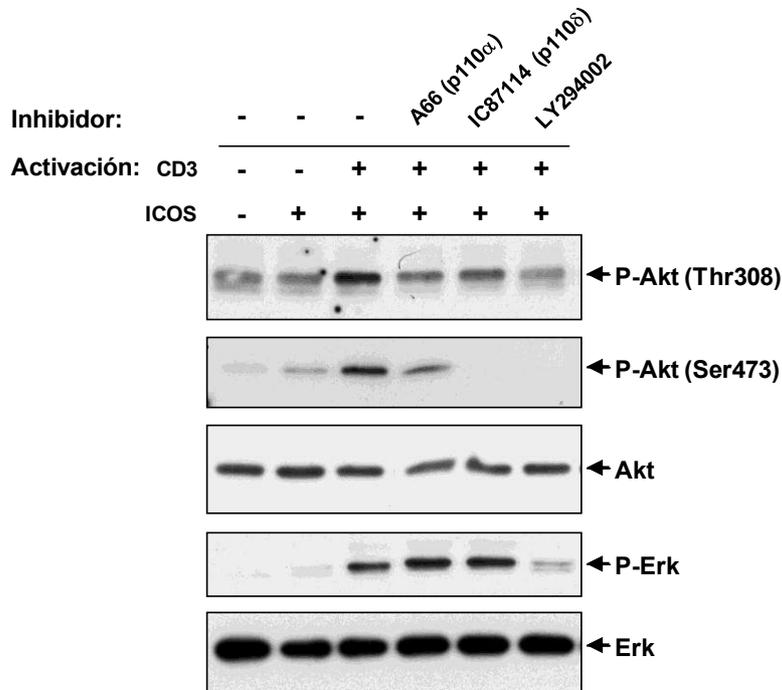


Figura 25. Efecto de la inhibición de PI3-cinasa en las señales tempranas de Akt y Erk inducidas por la coestimulación con ICOS en blastos de linfocitos T CD4⁺.

Blastos de linfocitos T CD4⁺ fueron activados durante 20 minutos con esferas recubiertas con anticuerpo anti-CD3 (10 μ g/ml) o anti-CD3 mas anti-ICOS (20 μ g/ml) en ausencia (-) o presencia de inhibidores para las subunidades catalíticas de PI3-cinasa p110 α (A66, 1 μ M) o p110 δ (IC87114, 5 μ M) o para todas las subunidades (LY294002, 10 μ M) y analizados mediante "inmunoblot" con anticuerpos específicos para Akt (P-Akt Ser473 y P-Akt Thr308) o Erk (P-Erk). La carga de las proteínas fue corregida usando anticuerpo anti-Akt o anti-ERK como referencia. Los datos son representativos de un experimento realizado 2 veces.

La fosforilación de la Treonina 308 de Akt es dependiente de la cinasa PDK1, cuya activación a su vez es directamente dependiente de la actividad PI3-cinasa. Esta fosforilación es inhibida eficientemente por inhibidores de p110 α (A66), p110 δ (IC87114), o de todas las isoformas (LY294002). La fosforilación de Akt en la Serina 473 depende del complejo mTORC2 y también es iniciado por las PI3-cinasas (Chi 2012). A las concentraciones usadas, la fosforilación de Akt inducida por anti-CD3 y anti-ICOS es inhibida parcialmente por el inhibidor de p110 α (A66), y totalmente por el de p110 δ , o por LY294002. La producción de IFN- γ parece en gran medida dependiente de la activación de Akt en la Serina 473 (Chi 2012), y en nuestro caso el grado de inhibición de la síntesis de IFN- γ se correlaciona bien con la inhibición de la fosforilación de Akt

en esta Serina. En el caso de la fosforilación de Erk, ni la inhibición de p110 α ni la de p110 δ tienen efecto aisladamente. Estos resultados están de acuerdo con la resistencia a la inhibición de Erk que habíamos observado para los inhibidores de p110 α y p110 δ en la línea SR.D10 (ver figura 23). Sin embargo, la inhibición por LY294002 muestra que, a pesar de todo, la activación de Erk es dependiente de PI3-cinasas, como habíamos mostrado previamente en la coestimulación por ICOS en células de la línea SR.D10 (Feito et al. 2003).

4.2.3 Papel de la subunidad catalítica p110 α en la coestimulación por CD28 y en la viabilidad celular

Los datos existentes empleando mutantes o inhibidores de p110 δ muestran claramente la importancia de esta subunidad en la activación antigénica de linfocitos T y en la coestimulación por CD28 o ICOS (ver (Acosta *et al.* 2011, Ji *et al.* 2007, Soond *et al.* 2010), y las figuras anteriores). Sin embargo, como se ha mostrado anteriormente, la asociación preferente de las subunidades catalíticas p110 α a las subunidades reguladoras de PI3-cinasa no es específica de la región citoplasmática de ICOS, y también pudimos observarla asociada a un péptido de CD28 fosforilado en su motivo YxxM. Por ello nos propusimos analizar el papel de p110 α en la activación de linfocitos T y en la coestimulación por CD28. Nos centramos en la activación de linfocitos T “naive”, CD4⁺ CD62L⁺, ya que su activación es fuertemente dependiente de CD28.

Los resultados iniciales mostraron que, a concentraciones de 1-0,1 μ M, el inhibidor de p110 α PIK-75 inhibía completamente la proliferación a tres días y la producción de citocinas como IL-2 o IFN- γ de estos linfocitos inducida por anti-CD3 y anti-CD28 (Figura 26). Sin embargo, observamos que esta inhibición estaba acompañada por una fuerte pérdida de viabilidad en las células a partir de las 24 horas de cultivo.

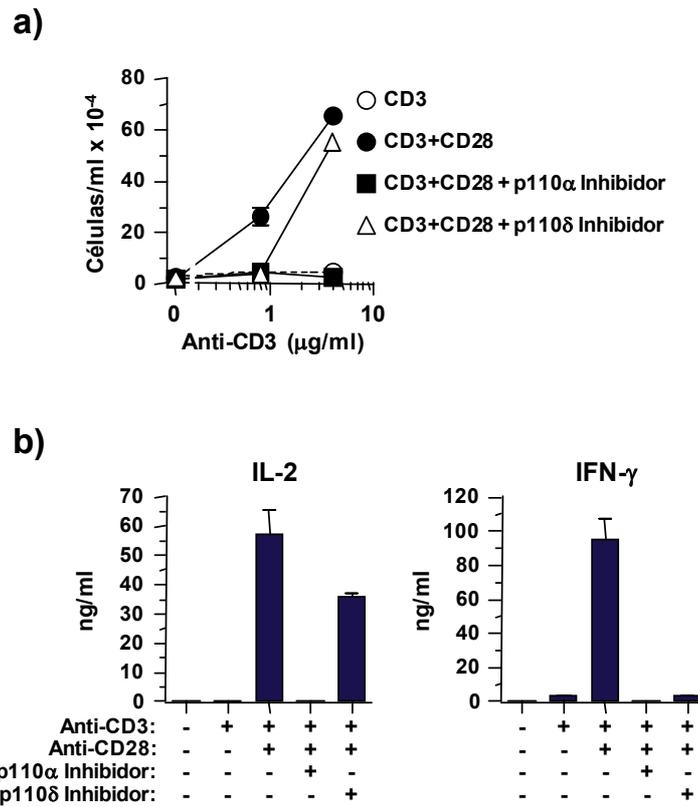


Figura 26. Efecto de la inhibición de la subunidad p110 α en la coestimulación por CD28 y en la viabilidad celular.

Linfocitos T CD4⁺ "naive" activados con anticuerpo anti-CD3 o anti-CD3 más anti-CD28 soluble (2,5 µg/ml) en presencia de inhibidores de las subunidades catalíticas de PI3-kinasa p110 α (PIK-75, 1 µM) y p110 δ (IC87114, 5 µM). **a)** Viabilidad celular determinada por exclusión con azul de Tripán. **b)** Producción de citocinas (IL-2, IFN- γ). Media \pm ES de triplicados de un experimento realizado dos veces con resultados similares.

Para conocer más a fondo el papel de la subunidad catalítica p110 α en la viabilidad y la muerte celular de linfocitos T mediada por CD28, se aislaron linfocitos T CD4⁺ "naive" de ratón, y se activaron con anti-CD3 más anti-CD28 o con anti-CD3 más IL-7, durante 24 horas en presencia de inhibidores farmacológicos de las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ . Transcurrido este periodo, se observó la apoptosis con Anexina FITC/Ioduro de Propidio. En la figura 27, se observa una disminución notable en el porcentaje de células vivas al usar el inhibidor de p110 α (PIK-75), en comparación con el inhibidor de p110 δ .

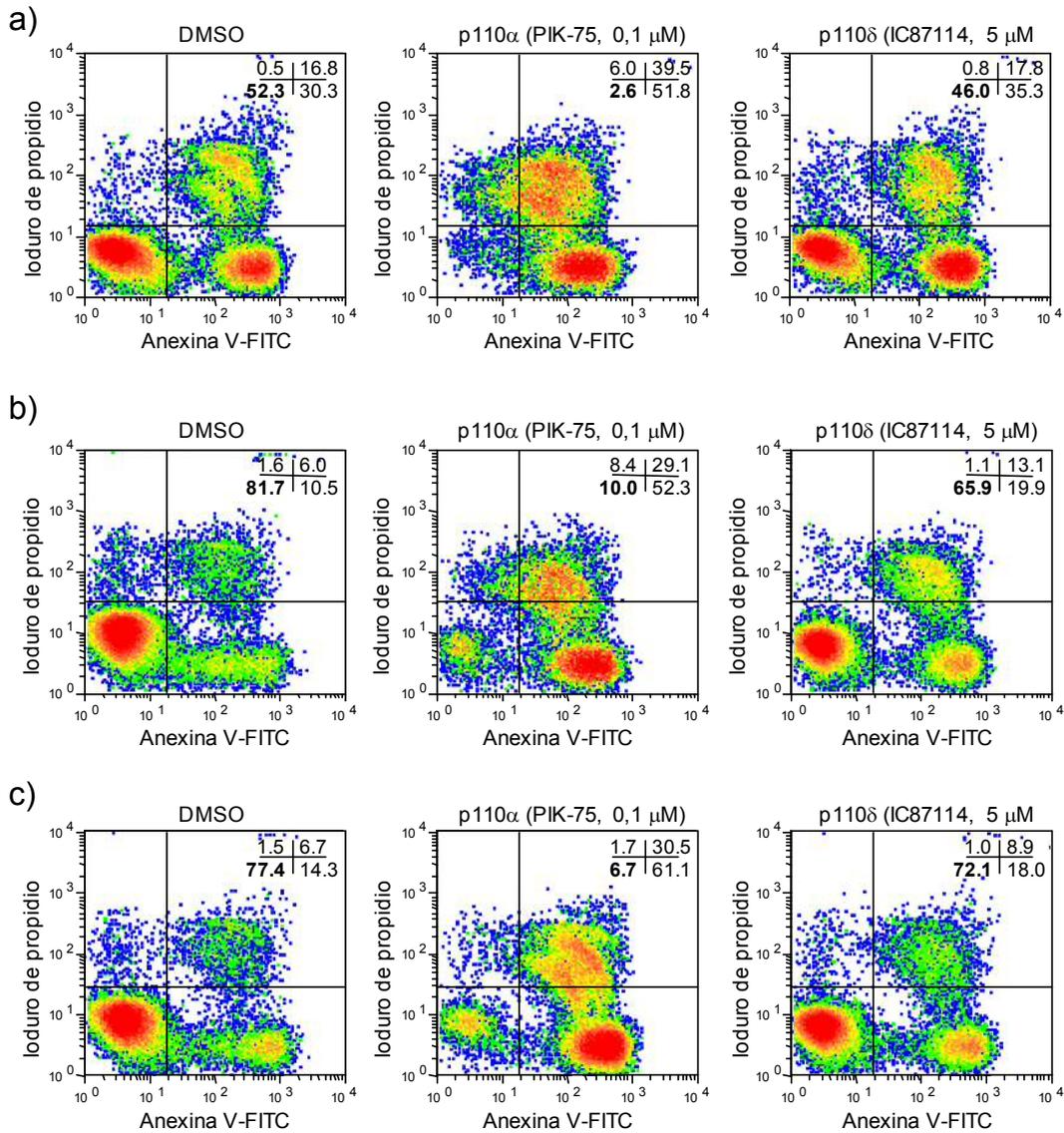


Figura 27. Apoptosis de linfocitos T CD4⁺ inducida por inhibidores de PI3-cinasa.

Linfocitos T CD4⁺ **a)** Sin activar. **b)** Activados con anti-CD3 (20 μ g/ml) mas Anti-CD28 (2,5 μ g/ml). **c)** Activados con anti-CD3 (20 μ g/ml) mas IL-7 (1 ng/ml) en presencia de inhibidores de p110 α (PIK-75, 0,1 μ M) y de p110 δ (IC87114, 5 μ M) o sin inhibidores (DMSO), fueron incubados 24h y posteriormente teñidos con Anexina FITC/Ioduro de Propidio.

El papel de PI3-cinasa p110 α fue examinado de nuevo empleando concentraciones más bajas de PIK-75, y otro inhibidor disponible recientemente (A66) altamente selectivo para p110 α . En la figura 28 se muestra la inhibición de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ "naive" inducida por anti-CD3 y anti-CD28. Se observa también que la inhibición es aún más profunda en la

producción de citocinas como IFN- γ . Inhibidores específicos de p110 δ (IC87114) y generales de PI3-cinasas (LY294002) (Figura 28) también inhibieron efectivamente la proliferación y la producción de IFN- γ de estas células, mientras que inhibidores de p110 β no tuvieron efecto (no mostrado).

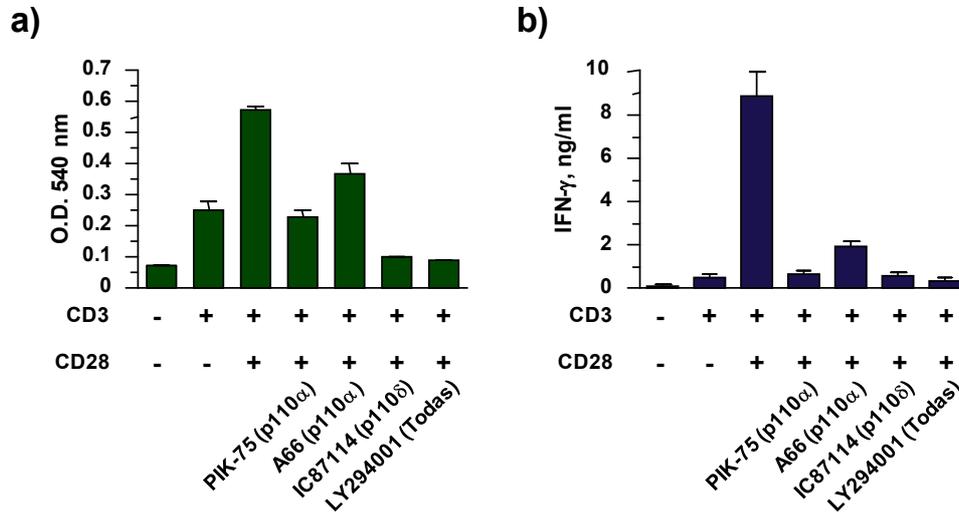


Figura 28. Efecto de la inhibición de la subunidad p110 α en la proliferación celular y en la producción de IFN- γ .

Los linfocitos T CD4⁺ “naive” fueron activados con anticuerpo anti-CD3 (10 μ g/ml) adsorbido a placa y anti-CD28 soluble (2,5 μ g/ml) en presencia de inhibidores para las subunidades catalíticas p110 α (PIK-75 0,01 μ M; A66, 1 μ M), p110 δ (IC87114, 5 μ M) o todas las subunidades (LY294001, 10 μ M). **a)** Proliferación celular medida por un ensayo colorimétrico con MTT. **b)** Producción de IFN- γ

4.2.4 Importancia de la subunidad catalítica p110 α de PI3-cinasa en la supervivencia de linfocitos T

La inhibición de p110 α demuestra la importancia de esta subunidad en la supervivencia de linfocitos T CD4⁺, por lo que decidimos comprobar si este efecto se mantenía al silenciar esta subunidad. Para esto, linfocitos T CD4⁺ “naive” fueron nucleofectados con siARN control, siARN para p110 α y siARN para p110 δ , e incubados a diferentes tiempos (24, 48, 72 horas), analizando la viabilidad celular después de este periodo.

En la figura 29a, se observa que las células con siARN para p110 α tienen una menor viabilidad en comparación con los otros grupos.

También se analizó la apoptosis por tinción con Anexina FITC/Ioduro de Propidio (Figura 29 b). A las 24 horas de incubación, se observó diferencia en el porcentaje de células vivas (A-/IP-): las células control y las “knockdown” para la subunidad p110 δ representaron un 43-45%, frente a un 35% de células vivas “knockdown” para la subunidad p110 α . El uso de inhibidores y el

silenciamiento de la subunidad catalítica p110 α demuestran la importancia de esta subunidad en la supervivencia de linfocitos T.

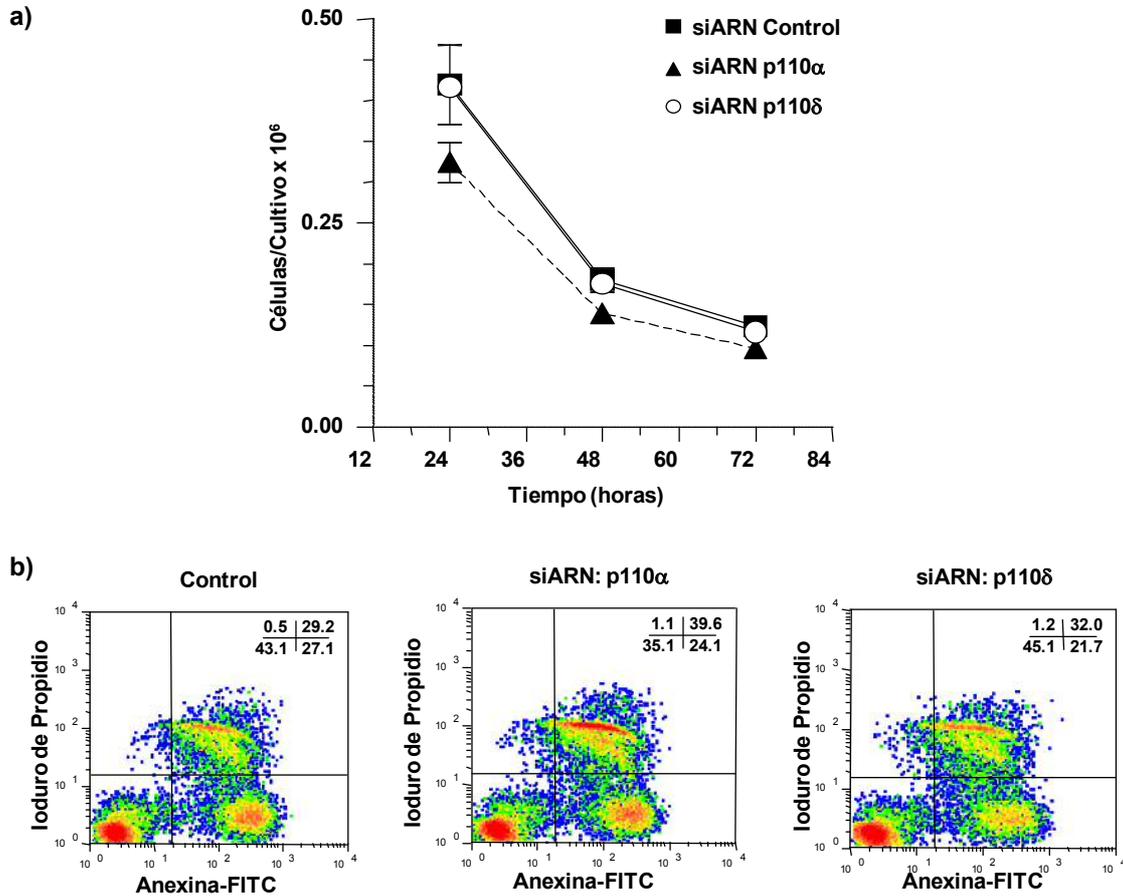


Figura 29. Papel del silenciamiento de las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ de PI3-cinasa en la supervivencia de linfocitos T.

Los linfocitos T CD4⁺ fueron nucleofectados con siARN (2 μ M) para p110 α , p110 δ y un siARN control, se incubaron durante 24, 48 y 72 horas. Se analizó: a) Viabilidad celular por exclusión con azul de Tripán. b) Apoptosis a las 24 horas por tinción con Anexina FITC/Ioduro de Propidio.

Para saber si la importancia de la subunidad p110 α en la supervivencia de linfocitos T CD4⁺ encontrada hasta el momento, se mantenía en las células SR.D10 y además si Akt, NF κ B y otras subunidades de PI3-cinasa estaban implicadas, se incubaron células SR.D10 activadas con IL-2 (Figura 30) o sin activar (Figura 31), en presencia de inhibidores de las diferentes subunidades catalíticas de PI3-cinasa (p110 α , p110 β , p110 γ , p110 δ), inhibidores de Akt o inhibidores de NF κ B durante 24 horas, para ser teñidas posteriormente con Anexina FITC/Ioduro de Propidio y analizadas por citometría de flujo.

Tanto en las células activadas como en las células no activadas, se observa una muerte celular significativa inducida por los inhibidores de p110 α , Akt y NF κ B, al compararlas con las células control (DMSO); la viabilidad celular medida por la exclusión con azul de Tripán comprueba este efecto (Figuras 30 h, 31 h).

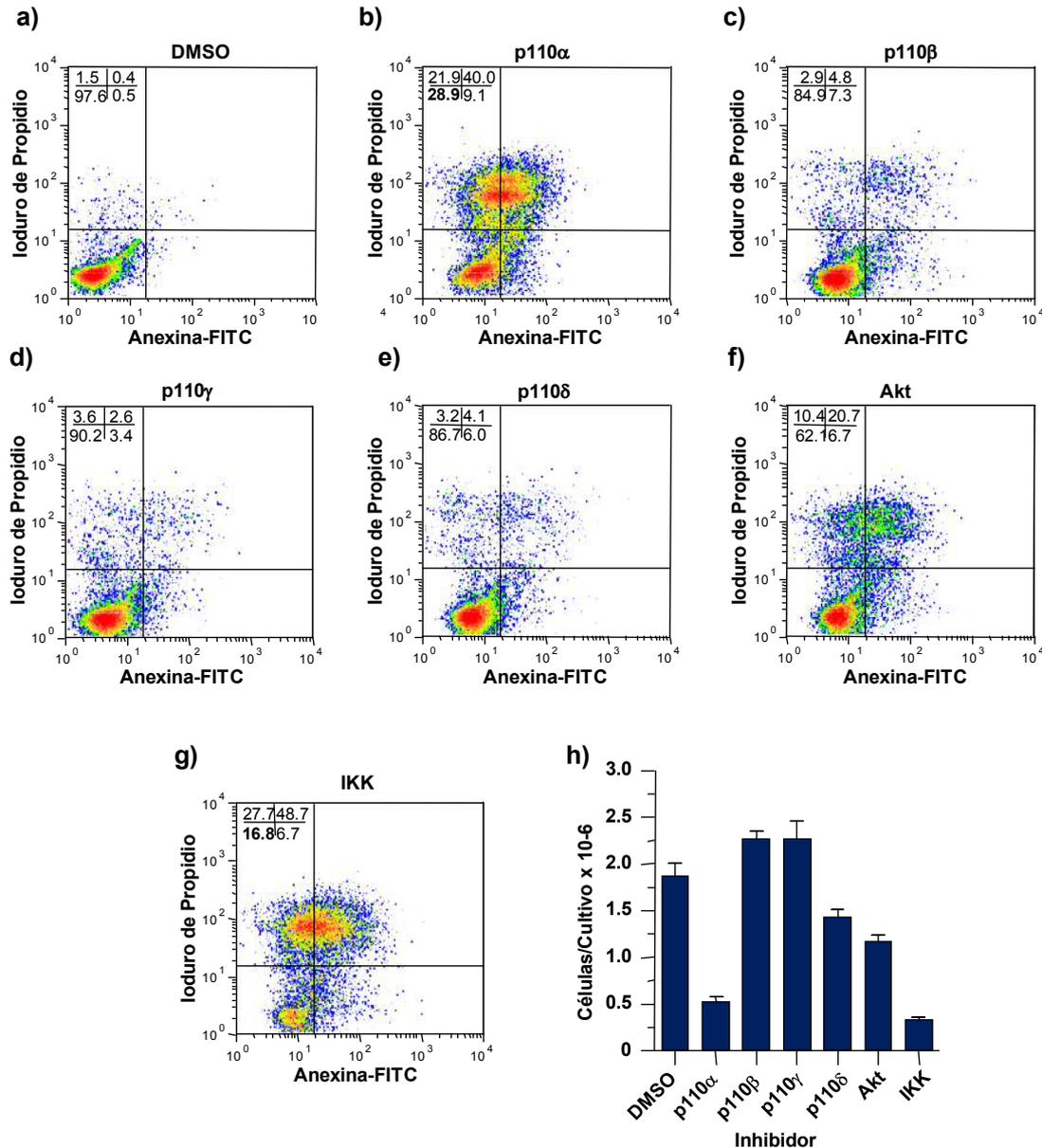


Figura 30. La supervivencia de células SR.D10 activadas con IL-2 es dependiente de p110 α , Akt y NF κ B.

Células SR.D10 fueron activadas con IL-2 durante 24 horas, en presencia o ausencia de inhibidores: **a)** DMSO. **b)** Inhibidor p110 α (PIK-75, 0,1 μ M). **c)** Inhibidor p110 β (TG221, 1 μ M). **d)** Inhibidor p110 γ (Inhibidor II, 12 μ M). **e)** Inhibidor p110 δ (IC87114, 5 μ M). **f)** Inhibidor Akt (Triciribine, 5 μ M). **g)** Inhibidor NF κ B (Wedelactone IKK, 60 μ M). La apoptosis fue medida por citometría de flujo con la tinción de Annexina FITC/Ioduro de Propidio. **h)** Viabilidad celular medida por exclusión con azul de Tripán.

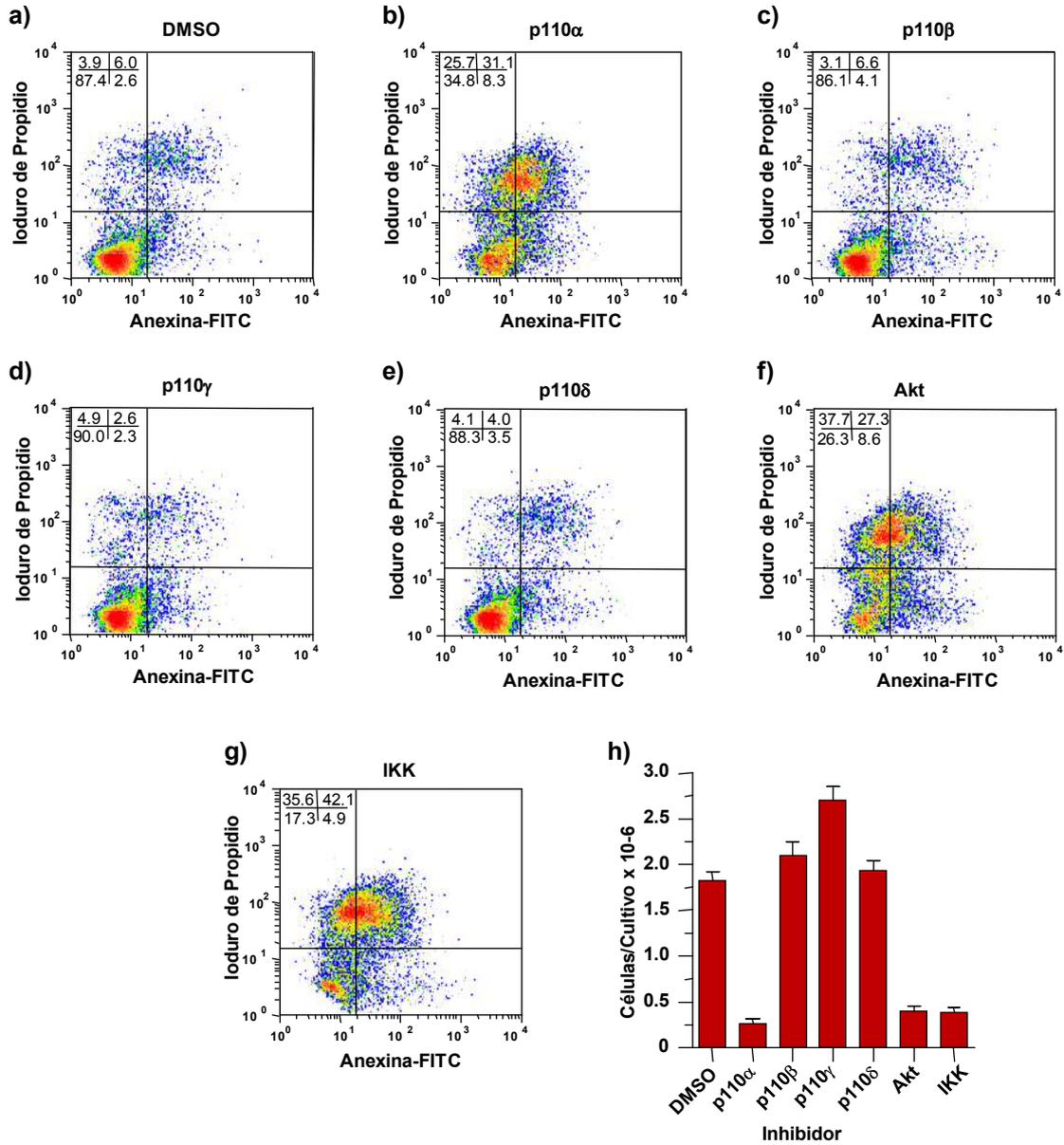


Figura 31. La supervivencia de células SR.D10 sin activar es dependiente de p110 α , Akt y NF κ B. Células SR.D10 sin activar fueron incubadas durante 24 horas, en presencia o ausencia de inhibidores: a) DMSO. b) Inhibidor p110 α (PIK-75, 0,1 μ M). c) Inhibidor p110 β (TG221, 1 μ M). d) Inhibidor p110 γ (Inhibidor II, 12 μ M). e) Inhibidor p110 δ (IC87114, 5 μ M). f) Inhibidor Akt (Triciribine, 5 μ M). g) Inhibidor NF κ B (Wedelactone IKK, 60 μ M). La apoptosis fue medida por citometría de flujo con la tinción de Annexina FITC/Ioduro de Propidio. h) Viabilidad celular medida por exclusión con azul de Tripán.

4.2.4.1 La muerte celular inducida por el inhibidor de p110 α es dependiente de caspasas en linfocitos T CD4⁺

En el mecanismo molecular que controla la apoptosis intervienen caspasas y como se ha dicho, el inhibidor de p110 α induce apoptosis en linfocitos T. Para saber si este efecto es dependiente de caspasas, linfocitos T CD4⁺ se incubaron durante 20 horas con el inhibidor de p110 α (PIK-75) en presencia o ausencia del inhibidor general de caspasas (Z-VAD-fmk) (Figura 32).

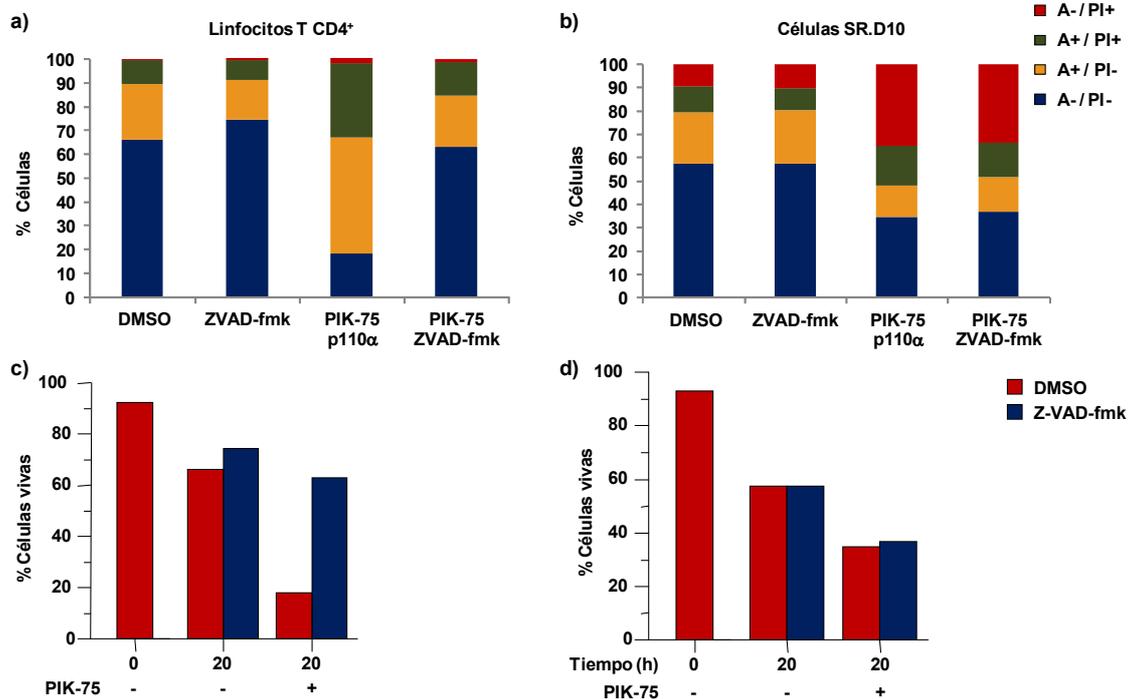


Figura 32. Efecto de la inhibición de la subunidad p110 α en la apoptosis y la viabilidad de linfocitos T CD4⁺ y células SR.D10.

Las células se incubaron durante 20 horas con DMSO o con el inhibidor de p110 α (PIK-75, 0,1 μ M) o el inhibidor de caspasas (Z-VAD-fmk, 50 μ M) o los dos inhibidores Z-VAD-fmk + PIK-75. **a)** % de linfocitos T CD4⁺ en las distintas fases del proceso de apoptosis. **b)** Apoptosis en SR.D10. **c)** Viabilidad celular en linfocitos T CD4⁺. **d)** Viabilidad celular en SR.D10. La apoptosis fue medida por citometría de flujo con la tinción de Anexina FITC/Ioduro de Propidio y la viabilidad celular por exclusión con azul de Tripán.

Se puede observar la apoptosis inducida por PIK-75 y cómo se revierte este efecto al inhibir la actividad de las caspasas con Z-VAD-fmk (Figura 32 a); la viabilidad celular aumenta al añadir el inhibidor de caspasas a las células tratadas con PIK-75 (Figura 32 c). Pero, al inducir la muerte con PIK-75 en células SR.D10 y tratarlas con el inhibidor de caspasas durante 20h, no

se revierte la apoptosis (Figura 32 b) en comparación con la apoptosis inducida en los linfocitos T CD4⁺; tampoco aumenta la viabilidad celular al añadir Z-VAD-fmk en las células SR.D10 (Figura 32 d). Esto indica que la muerte celular inducida por PIK-75 es dependiente de caspasas en linfocitos T CD4⁺ pero no en la línea celular Th2 SR.D10.

También encontramos que la apoptosis de linfocitos T CD4⁺ inducida por el inhibidor de Akt y el inhibidor de NFκB es dependiente de caspasas (Figura 33). Como se puede observar la apoptosis de linfocitos T CD4⁺ disminuye al añadir Z-VAD-fmk, cuando ha sido inducida por el inhibidor de Akt o por el inhibidor de NFκB.

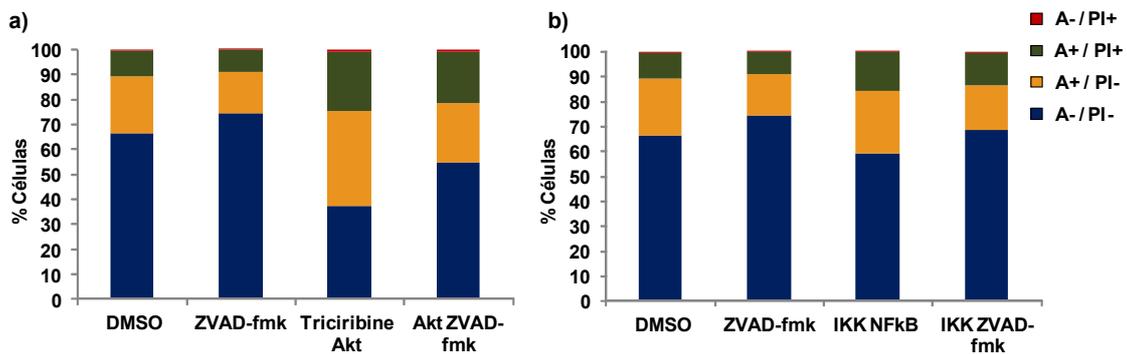


Figura 33. La apoptosis inducida por el inhibidor de NFκB y de Akt en linfocitos T CD4⁺ es dependiente de caspasas.

Los linfocitos T CD4⁺ se incubaron durante 20 horas con DMSO o inhibidores, en presencia o ausencia del inhibidor de caspasas Z-VAD-fmk. **a)** Inhibidor de Akt (Triciribine, 5 μM). **b)** Inhibidor NFκB (Wedelactone IKK, 60 μM). La apoptosis fue medida por citometría de flujo con la tinción de Anexina FITC/Ioduro de Propidio.

Como encontramos que en células SR.D10 la apoptosis inducida por el inhibidor de la subunidad catalítica p110α es un proceso independiente de caspasas, decidimos comprobar si este proceso de muerte celular era debido a autofagia (muerte celular de tipo II). Para esto, células SR.D10 se incubaron durante 24 horas con el inhibidor de p110α (PIK-75) en presencia o ausencia del inhibidor de autofagia (3-MA). Se pudo observar que la muerte celular inducida por PIK-75 no es por autofagia, ya que la adición del inhibidor 3-MA a las células tratadas con PIK-75 no mejoró la viabilidad de los cultivos tratados con dicho inhibidor de p110α (Figura 34).

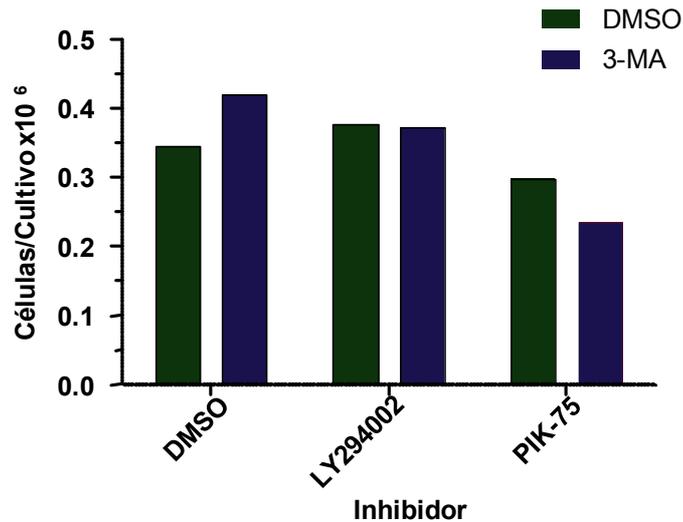


Figura 34. La muerte celular inducida por el inhibidor de p110 α en células SR.D10 no es un proceso autofágico.

Las células SR.D10 se incubaron durante 24 horas con DMSO, con el inhibidor general de PI3-quinasa (LY294002, 10 μ M) o con el inhibidor de p110 α (PIK-75, 0,1 μ M) en presencia (barras azules) o ausencia (barras verdes) del inhibidor de autofagia (3-MA, 100 μ M). Posteriormente se analizó la viabilidad celular por exclusión con azul de Tripán.

4.3 CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LINFOCITOS T INDUCIDOS POR ICOS

Se ha demostrado que la ligación de CD28, CTLA-4, o ICOS induce cambios en el citoesqueleto de actina en células T. CD28 induce acumulación de actina en el sitio de contacto célula/APC dependiente de la GTPasa Cdc42 (Tskvitaria-Fuller *et al.* 2006), elongación celular acompañada de la formación de estructuras lamelipodia y “microspikes” que requieren de la actividad de la familia Src quinasa, la localización en membrana Vav GEF, el adaptador de SLP-76, la activación de GTPasas, la polimerización de actina y la formación de adhesiones focales dependientes de las GTPasas Rac1 y Cdc42 (Kaga *et al.* 1998).

La ligación de CTLA-4 o CD3/CTLA-4 aumenta la polarización celular y la formación de estructuras lamelipodia, urópodo y filopodia dependiente de PI3-quinasa, de Vav1, de la GTPasa Cdc42, y de la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), pero no de Akt, de la GTPasa RhoA, o de la quinasa Rho (Rock) (Wei *et al.* 2007). La reorganización y elongación del citoesqueleto de actina y la formación de estructuras filopodia y “microspikes” inducidas por ICOS depende de Vav, Rac, Cdc42, Rock y la quinasa activada por p21 (PAK); mientras que hay datos a favor y en contra de la participación de la quinasa Akt (Franko & Levine 2009, Nukada *et al.* 2006).

4.3.1 Elongación celular inducida por ICOS

Para conocer el mecanismo mediante el cual ICOS induce elongación y cambios en el citoesqueleto de actina en células T, se estudió el papel de las diferentes PI3-quinasas de clase IA, ya que los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que estas cinasas son esenciales en la coestimulación por ICOS.

La ligación de ICOS con anticuerpos anti-ICOS o con la proteína recombinante del ligando de ICOS de ratón (B7-H2 Fc) induce elongación y cambios en el citoesqueleto de actina en células SR.D10 (Figura 35).

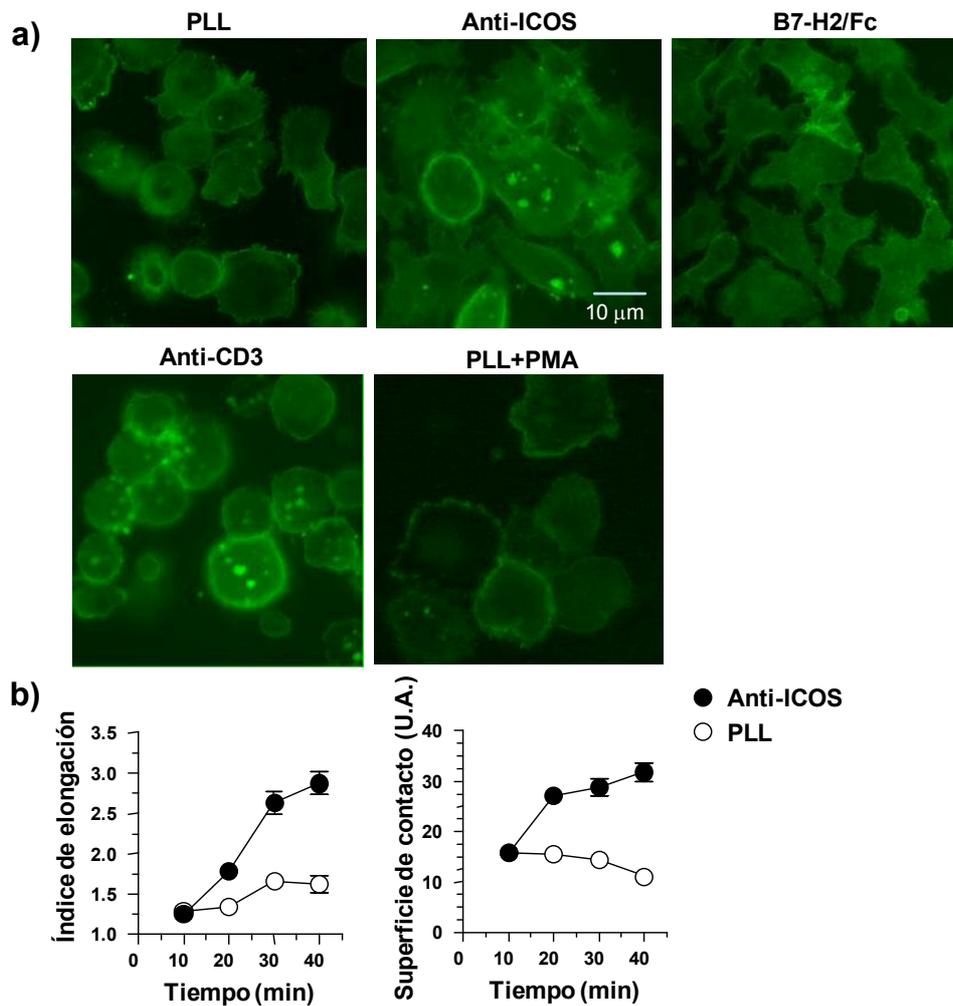


Figura 35. Elongación y cambios en el citoesqueleto de actina en células SR.D10.

a) Células SR.D10 incubadas durante 40 min en cubreobjetos recubiertos con anticuerpo anti-ICOS (10 μg/ml), proteína de fusión del receptor de ICOS e inmunoglobulina (B7-H2/Fc, 10 μg/ml), anticuerpos anti-CD3 (10 μg/ml), ésteres de forbol (PMA, 10 ng/ml) o con Poli-L-Lisina (PLL, 10 μg/ml) según se indica en la figura, y teñidas con faloidina-FITC. **b)** Tiempo de inducción de elongación (panel izquierdo) y aumento de la superficie de contacto (panel derecho) en células SR.D10. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) determinadas por la prueba t de Student.

Estos cambios celulares no se observaron al activar las células con otros estímulos como anti-CD3 o PMA (Figura 35 a). El alargamiento celular es un proceso rápido, con un máximo a los 30-40 minutos de incubación, en comparación con un control de Poli-L-Lisina (Figura 35 b).

El efecto de elongación inducido solo por ICOS, se bloquea con el inhibidor de la subunidad catalítica p110 α PIK75 (Figura 36 a) o con un inhibidor general de PI3-cinasa (LY294002,). En cambio, inhibidores específicos de otras subunidades de PI3-cinasa, incluyendo el inhibidor específico de p110 δ que inhibía eficazmente la activación por TCR/CD3, no muestran efecto significativo en este ensayo de elongación celular. El inhibidor de Lck también bloquea la elongación, siendo Lck en las células usadas, el principal miembro de la familia Src-cinasa (Figura 36 a). Por tanto, en este ensayo que depende únicamente de la ligación de ICOS con anticuerpos anti-ICOS o con la proteína recombinante B7-H2/Fc (Figura 36 b), se observa una dependencia de la subunidad catalítica p110 α , de acuerdo con su asociación preferente a ICOS. También se observa que Akt no es esencial en la elongación inducida por ICOS, ya que al usar inhibidores de Akt no se inhibe la elongación en las células SR.D10.

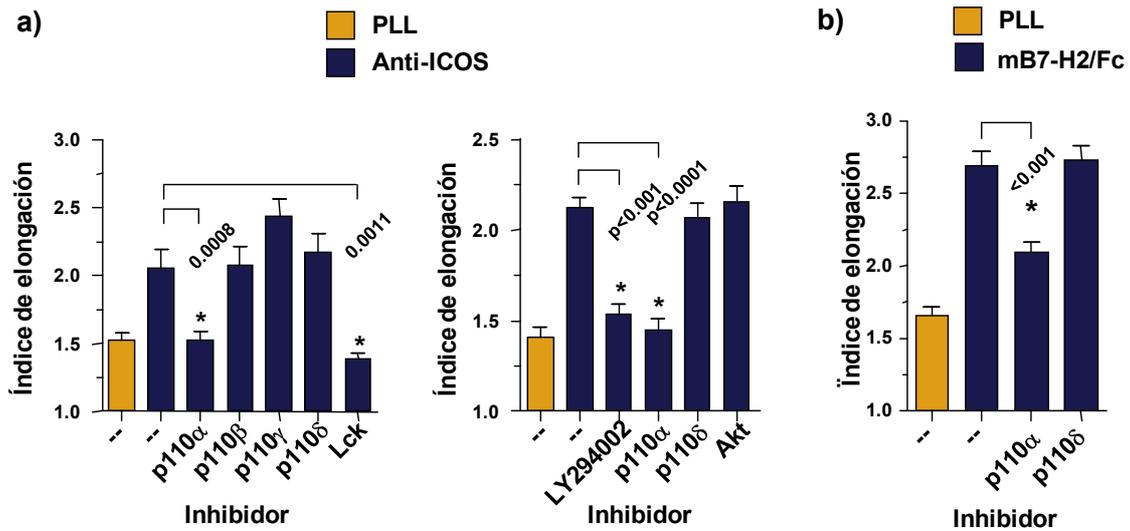


Figura 36. Papel de PI3-cinasa, Lck y Akt en la elongación celular inducida por ICOS.

a) Elongación inducida con anticuerpo anti-ICOS o Poli-L-Lisina (PLL), en presencia de inhibidores de PI3-cinasa (LY294002, 20 μ M) o de cada una de las subunidades catalíticas de PI3-cinasa (p110 α : PIK-75, 1 μ M; p110 β : TGX-221, 1 μ M; p110 γ : Inhibidor II, 12 μ M; o p110 δ : IC87114, 5 μ M), de un inhibidor de Akt (Triciribine, 5 μ M), de un inhibidor de Lck (inhibidor II, 200 nM) o en ausencia de estos, DMSO (---). **b)** Elongación inducida por la proteína recombinante B7-H2/Fc o Poli-L-Lisina (PLL). La media \pm ES del índice de elongación es de un experimento realizado dos veces con resultados similares. Las diferencias significativas en las células coestimuladas con ICOS ($p \leq 0,05$) fueron determinadas con la prueba t de Student.

Los resultados obtenidos demuestran que PI3-cinasa, en especial la subunidad catalítica p110 α , es necesaria para inducir cambios morfológicos inducidos por ICOS, que son independientes de la cinasa Akt. Para continuar determinando el mecanismo por el cual ICOS induce elongación en las células estudiadas, decidimos evaluar el papel de Vav-1, ya que estudios anteriores habían demostrado que la activación de PI3-cinasa dependiente de CD28, permitía la unión de PIP₃ al dominio PH de Vav-1 involucrado en la localización de Vav-1 en la membrana, reclutando a su vez a miembros de la familia de las Rho GTPasas como Rac1 y Cdc42 importantes en los cambios del citoesqueleto de actina. Para esto se transfectaron células SR.D10 con el plásmido pEGFP-C₂ (control) y el plásmido pEGFP-C₂-Vav con un mutante de Vav-1 que carece del dominio PH de unión a PI3-cinasa que actúa como dominante negativo en linfocitos T (Zugaza y cols., 2002); posteriormente se estudio la elongación inducida por ICOS (Figura 37). Tanto el índice de elongación como la superficie de contacto de las células activadas por ICOS disminuyen significativamente al ser transfectadas con el mutante de Vav-1 que carece del dominio PH en comparación con las células transfectadas con el plásmido control, indicando la importancia de la unión de Vav-1 a los productos de la PI3-cinasa para generar elongación celular inducida por ICOS.

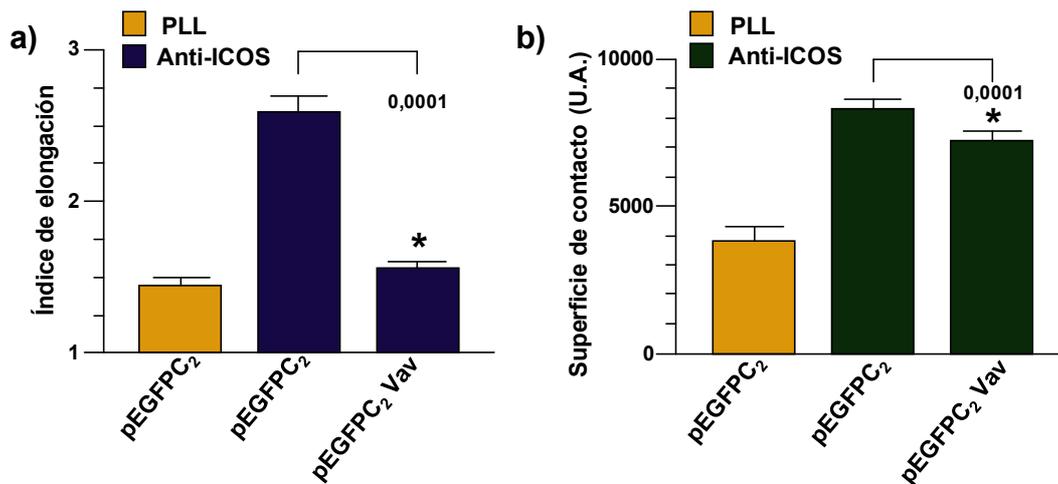


Figura 37. Papel de Vav-1 en la elongación celular inducida por ICOS.

Las células SR.D10 fueron transfectadas con los plásmidos pEGFP-C₂ (control) y pEGFP-C₂-Vav (mutante que carece del dominio PH de Vav-1) y posteriormente se incubaron sobre cristales recubiertos con PLL o anti-ICOS (10 μ g/ml). Las células que expresan GFP fueron analizadas para: **a)** El índice de elongación. **b)** La superficie de contacto celular. La media \pm ES del índice de elongación y la superficie de contacto es de un experimento realizado dos veces con resultados similares. Las diferencias significativas en las células coestimuladas con ICOS ($p \leq 0,05$) fueron determinadas con la prueba t de Student. U.A.: Unidades arbitrarias.

Un gran número de proteínas de la familia Rho están involucradas en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina. Para saber si Vav-1, por medio de su actividad GEF,

esta activando a las Rho GTPasas involucrándolas en este cambio inducido por ICOS, se transfectaron células SR.D10 con plásmidos dominantes negativos (DN) para cada uno de los miembros de esta familia: pEGFP-RhoA DN, pEGFP-Cdc42 DN, pEGFP-Rac-1 DN y un plásmido control (pEGFP). En las células transfectadas, con los DN para Rac-1 y Cdc42, se observó una disminución significativa de la elongación inducida por anti-ICOS, en comparación con las células transfectadas con el DN para RhoA (Figura 38 a) o con el plásmido control pEGFP. Por lo tanto, la elongación celular inducida solamente por ICOS es independiente de RhoA y dependiente de Rac-1 y Cdc42. Se observó una disminución no significativa en la superficie de contacto celular de las células transfectadas con el DN para Cdc42 (Figura 38 b).

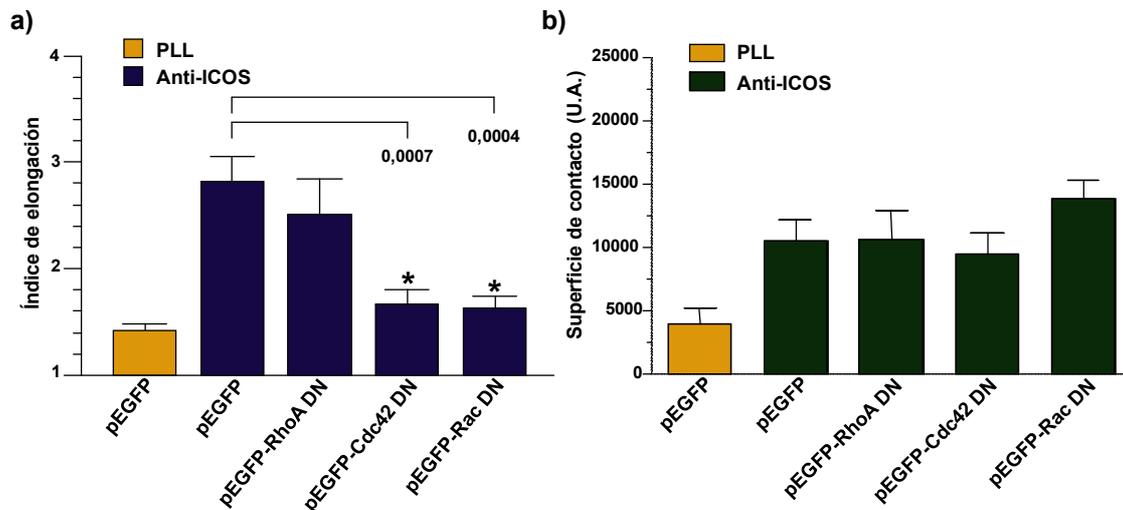


Figura 38. Papel de las Rho GTPasas en la elongación celular inducida por ICOS.

Las células SR.D10 fueron transfectadas con un plásmido pEGFP-C2 (control) y plásmidos dominantes negativos (pEGFP-RhoA DN, pEGFP-Cdc42 DN, pEGFP-Rac-1 DN), posteriormente se incubaron sobre cristales recubiertos con PLL o anti-ICOS (10 $\mu\text{g/ml}$). En las células que expresan GFP se analizó **a)** índice de elongación. **b)** superficie de contacto. Las diferencias significativas en las células coestimuladas con ICOS ($p \leq 0,05$) fueron determinadas con la prueba t de Student.

La actina filamentosa se encuentra organizada y anclada a los diferentes complejos de adhesión gracias a la activación de la miosina, producida por la fosforilación de su cadena ligera MLC; las cinasas involucradas en este proceso son, la cinasa dependiente de Rho (ROCK) activada por RhoA y la cinasa de cadena ligera de miosina (MLCK), activada por calcio y calmodulina (CaM).

Para conocer la importancia de estas cinasas en la elongación celular inducida por ICOS, se emplearon inhibidores específicos como el inhibidor de ROCK, H-1152 (1 μM , 10 μM); el inhibidor de MLCK, ML-7 (2 μM , 10 μM); el inhibidor de la actividad ATPasa de la miosina que permite la unión a actina, Blebbistatina (10 μM , 50 μM); y el inhibidor de calmodulina, W-7 (50 μM , 100 μM). Las células tratadas con el inhibidor de ROCK H-1152 no presentaron inhibición

de la superficie de contacto celular ni de la elongación inducida por ICOS (Figura 39), esto concuerda con los resultados encontrados al usar dominantes negativos de RhoA.

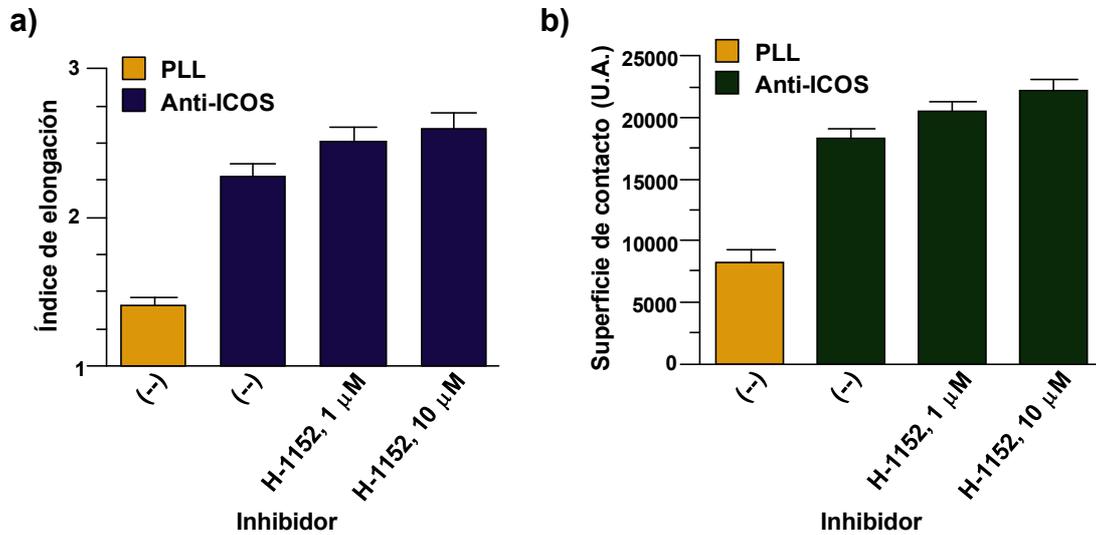


Figura 39. Papel de ROCK en la elongación celular inducida por ICOS.

Elongación inducida con anticuerpo anti-ICOS o Poli-L-Lisina (PLL), en presencia del inhibidor de ROCK (H-1152, 1 μ M; 10 μ M) o en ausencia de este, DMSO (---). **a)** Índice de elongación. **b)** Superficie de contacto celular. La media \pm ES del índice de elongación y la superficie de contacto es de un experimento realizado dos veces con resultados similares. Las diferencias significativas en las células coestimuladas con ICOS ($p \leq 0,05$) fueron determinadas con la prueba t de Student.

Al usar el inhibidor de MLCK, ML-7 se observa una disminución significativa en la elongación celular inducida por ICOS; en la superficie de contacto celular se encuentra una pequeña disminución que no es significativa al compararla con las células no tratadas. No se observó inhibición de la superficie de contacto ni de la elongación en las células tratadas con Blebbistatina, un inhibidor de actividad ATPasa de miosina (Figura 40).

El inhibidor de calmodulina, W-7, produce una disminución significativa de la elongación y de la superficie de contacto celular en las células estudiadas, sugiriendo que algunos de estos cambios morfológicos inducidos por ICOS son dependientes de la cinasa MLCK activada por calmodulina (Figura 41).

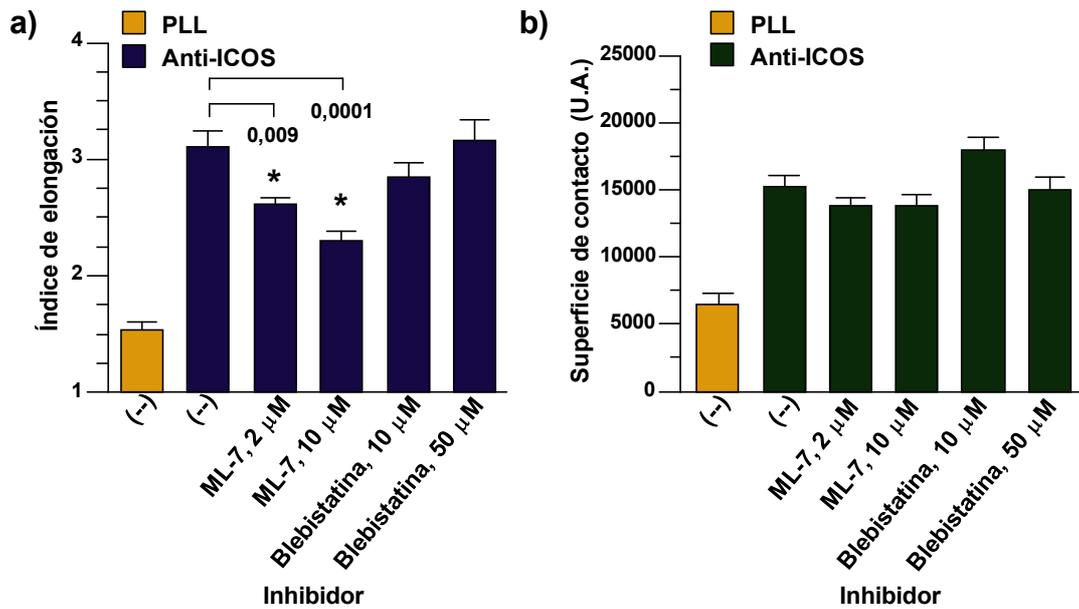


Figura 40. Papel de MLCK en la elongación celular inducida por ICOS.

Elongación inducida con anticuerpo anti-ICOS o Poli-L-Lisina (PLL), en presencia de un inhibidor de MLCK (ML-7, 2 μM; 10 μM) y un inhibidor de la actividad ATPasa de miosina (Blebbistatina, 10 μM; 50 μM) o en ausencia de éstos (DMSO, (--)). **a)** Índice de elongación. **b)** Superficie de contacto celular. Media ± ES del índice de elongación y la superficie de contacto es de un experimento realizado dos veces con resultados similares. Las diferencias significativas en las células coestimuladas con ICOS ($p \leq 0,05$) fueron determinadas con la prueba t de Student.

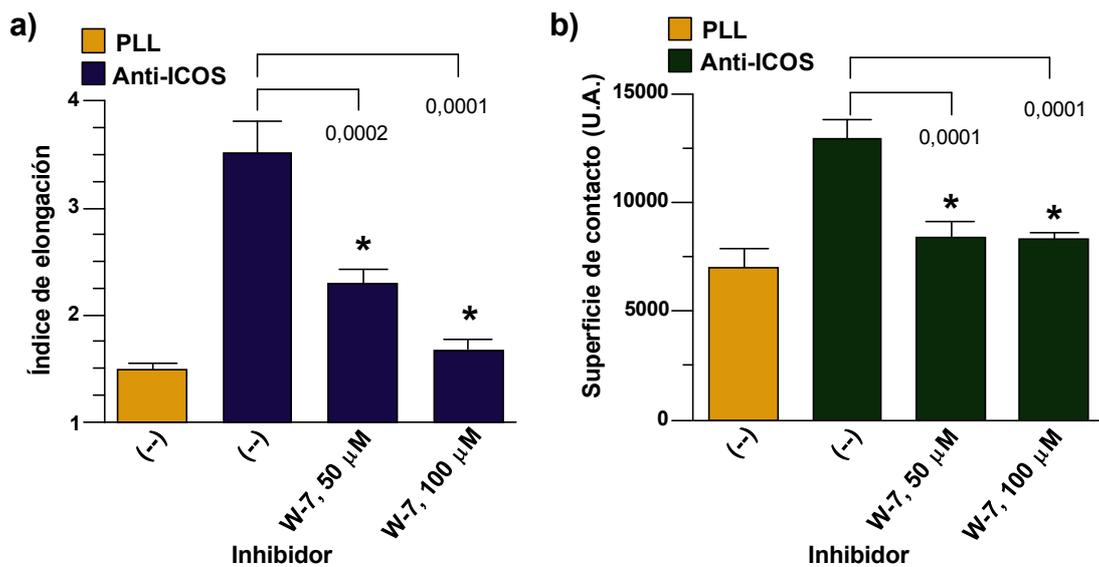


Figura 41. Papel de calmodulina en la elongación celular inducida por ICOS.

Elongación inducida con anticuerpo anti-ICOS o Poli-L-Lisina (PLL), en presencia del inhibidor de calmodulina (W-7, 50 μM; 100 μM) o en ausencia de éste (DMSO, (--)). **a)** Índice de elongación. **b)**

Superficie de contacto celular. Media \pm ES del índice de elongación y la superficie de contacto es de un experimento realizado dos veces con resultados similares. Las diferencias significativas en las células coestimuladas con ICOS ($p \leq 0,05$) fueron determinadas con la prueba t de Student.

También se encontró una clara disminución de la elongación y de la superficie de contacto celular al usar Dynasore, un inhibidor de la GTPasa dinamina que regula la dinámica de actina y la endocitosis (Figura 42).

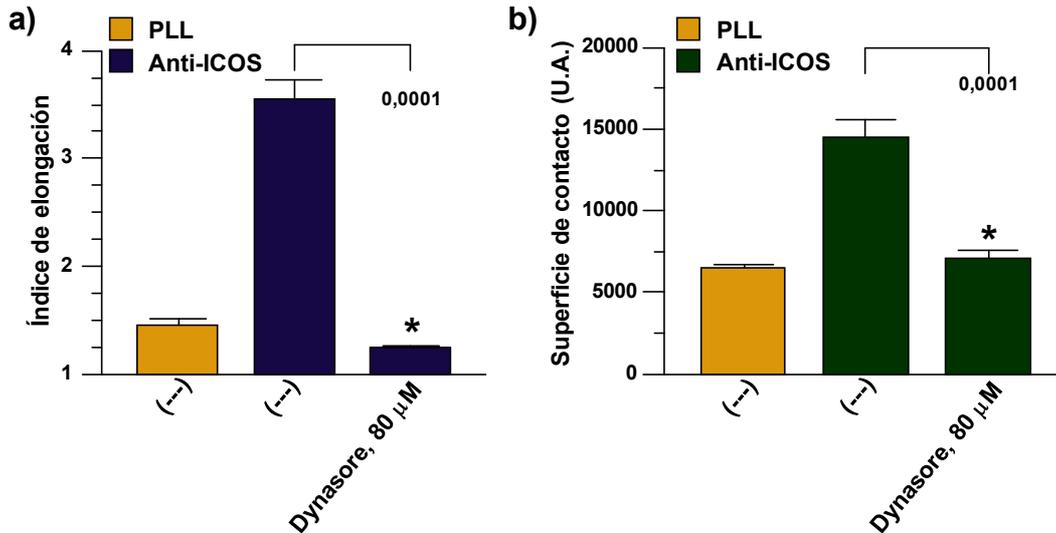


Figura 42. Papel de la GTPasa dinamina en la elongación celular inducida por ICOS.

Elongación inducida con anticuerpo anti-ICOS o Poli-L-Lisina (PLL), en presencia del inhibidor (Dynasore, 80 μM) o en ausencia de éste (DMSO, (---)). **a)** Índice de elongación. **b)** Superficie de contacto celular. Media \pm ES del índice de elongación y la superficie de contacto es de un experimento realizado dos veces con resultados similares. Las diferencias significativas en las células coestimuladas con ICOS ($p \leq 0,05$) fueron determinadas con la prueba t de Student.

En resumen, la actividad de PI3-quinasa y en especial de la subunidad catalítica p110 α , de Vav-1, de las GTPasas Rac-1, Cdc42 y dinamina, y de la quinasa MLCK activada a través de CaM son importantes en la polarización y de células T inducida por ICOS.

4.3.2 Gránulos de Actina inducidos por ICOS

Además de inducir elongación celular, la unión de ICOS con sus ligandos también induce la formación de gránulos densos o puntos de actina polimerizada que se encuentran muy cerca de la superficie de contacto célula-cristal. Para conocer si estos gránulos eran dependientes de PI3-quinasa, se utilizaron inhibidores específicos de cada subunidad y citocalasina D, capaz de unirse a filamentos de actina e inhibir su polimerización. Los gránulos de actina disminuyen en las células tratadas con citocalasina D y con el inhibidor general de PI3-quinasa, LY294002.

También el inhibidor específico de la subunidad catalítica p110 α de PI3-kinasa genera una disminución significativa en el número de gránulos por célula, al comparar con los inhibidores de las otras subunidades (Figura 43), esto concuerda con la inhibición de la elongación encontrada al usar el inhibidor de p110 α .

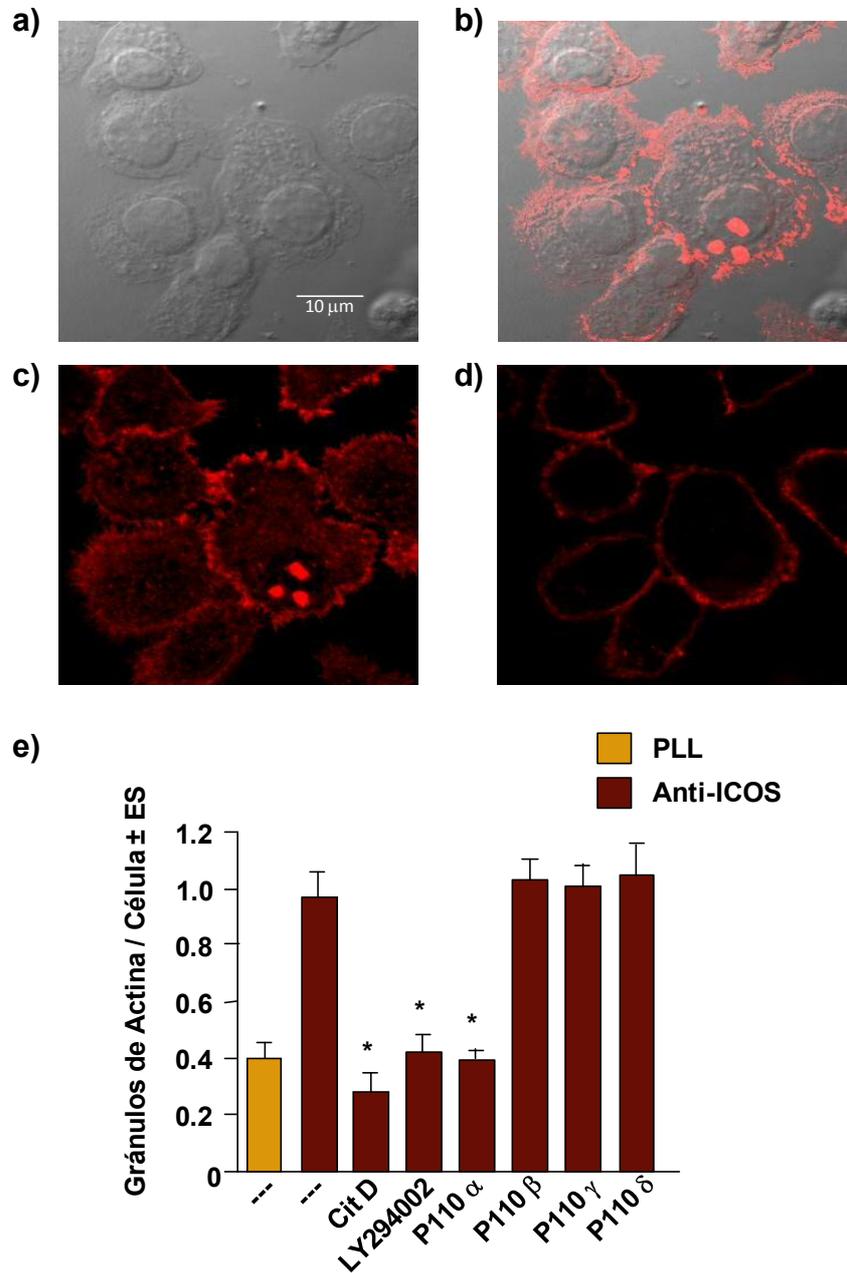


Figura 43. Gránulos de actina inducidos por ICOS.

Células SR.D10 incubadas durante 40 minutos en cubreobjetos recubiertos con anticuerpo Anti-ICOS (10 µg/ml) y teñidas con faloidina TRITC. a) DIC. b) Superposición "Overlay". c) Imagen a 1 micra de la superficie de contacto. d) Imagen a 4 micras de la superficie de contacto. e) Incubación en presencia de citocalasina D (10 µM), un inhibidor general de PI3-kinasa LY294002 (20 µM), un inhibidor de p110 α (PIK-75, 1 µM), un inhibidor de p110 β (TGX-221, 1 µM), un inhibidor de p110 γ (PI3-K γ Inhibidor II, 12 µM), un

inhibidor de p110 δ (IC87114, 5 μ M) o en ausencia de estos inhibidores (DMSO, (---)). Las diferencias significativas fueron determinadas con la prueba t de Student.

Con el fin de conocer si estos gránulos de actina podían tener una estructura semejante a los podosomas descritos en otras células, y que están implicados en procesos de adhesión, se estudió el papel de vinculina, una proteína de citoesqueleto que en los podosomas forma un anillo característico alrededor de un núcleo central de actina polimerizada. Para esto las células SR.D10 fueron incubadas sobre cristales recubiertos de anti-ICOS, y teñidas para F-Actina y vinculina (Figura 44). Como se puede observar, los anticuerpos empleados tiñen débilmente las células; la actina y la vinculina no colocalizan en estos gránulos inducidos por ICOS, y la vinculina no forma anillos alrededor de los acúmulos de F-actina.

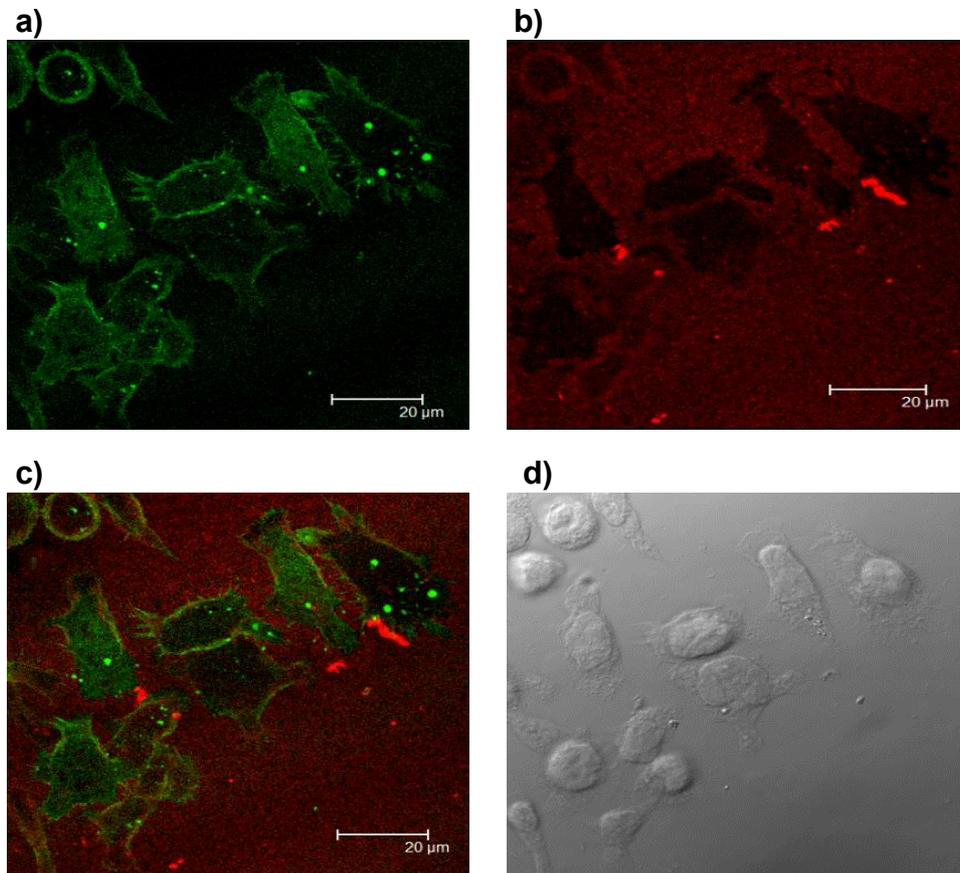


Figura 44. Distribución de vinculina y actina en células incubadas con ligandos de ICOS.

Células SR.D10 fueron incubadas sobre cristales recubiertos con anti-ICOS, posteriormente fueron teñidas para actina con faloidina-FITC (verde) y para vinculina con un anticuerpo monoclonal de ratón unido a Alexa 568 (Rojo). **a)** Tinción con faloidina-FITC. **b)** Tinción con vinculina. **c)** Doble tinción. **d)** DIC.

4.3.3 Disociación de la polimerización de actina y acumulación de “balsas” lipídicas por ligandos de ICOS

La activación de células T genera cambios drásticos en la morfología de la célula T, como reordenamientos del citoesqueleto de actina, necesarios para la producción de una sinapsis madura; se ve favorecida por una compartimentación funcional de lípidos en la membrana en microdominios de membrana enriquecidos en glicosfingolípidos (GEMs) o “balsas lipídicas” resistentes a determinados detergentes, que están enriquecidos en proteínas de señalización.

Hasta el momento hemos comprobado que la ligación de ICOS induce reorganización del citoesqueleto de actina y alargamiento de la célula T acompañado de un incremento de la superficie de contacto con el sustrato. Para comprobar si estos cambios son debidos a o están acompañados de la redistribución y localización de ICOS en las balsas lipídicas, células SR.D10 se incubaron con esferas recubiertas con anticuerpos específicos para ICOS, para CD4 (presente en balsas) o para CD45 (ausente en balsas) y posteriormente se tiñeron con faloidina-FITC y con la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) que se une a gangliósido GM1 característico de las balsas lipídicas. Las células incubadas con esferas recubiertas con anti-CD45, no presentaron en el sitio de contacto célula-esfera un aumento en la polimerización de actina ni acumulación de balsas lipídicas (Figura 45 a); las células incubadas con esferas recubiertas con anti-CD4, no presentaron en el sitio de contacto célula-esfera un aumento en la polimerización de actina pero si una clara acumulación de balsas lipídicas (Figura 45 b); las células incubadas con esferas recubiertas con anti-CD3, presentaron en el sitio de contacto célula-esfera una gran acumulación de actina polimerizada, acompañado por una pequeña fracción de balsas lipídicas (Figura 45 c); finalmente las células incubadas con anti-ICOS, presentaron en el sitio de contacto célula-esfera polimerización de actina pero no acumulación de balsas lipídicas (Figura 45 d).

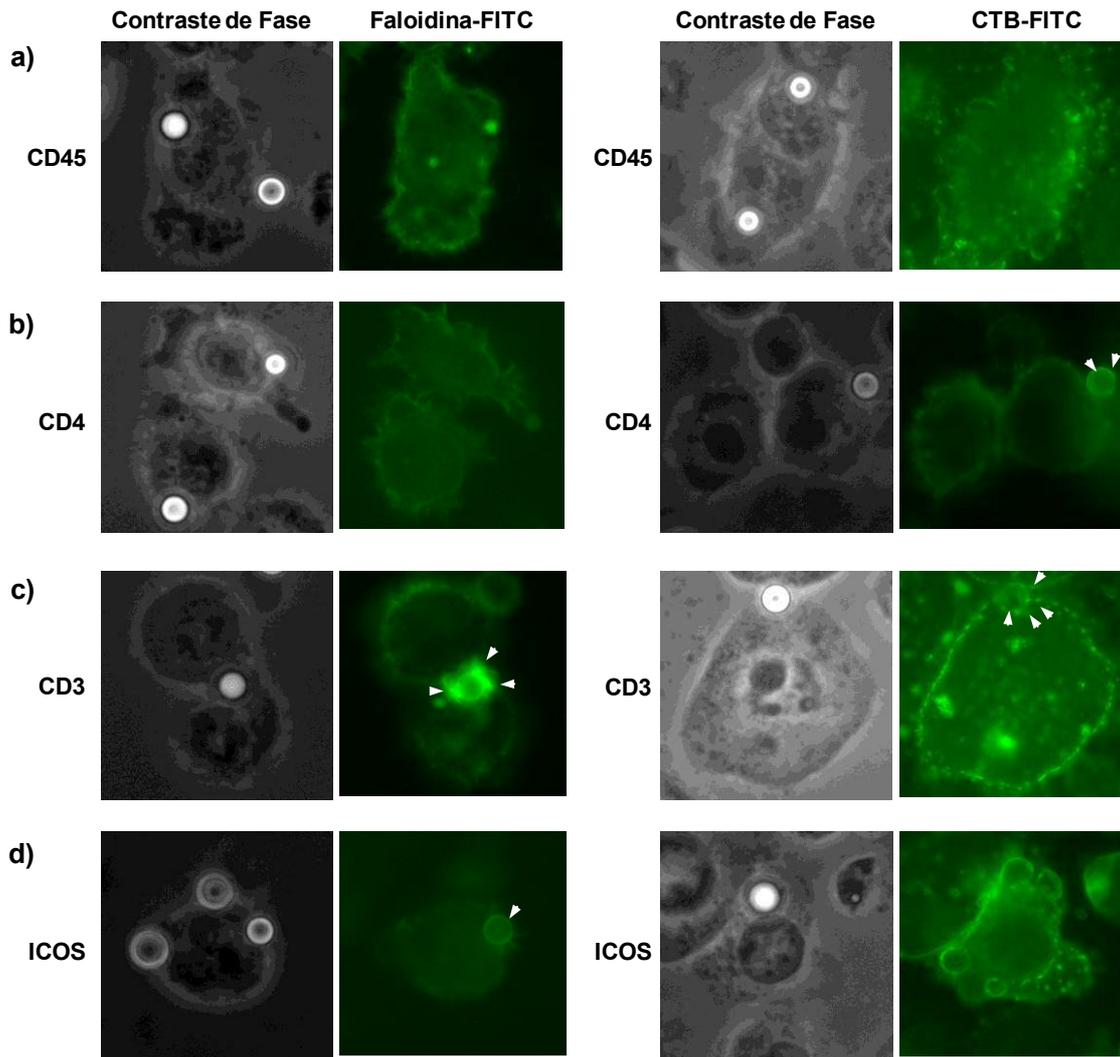


Figura 45. Efecto de la ligación de ICOS y de otras moléculas en la polimerización de actina y la acumulación de “balsas” lipídicas.

Células SR.D10 incubadas durante 40 min con esferas recubiertas con anticuerpos a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ a) anti-CD45. b) anti-CD4. c) anti-CD3. d) anti-ICOS; posteriormente fijadas y teñidas con faloidina-FITC y CTB-FITC. Las células se analizaron por contraste de fases y microscopía de fluorescencia. Barra: 10 μm .

Para confirmar la ausencia de ICOS en las balsas lipídicas, las células SR.D10 fueron lisadas con el detergente Tritón X-100 y los lisados fueron separados por ultracentrifugación en dos fracciones, la soluble y la insoluble: esta última corresponde a la fracción que contiene las balsas lipídicas. Estas fracciones fueron analizadas por “inmunoblot”, donde se observó claramente la presencia de la tirosinquinasa Lck en la fracción insoluble correspondiente a las balsas lipídicas, a diferencia de ICOS que no se detectó en esta fracción pero si en la fracción soluble; Vav se determinó como una proteína control ausente en las balsas (Figura 46 a).

La posibilidad de una transferencia de ICOS a las balsas lipídicas al coestimular con el ligando de ICOS o activando a través del TCR fue descartada, ya que ICOS no pudo ser detectado en las balsas mediante “inmunoblot” incluso tras del cruzamiento de estas moléculas con anticuerpos específicos (Figura 46 b).

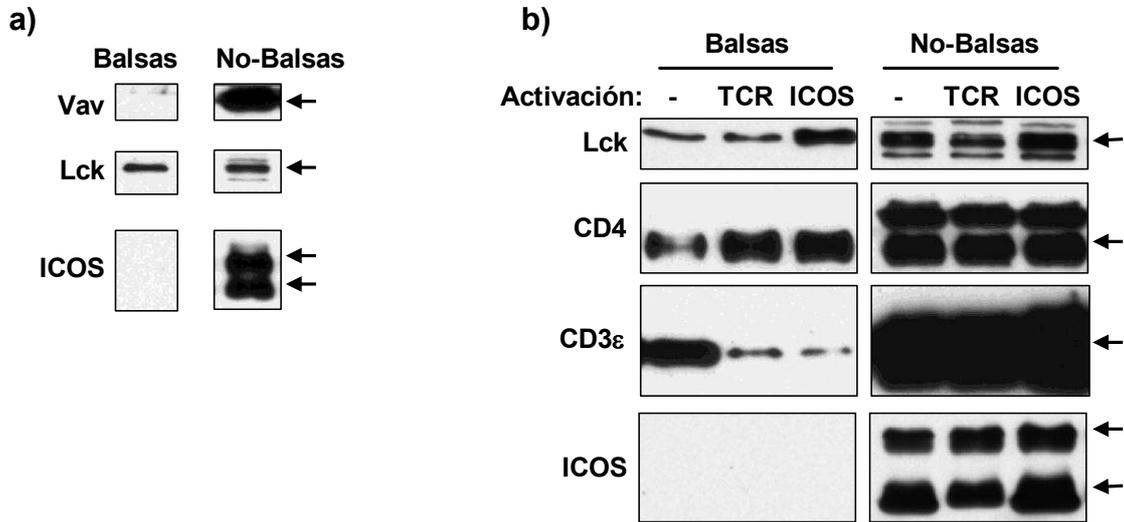


Figura 46. ICOS no está presente en las balsas lipídicas de lisados celulares.

a) Células SR.D10 fueron lisadas con Tritón X-100 y los lisados fueron separados por ultracentrifugación. Las proteínas de las fracciones se separaron por SDS-PAGE y se analizaron mediante “inmunoblot” con anticuerpos específicos para ICOS, para Lck (control positivo, presente en balsas) y para Vav (control negativo, ausente en balsas). **b)** Células SR.D10 fueron incubadas durante 15 min a 37°C con 10 µg/ml de anti-TCR (CD3) o anti-ICOS. Las células fueron lisadas, ultracentrifugadas y analizadas mediante “inmunoblot”.

Con el fin de comprobar un posible efecto sinérgico de ICOS con las señales del TCR/CD3 en la acumulación de balsas lipídicas, células SR.D10 fueron incubadas con esferas recubiertas con anti-CD3, que inducen acumulación de balsas lipídicas en el sitio de contacto célula-esfera (Figura 45 c) junto con anti-ICOS, que no indujo acumulación de balsas en el sitio de contacto (Figura 45 d). Se observó una clara acumulación de balsas lipídicas en el sitio de contacto al incubar las células con esferas recubiertas con los dos anticuerpos (Figura 47), comprobando que ICOS colabora con las señales del TCR/CD3 para la acumulación de balsas lipídicas en el sitio de contacto.

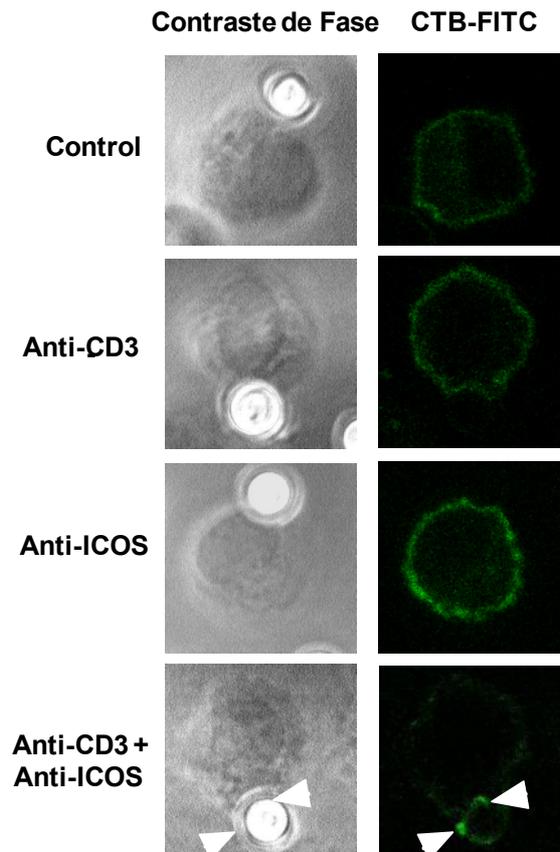


Figura 47. La ligación de CD3 más ICOS induce acumulación de balsas lipídicas en el sitio de contacto celular.

Células SR.D10 se incubaron con esferas de poliestireno recubiertas con anticuerpos monoclonales para CD3 (2 $\mu\text{g/ml}$), ICOS (10 $\mu\text{g/ml}$), o CD3 más ICOS. Las células se colocaron sobre cristales recubiertos con PLL y se incubaron durante 20 min a 37°C, posteriormente se fijaron y se tiñeron con CTB-FITC. Las células se analizaron por contraste de fases y microscopía de fluorescencia confocal.

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

El objetivo inicial de este trabajo fue la identificación por métodos proteómicos de moléculas susceptibles de asociarse específicamente al dominio citoplasmático de ICOS, como una vía para comprender mejor sus mecanismos de coestimulación. Los resultados obtenidos por estos métodos identificaron a las PI3-quinasas de clase IA como las únicas moléculas susceptibles de asociarse al dominio citoplasmático de ICOS.

5.1 UNIÓN DE LAS SUBUNIDADES DE PI3-CINASA DE CLASE IA A ICOS

Observamos que las subunidades de PI3-quinasa de clase IA ($p110\alpha$, $p85\alpha$, $p85\beta$ y $p50-55\alpha$) se unían específicamente a la cola citoplasmática de ICOS por medio de ensayos de pull down con péptidos fosforilados e inmunoprecipitados de ICOS. Está demostrado que la fosforilación en tirosina del motivo YMFM de ICOS permite su unión con el dominio SH₂ de la subunidad reguladora $p85$ de PI3-quinasa de manera similar al motivo YMMN de CD28 (Coyle *et al.* 2000, Harada *et al.* 2003, Zang *et al.* 2006). Sin embargo la coestimulación de ICOS muestra una mayor actividad de PI3-quinasa en células T en comparación con CD28 (Arimura *et al.* 2002).

Estudios en linfocitos T humanos demuestran que la expresión de ICOS conduce a la localización de la subunidad reguladora $p50\alpha$ en la sinapsis inmunológica a través del motivo YxxM (Fos *et al.* 2008). Nosotros encontramos una mayor unión relativa de las isoformas $p50-55\alpha$ a péptidos de ICOS fosforilado e inmunoprecipitados con ICOS en comparación con $p85\alpha$. Sin embargo, detectamos bajos niveles de la subunidad reguladora $p50\alpha$ de PI3-quinasa en blastos de linfocitos T CD4⁺ en comparación con linfocitos T CD4⁺ sin activar (ver figura 14 c). Estos datos confirman estudios en linfocitos humanos que han demostrado que células T sin activar presentan cantidades similares de la subunidad reguladora $p85\alpha$ y $p50\alpha$, pero al activarlas con fitohemaglutinina e IL-2 la cantidad de $p50\alpha$ disminuye, sin afectar la cantidad de $p85\alpha$ (Conley *et al.* 2012). El significado exacto y las consecuencias funcionales de estas diferencias en la expresión de las subunidades reguladoras, su asociación a motivos fosforilados YxxM, o su reclutamiento a la sinapsis están por determinar. Por ejemplo, hay datos de que la forma $p85\alpha$, (pero no $p55\alpha$ o $p50\alpha$) activa la PI(3,4,5)P₃ fosfatasa PTEN (“phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10”) y, por tanto, una mayor proporción de $p55\alpha$ o $p50\alpha$ favorecería el mantenimiento de los niveles de PI(3,4,5)P₃ (Barber *et al.* 2006). Sin embargo, esto contrasta con la mayor dificultad de activación de los linfocitos T en reposo frente a los blastos.

En cuanto a las subunidades catalíticas, fue sorprendente detectar una mayor unión de $p110\alpha$ a péptidos de ICOSpTir y a inmunoprecipitados de ICOS nativo fosforilado, en comparación

con p110 β y p110 δ (ver figuras 12 y 13). Los bajos niveles de p110 β eran esperables, debido a los bajos niveles de ARNm encontrados en las células estudiadas, pero los bajos niveles relativos de p110 δ no eran esperables, siendo esta subunidad una de las más abundantes en linfocitos T (Chantry *et al.* 1997, Vanhaesebroeck *et al.* 1997).

La subunidad reguladora p85 ejerce una función dual sobre la subunidad catalítica p110, le proporciona estabilidad -ya que es térmicamente lábil- e inhibe su actividad lípido-cinasa (Yu *et al.* 1998). La unión de p85 a secuencias fosforiladas específicas aumenta la actividad catalítica de las subunidades p110 (Yu *et al.* 1998), igual que la interacción con proteínas de la familia Ras (Rodríguez-Viciano *et al.* 2004). Los datos existentes, en ensayos de inmunoprecipitación de subunidades catalíticas, sugieren que cada isoforma catalítica p110 se une a la isoforma reguladora p85 sin preferencias aparentes (Vanhaesebroeck *et al.* 1997, Yu *et al.* 1998). Sin embargo, la inmunoprecipitación de la subunidad reguladora nos demostró una unión preferencial de la subunidad catalítica p110 α por la subunidad reguladora, explicando la abundancia de p110 α asociada a ICOS. También la inmunodepleción de la subunidad reguladora provocó la pérdida de la subunidad catalítica p110 α , sin afectar los niveles de la subunidad catalítica p110 δ . Es poco probable que estos resultados se deban a que el anticuerpo utilizado para la depleción de la subunidad reguladora no reconoce las isoformas p85 β y p55 γ , ya que el anticuerpo utilizado no es específico de isoforma, y además las subunidades reguladoras p85 β y p55 γ se expresan en células linfoides en pequeñas cantidades en comparación con las isoformas α (Alcazar *et al.* 2009, Pons *et al.* 1995) y no se ha descrito hasta el momento una asociación preferencial en la formación del dímero p110 δ /p85 β o p110 δ /p55 γ .

Al comprobar si la unión preferencial de p110 α a la subunidad reguladora se mantenía cuando las células expresan cantidades similares de las proteínas p110 α y p110 δ de manera exógena, eliminando las diferencias en los niveles endógenos, volvimos a encontrar una mayor abundancia de la subunidad catalítica exógena p110 α en inmunoprecipitados de la subunidad reguladora (ver figura 16). Sin embargo, al inmunoprecipitar las subunidades catalíticas exógenas no observamos una diferencia marcada en los niveles de la subunidad reguladora asociada (ver figura 17). Este resultado sí estaba en consonancia con trabajos previos que muestran que al inmunoprecipitar las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ no se presentan asociaciones diferenciales de la subunidad reguladora (Papakonstanti *et al.* 2008, Vanhaesebroeck *et al.* 1997). Por tanto, creemos que hay diferencias en la fuerza de la interacción de p110 α y p110 δ con las subunidades reguladoras p85, pero que éstas diferencias sólo se manifiestan claramente cuando se precipitan éstas últimas. Esto es posiblemente debido a que en estas condiciones hay una competencia más libre entre las subunidades p110 α y p110 δ por su unión a p85 que cuando se precipitan subunidades catalíticas.

La posibilidad de que exista una interacción más débil entre p110 δ y la subunidad reguladora en comparación con p110 α se ve apoyada por un estudio de propiedades bioquímicas y diferencias cinéticas de las isoformas de PI-3 cinasa de clase IA usando como sustrato PIP₂ en un liposoma PIP₂/PS. En él se demuestra que la actividad específica del dímero p85 α /p110 α es tres a cuatro veces mayor que la observada con las isoformas p110 δ , p110 β y p110 γ (Meier *et al.* 2004).

También, al silenciar las subunidades catalíticas p110 α (ver figura 18), p110 δ (ver figura 20), o las dos subunidades (ver figura 21) no observamos cambios significativos en la subunidad reguladora p85. Datos similares se encontraron en células endoteliales donde al silenciar las subunidades catalíticas no se observaron cambios en los niveles de expresión de la subunidad reguladora (Cain *et al.* 2010). Pero sí observamos un aumento de la subunidad catalítica p110 β , probablemente para compensar, al menos parcialmente, la pérdida de las subunidades p110 α y p110 δ . La subunidad catalítica p110 β ha demostrado un papel importante en la proliferación “in vitro” de leucocitos deficientes en p110 α/δ en comparación con células normales (Foukas *et al.* 2010).

Otra posibilidad es sugerida por los resultados de qRT-PCR donde los niveles de ARNm de las de cada una de las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ son similares entre sí y con los de la subunidad reguladora α (ver figura 10). Esto generaría un exceso de ARNm de las subunidades catalíticas ($\alpha+\delta$) sobre la subunidad reguladora α , y produciría una fracción de estas subunidades catalíticas en forma libre como monómeros. Dada la unión preferencial de p110 α a la subunidad reguladora, la subunidad libre sería mayoritariamente p110 δ . Además, se ha descrito que polipéptidos de las subunidades catalíticas p110 β y p110 δ son reclutados a la membrana por receptores acoplados a proteínas G (Guillemet-Guibert *et al.* 2008) o por la GTPasa TC21 respectivamente (Delgado *et al.* 2009) sin que en esta unión intervenga directamente la subunidad reguladora. Es interesante señalar que la GTPasa TC21 a la que se asocia p110 δ se asocia constitutivamente con el TCR en células T (Delgado *et al.* 2009) y está directamente involucrada en sus señales, lo cual explicaría el importante papel de p110 δ en la activación por antígeno.

5.2 PAPEL DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA p110 α EN LA ACTIVACIÓN DEL TCR Y LA COESTIMULACIÓN

A pesar de la importancia de CD28 en la señalización, ratones deficientes en esta molécula son capaces de generar una respuesta eficaz ante infecciones virales (Whitmire & Ahmed 2000); además la secreción de citocinas efectoras como IFN- γ e IL-4 es normal cuando la estimulación se da por células presentadoras de antígeno carentes de B7.1/B7.2 (Schweitzer & Sharpe 1998). Lo anterior sugiere que otra molécula coestimuladora puede compensar la ausencia de CD28 y actuar eficientemente, como es el caso de ICOS. En efecto, su señal coestimuladora

aumenta la proliferación de células T y contribuye a la secreción de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10, e IL-21.

La señalización de CD28 se inicia por la activación de dos cascadas de señalización, la primera es iniciada por una región distal rica en prolinas, en la cual el motivo PYAP se une y activa a la cinasa Lck; este motivo se une además a Fyn, GADS, GRB-2 y filamina-A (Boomer & Green 2010). La segunda cascada, requiere la fosforilación en tirosina del motivo citoplasmático YMMN (YMFN en ICOS) de unión a diferentes proteínas adaptadoras como GRB-2 y GADS o a la subunidad reguladora p85 de PI3-cinasa. Además CD28 posee un motivo C-terminal AAYRP ausente en ICOS, con el cual se une a la subunidad reguladora p85 β de PI3-cinasa (Alcazar *et al.* 2009). Estas diferencias generan implicaciones funcionales en las señales coestimuladoras medidas por CD28 o por ICOS (Harada *et al.* 2003)

Este trabajo, junto con trabajos previos, muestran que ICOS asocia solamente o principalmente PI3-cinasa (Coyle *et al.* 2000, Feito *et al.* 2003, Zang *et al.* 2006), siendo un importante activador de la vías de señalización dependientes de PI3-cinasa en células activadas. La ligación de ICOS genera una fuerte fosforilación en las moléculas efectoras de esta cinasa como PDK1 y Akt, y en cierta medida MAPKs (ERK, JNK y p38) (Arimura *et al.* 2004, Fos *et al.* 2008, Okamoto *et al.* 2003).

En nuestro estudio se observó una fuerte fosforilación de Akt (Ser₄₇₃) en células de la línea SR.D10 activadas con anti-CD3 y anti-ICOS. Esta activación temprana de Akt fue bloqueada parcialmente al inhibir las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ de PI3-cinasa con siARN o con inhibidores farmacológicos, confirmando la importancia de estas subunidades en la activación de Akt. La inhibición de la fosforilación de Akt al silenciar la subunidad catalítica p110 α se puede explicar por la inhibición parcial de la unión de esta subunidad a ICOS (ver figura 11), comprobando una vez más la unión preferencial de p110 α a ICOS.

Ensayamos también el efecto de inhibidores sobre la fosforilación de Akt inducida por anti-CD3 y anti-ICOS en blastos de linfocitos T CD4⁺. La fosforilación en la Treonina 308 de Akt fue inhibida eficientemente por inhibidores de p110 α (A66), p110 δ (IC87114), o de todas las isoformas (LY294002); mientras que la fosforilación en la Serina 473 fue inhibida parcialmente por el inhibidor de p110 α (A66), y totalmente por el de p110 δ , o por LY294002. Se ha descrito que la fosforilación en la Treonina 308 es dependiente de la cinasa PDK1, cuya activación a su vez es directamente dependiente de la actividad PI3-cinasa. La fosforilación de Akt en la Serina 473 depende del complejo mTORC2 y también es iniciado por las PI3-cinasas (Chi 2012).

La fosforilación de Erk aumenta moderadamente en las células SR.D10 activadas con anti-CD3 y anti-ICOS, y disminuye al usar el inhibidor de p110 α . En contraste, en las células “knockdown” para p110 α observamos un ligero incremento. La fosforilación de Erk fue más resistente al efecto del inhibidor de p110 δ , pero en las células “knockdown” para p110 δ la fosforilación de Erk fue inhibida. Esto demuestra que la pérdida de la expresión de la subunidad catalítica p110 α o p110 δ de PI3-cinasa en las células silenciadas genera un desequilibrio en

PI3-cinasa y en las señales diana de la coestimulación por ICOS. En cambio, el uso de inhibidores provoca un efecto en la actividad de la subunidad, no en su abundancia. Así, la subunidad catalítica p110 α puede ser requerida en la activación eficaz de Akt, pero no lo suficiente en la activación de Erk. Esta resistencia a la inhibición de Erk concuerda con el trabajo de Okkenhaug donde la fosforilación de Erk mediada por CD28 no se ve afectada en ratones transgénicos para una forma mutante de p110 δ (p110^{D910A/D910A}) sin actividad cinasa (Okkenhaug *et al.* 2006). En el caso de la fosforilación de Erk en blastos, se observa un efecto similar: ni la inhibición de p110 α ni la de p110 δ tienen efecto aisladamente. Sin embargo, al inhibir con LY294002 se observa que la activación de Erk es dependiente de PI3-cinasas y que necesita de la inhibición de todas las subunidades para verse afectada, como se ha descrito previamente en la coestimulación por ICOS en células de la línea SR.D10 (Feito *et al.* 2003).

ICOS participa en la formación de centros germinales y en la interacción entre la célula B y T, a través de la vía CD40/CD40L (McAdam *et al.* 2001, Tafuri *et al.* 2001). Además, la señalización mediante el TCR y moléculas coestimuladoras como ICOS y CD28 regulan la expresión de CD40L en las células T (Kaminski *et al.* 2009). Es por esto que ICOS es fundamental para el cambio de isotipo en la respuesta primaria y secundaria de células B-dependiente de células T. Se ha descrito que la subunidad catalítica p110 δ tiene un papel importante en la señalización mediada por ICOS, ya que blastos de células T p110 δ ^{-/-} presentan una disminución en la fosforilación de la isoforma GSK3 β , que es fosforilada e inhibida por p-Akt después de la coestimulación con ICOS (Rolf *et al.* 2010). La PI3-cinasa es fundamental en la formación de las células Th foliculares (T_{FH}), y particularmente la actividad catalítica de p110 δ es necesaria para que las células T proporcionen una ayuda eficiente a las células B; siendo requerida esta subunidad p110 δ en la generación de reacción de los centros germinales (CG) y en la inducción del linaje T_{FH} "in vivo" (Rolf *et al.* 2010).

Algunos estudios con ratones deficientes en p110 δ ^{-/-} han demostrado daños en las señales del receptor de células B pero no en el receptor de células T (Jou *et al.* 2002). Sin embargo, estudios en ratones con una mutación puntual (D910A) en la subunidad catalítica p110 δ , demuestran la importancia de esta subunidad en la expansión clonal, en la diferenciación de células T y en la secreción de citocinas Th1 y Th2 (Okkenhaug *et al.* 2006). Además el inhibidor de p110 δ bloquea la proliferación de linfocitos T y la secreción de citocinas inducidas tras la activación con anti-CD3 más anti-CD28 (Ji *et al.* 2007).

Según nuestros resultados la secreción de IL-4 e IL-10 es dependiente de la vía PI3-cinasa/Akt, ya que el inhibidor general de PI3-cinasa (LY294002) y de las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ inhiben la secreción de citocinas (IL-4, IL-10) inducida por la activación TCR/CD3 y por la coestimulación con ICOS en células SR.D10. En blastos de células T CD4⁺ tratados con concentraciones más bajas de los dos inhibidores de p110 α (PIK-75, 0,01 μ M; A66, 1 μ M), no se observó un efecto significativo sobre la producción de IL-4 o IL-10,

pero si sobre la producción de IFN- γ , y ligeramente la producción de IL-2 (ver figura 24). La síntesis de IFN- γ es especialmente sensible a la inhibición de la subunidad catalítica de p110 α . Se ha visto que la producción de IFN- γ parece en gran medida dependiente de la activación de Akt en la Serina 473 (Chi 2012), y en nuestro caso el grado de inhibición de la síntesis de IFN- γ se correlaciona bien con la inhibición de la fosforilación de Akt en esta Serina.

Es claro que la ligación de ICOS induce una fuerte activación de Akt y estudios previos han demostrado que la inactivación de GSK3 mediada por Akt incrementa la producción de IL-10 (Fos *et al.* 2008); además Akt1 promueve la activación de NF-AT a través de la fosforilación de proteínas Homer que se unen a NF-AT (Huang *et al.* 2008). La activación de NF-AT es esencial para la secreción de IL-4 en células D10, en donde la ciclosporina A bloquea la secreción de esta citocina (Feito *et al.* 2003) y la inhibición de PKA afecta la activación del promotor de IL-4 generada por PDK1-PH (Nirula *et al.* 2006). También se ha demostrado que ICOS, regula la diferenciación Th2 a través de la inducción del factor de transcripción c-Maf, ya que células T ICOS^{-/-} presentan un defecto en la expresión de IL-4 asociado a una deficiencia funcional en el factor de transcripción c-Maf (Nurieva *et al.* 2003a).

Nuestros resultados demuestran la importancia de la subunidad catalítica p110 α de PI3-cinasa, por su unión preferencial a la subunidad reguladora y como consecuencia de ello a ICOS. También muestran el papel de esta subunidad en la activación de TCR y la coestimulación con ICOS, por el efecto que tiene el silenciamiento de la subunidad en las vías de señalización mediadas por ICOS, y el efecto de inhibidores específicos de la subunidad en la producción de citocinas.

Una observación sorprendente es que ratones con mutaciones en el motivo YMNМ capaces de eliminar la asociación de PI3-cinasa y la fosforilación de Akt dependiente de CD28 no tienen un efecto claro sobre la secreción de IL-2, la inducción de la proteína anti-apoptótica Bcl-X_L, o numerosas funciones de los linfocitos T “in vivo” (Dodson *et al.* 2009). En contraste, un motivo rico en prolinas C-terminal (PYAP) es necesario para la fosforilación en tirosinas de la cinasas PDK1, PKC- θ , y GSK3 β y la fosforilación en treonina de Akt (Boomer & Green 2010, Dodson *et al.* 2009, Friend *et al.* 2006).

PKC- θ , que es esencial para la proliferación y la producción de IL-2, se asocia indirectamente a CD28 al unirse al dominio SH₃ de Lck, que posiblemente por su dominio SH₂ se une al motivo rico en prolinas PYAP fosforilado (Kong *et al.* 2011). Este motivo PYAP y Lck, y no el motivo YMNМ, es también importante para la diferenciación de linfocitos T reguladores (Lio *et al.* 2010, Vang *et al.* 2010).

Puesto que no es esencial para el desarrollo de linfocitos y de respuestas “in vivo”, cabe preguntarse entonces cuál es la función del motivo YMNМ y de la asociación de PI3-cinasas de clase IA a este motivo en la función de CD28. Los estudios que se mencionan anteriormente muestran que este motivo no es esencial “in vivo”, pero esto no significa que, en condiciones normales, no tenga una función importante. Numerosos estudios indican la importancia de PI3-

cinasas y los fosfolípidos de inositol en la activación de linfocitos T y en la coestimulación por CD28. Está bien establecido que CD28 recluta PI3-cinasas, y aunque la actividad PI3-cinasa asociada no es tan alta como en ICOS no significa que sea despreciable o innecesaria (Parry *et al.* 2003). Así, p.e., la eliminación en linfocitos T de la fosfatasa PTEN también elimina la necesidad de coestímulo por CD28 (Buckler *et al.* 2006). Es muy posible que en ausencia de los motivos YMNM de CD28, las PI3-cinasas empleen modos de reclutamiento a membranas y de activación alternativos (Deane & Fruman 2004, Parry *et al.* 2003), incluyendo de modo destacado el reclutamiento de p110 δ al receptor de antígeno mediado por ciertas proteínas de la familia Ras (Delgado *et al.* 2009). Tanto p110 δ como p110 γ intervienen en la activación por el TCR (Alcazar *et al.* 2007, Okkenhaug *et al.* 2006, Soond *et al.* 2010); el inhibidor de p110 δ , IC87114 inhibe tanto la proliferación como la producción de citocinas en linfocitos T CD4⁺ activados por antígeno “in vitro”. Hemos podido confirmar esta inhibición, pero también la inhibición por inhibidores de p110 α de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ “naive” activados con anti-CD3 y CD28.

5.3 CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LINFOCITOS T INDUCIDOS POR ICOS

ICOS y otras moléculas como CD28 y CTLA-4 son capaces de generar señales intracelulares responsables de los cambios en el citoesqueleto de actina en células T. Nuestros resultados indican que, en células T, la interacción de ICOS con sus ligandos produce un aumento de la superficie de contacto con el sustrato, elongación celular y polimerización de actina inducida que es independiente de las señales del TCR/CD3 (ver figura 35).

Publicaciones previas han descrito que la inducción de la elongación celular mediada por la ligación con ICOS depende de PI3-cinasa (Franko & Levine 2009, Nukada *et al.* 2006). Nuestro trabajo confirma que el fenotipo de células T elongadas inducido por ICOS requiere de la actividad de PI3-cinasa de clase IA; así mismo, la subunidad catalítica p110 α es indispensable en la elongación celular, en comparación con la subunidad catalítica p110 δ .

Además de inducir elongación celular, la unión de ICOS con sus ligandos también induce la formación de gránulos densos o puntos de actina polimerizada que se encuentran muy cerca de la superficie de contacto célula-cristal. Al igual que en la elongación celular inducida por ICOS, estos gránulos también son dependientes de PI3-cinasa y específicamente de la subunidad catalítica p110 α .

Las tirosina-cinasas de la familia Src Fyn y Lck están implicadas en la fosforilación de las tirosinas que reclutan PI3-cinasas en moléculas de la familia CD28 como CTLA-4 (Hu *et al.* 2001). Esto está posiblemente facilitado por la interacción de estas tirosina-cinasas con PI3-cinasas por medio de sus dominios SH₃ (Prasad *et al.* 1993a, Prasad *et al.* 1993b). De acuerdo con estos datos, la elongación y la reorganización del citoesqueleto de actina inducidos por ICOS son bloqueados por un inhibidor de la tirosina-cinasa Lck (ver figura 36). La activación de PI3-cinasa produce el reclutamiento de proteínas de señalización celular que contienen

dominios de homología pleckstrina (PH) a la membrana plasmática, incluyendo Akt y Vav. Existen datos que demuestran que la extensión del citoplasma, la reorganización del citoesqueleto de actina y las formaciones filopodia y “microspikes” inducidas por ICOS no se ven afectadas con la inhibición de la vía de señalización Akt (Franko & Levine 2009). En otra molécula de la familia de CD28, como CTLA-4, la polarización celular y los cambios morfológicos requieren de la actividad de Vav-1, y no de la activación de Akt (Wei *et al.* 2007). Del mismo modo, la ausencia de Vav reduce la polimerización de actina inducida por el TCR (Fischer *et al.* 1998). Los resultados expuestos en este trabajo muestran que los cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por ICOS son independientes de la vía de Akt y dependientes de Vav.

Vav posee un dominio DH de actividad GEF que le permite promover el intercambio de GDP por GTP en proteínas G, lo que conduce a la activación de proteínas como Rho, Rac y Cdc42, las cuales controlan una variedad de eventos celulares como la supervivencia de linfocitos, la proliferación, la diferenciación y además, tienen un papel importante en la adhesión, forma y movilidad celular, a través de cambios en el citoesqueleto de actina (Sanchez-Madrid & del Pozo 1999). Rho A regula la formación de fibras de estrés y adhesiones focales, Rac-1 controla la formación de lamelipodia y Cdc42 regula la formación de filopodia y “microspikes” (Acuto & Cantrell 2000).

En este trabajo encontramos que algunos miembros de la familia de las Rho GTPasas son esenciales para la elongación celular mediada por ICOS. La expresión de formas dominantes negativas para Rac-1 y Cdc42 muestran la disminución de la elongación inducida por ICOS (ver figura 38). Mientras que, la expresión de la forma dominante negativa para RhoA y el uso del inhibidor de ROCK, efector de RhoA, no afectan la elongación ni la superficie de contacto celular. Lo anterior sugiere que la elongación celular inducida por ICOS requiere la actividad GTPasa de Rac-1 y Cdc42, pero no de RhoA. Estos resultados no concuerdan con los datos de Nukada y cols., que muestran que tanto las vías de señalización Rac/Cdc42/PAK como la de RhoA/ROCK son importantes en la elongación celular inducida por ICOS (Nukada *et al.* 2006). En cambio, Franko y Levine han reportado que la inhibición de Rho o ROCK no afecta a los cambios en el citoesqueleto de actina inducido por ICOS, o incluso puede aumentar su magnitud (Franko & Levine 2009, Nukada *et al.* 2006). Esto concordaría con estudios previos con otra molécula coestimuladora como CD28, que demuestran que su señalización estimula mecanismos de adhesión celular en el sitio de contacto célula T/CPA dependientes de Rac-1 y Cdc42 pero no de RhoA (Kaga *et al.* 1998), o los estudios sobre la elongación inducida por CTLA-4, que es dependiente de Cdc42 e independiente de RhoA, ROCK, y Akt (Wei *et al.* 2007).

La familia de cinasas PAKs son activadas por Rac y Cdc42 (Chong *et al.* 2001); la vía Rac/Cdc42/PAK tiene un papel fundamental en la regulación del citoesqueleto de actina porque interactúa y fosforila numerosas proteínas implicadas en los cambios en el citoesqueleto de actina (Szczepanowska 2009). PAK3 es inducida tras la activación de células T, mientras que

PAK1 está expresada constitutivamente en células T “naive” o activadas; estas dos cinasas (PAK1/PAK3) están involucradas en la elongación de células T inducida por ICOS (Nukada *et al.* 2006). Existen evidencias que demuestran que Rac puede unirse directamente con la subunidad reguladora p85 de PI3-cinasa; esta interacción es a través del dominio de homología BCR de p85 y el dominio efector de Rac-GTP. Es posible que exista una retroalimentación positiva en la que Rac, una vez activado por PI3-cinasa, puede activar más PI3-cinasa. Este ciclo de retroalimentación positiva puede desempeñar un papel crucial en el establecimiento de la polaridad celular (Welch *et al.* 2003).

Los cambios dinámicos del citoesqueleto dependen de la red de actina-miosina. La forma polimerizada de actina se une a la miosina, por medio de su cadena ligera de miosina (MLC), la cual es activada por MLCK o por ROCK. Se ha demostrado que CTLA-4 requiere de la actividad de Vav-1, Cdc42 para inducir polarización celular con incremento en la formación de filopodia y lamelipodia, sin necesitar la actividad de RhoA o de ROCK, pero sí la actividad de MLCK (Wei *et al.* 2007). Nuestros datos concuerdan con el trabajo de Wei, ya que al usar el inhibidor de MLCK se inhibe la elongación celular.

Un regulador de la actividad de MLCK es calmodulina, la cual activa MLCK mediante la unión a su dominio regulador (Lukas *et al.* 1986). El tratamiento con el inhibidor de calmodulina W-7, disminuye la extensión del citoplasma en células Jurkat (Smith *et al.* 2003), y también inhibe eficazmente la elongación y la superficie de contacto de linfocitos T mediada por ICOS, reflejando su efecto del inhibidor de MLCK. El hecho de que inhibidores de calmodulina y de MLCK pero no de ROCK, afecten la elongación celular evidencia que la actividad cinasa de MLCK es importante en los cambios morfológicos inducidos por ICOS. Sorprendentemente, encontramos que Blebbistatina, un inhibidor de la actividad ATPasa de miosina (Straight *et al.* 2003), no tenía efecto sobre la elongación celular o el aumento de la superficie de contacto inducida por ICOS. Es posible que ello sea debido a que sean miosinas no convencionales de tipo I las implicadas en el efecto de ICOS. Hay que tener en cuenta que estas miosinas no son inhibidas por Blebbistatina (Straight *et al.* 2003), pero en cambio mantienen los motivos de unión a calmodulina. Además, es muy interesante que estas miosinas se asocian a las membranas por medio de dominios de pleckstrina que se unen a fosfatidilinositol trifosfatos (los productos de PI3-cinasa) (Maravillas-Montero *et al.* 2011, Patino-Lopez *et al.* 2010). Por último, datos recientes muestran que miosinas de tipo 1 están implicadas en el control del citoesqueleto de linfocitos, y de hecho en linfocitos B participan en la elongación celular inducida por ligandos de CD44 (Maravillas-Montero *et al.* 2011).

También encontramos una clara disminución de la elongación y de la superficie de contacto celular al usar Dynasore, un inhibidor de la GTPasa dinamina. Estudios previos han descrito que el inhibidor de dinamina, reduce la estabilidad de F-actina y la formación de lamelipodia en células cancerosas (Yamada *et al.* 2009). Dinamina está implicada en la formación de

estructuras ricas en actina e interactúa con una variedad de proteínas relacionadas con la dinámica de actina; es por estas interacciones que dinamina, se une la membrana celular modulando la forma de la célula, la adherencia, la fagocitosis y el movimiento vesicular (Gomez *et al.* 2005). El efecto causado en la elongación celular inducida por ICOS puede ser debido a que dinamina-2 probablemente ejerce sus efectos sobre el citoesqueleto de actina, por su interacción con Vav1 (Gomez *et al.* 2005) o por su interacción con los dominios SH₃/SH₂ de la subunidad reguladora p85 α de PI3-cinasa (Booker *et al.* 1993). Otra posibilidad es que dinamina-2 y miosina interactúan y están relacionadas con la vía de señalización de PI3-cinasa; este complejo dinamina-2/miosina interactúa con actina durante la formación del citoesqueleto de actina en células NIH3T3 y está implicado en la migración celular (Jeong *et al.* 2006, Lim *et al.* 2012).

Se ha descrito que CTLA-4, pero no CD28, actúa como un activador selectivo de la integrina LFA-1 en linfocitos T humanos y de ratón, regulando la adhesión mediada por esta integrina y aumentando el "capping de LFA-1 (Schneider *et al.* 2005). Analizamos si la ligación de ICOS inducía un aumento en el "capping" de la integrina LFA-1, con resultados negativos (datos no mostrados).

En resumen, utilizando inhibidores y dominantes negativos para las diferentes moléculas involucradas en la ruta de señalización, logramos dilucidar el mecanismo por el cual ICOS induce la reorganización y cambios en el citoesqueleto de actina en linfocitos T, la siguiente figura representa dicho mecanismo:

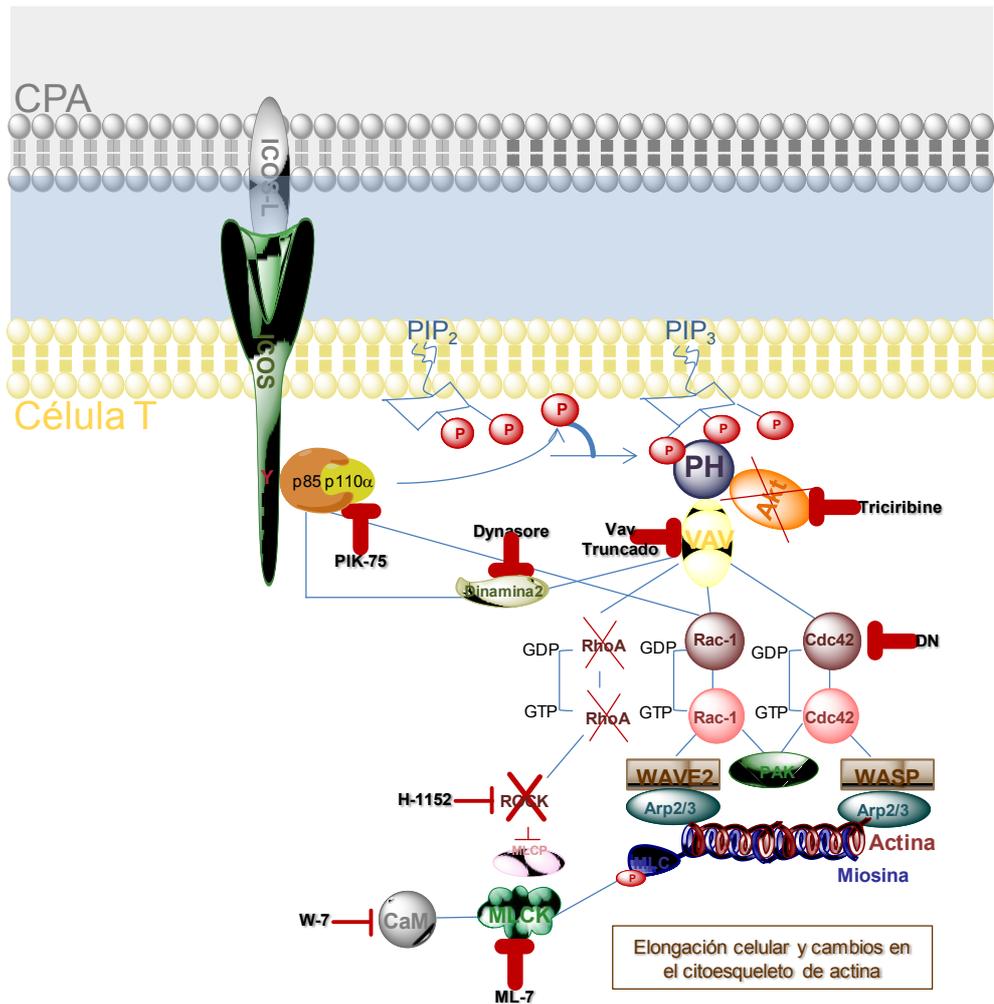


Figura 48. Representación esquemática de la potencial vía de señalización involucrada en los cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por la coestimulación con ICOS en linfocitos T.

ICOS posee el motivo YMFM en su región citoplasmática; tras su fosforilación se une a los dominios SH₂ de la subunidad reguladora p85 de PI3-kinasa; está a su vez forma un dímero con la subunidad catalítica p110 α que cataliza la fosforilación de PIP₂ en la posición D3 para formar el segundo mensajero (PIP₃). La fosforilación en el sitio D3 es necesaria para su unión al dominio de homología con pleckstrina (PH) de Vav. Vav facilita el intercambio GDP a GTP de las GTPasas Rac1 y Cdc42. Cdc42 unido a GTP activa a WASP; esta unión permite la formación de ramificaciones de actina a través de la asociación con el complejo ARP2/3, y Cdc42 unido a GTP activa el complejo. GTP unido a Rac-1 interactúa con WAVE2 para activar el complejo ARP2/3. Además Cdc42 y Rac son capaces de activar a PAK1/PAK3 implicadas en la elongación de células T. Rac puede unirse directamente a la subunidad reguladora p85. La cadena de miosina MLC es fosforilada por MLCK y regulada por calmodulina. Dinamina-2 puede actuar de tres maneras, se puede unir a Vav1, a la subunidad reguladora p85 α de PI3-kinasa o formar un complejo con miosina.

5.4 DISOCIACIÓN DE LA POLIMERIZACIÓN DE ACTINA Y LA ACUMULACIÓN DE “BALSAS” LIPÍDICAS POR LIGANDOS DE ICOS

La activación de células T genera cambios drásticos en la morfología de la célula T, como reordenamientos del citoesqueleto de actina, necesarios para la producción de una sinapsis madura, y además, presenta una compartimentación funcional de microdominios de membrana enriquecidos en glicosfingolípidos (GEMs) o “balsas lipídicas”. Estas balsas lipídicas amplían la respuesta de la célula T frente al antígeno (Meiri 2005). Frente a una respuesta de activación, el receptor de antígeno es dirigido a las balsas lipídicas y es allí donde interacciona con moléculas adaptadoras y cinasas (Acuto & Cantrell 2000). Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo de señalización que coordina la reorganización de las balsas, si se conocen algunas proteínas asociadas a ellas.

Nuestros datos muestran que la polimerización de actina falló en la inducción de balsas lipídicas ya que la ligación con ICOS generó polimerización de actina en el sitio de contacto célula T/esfera, pero ICOS no fue detectado en las balsas lipídicas. Sin embargo, encontramos un efecto sinérgico de ICOS con las señales del TCR/CD3 en la acumulación de balsas lipídicas en el sitio de contacto.

En el caso de CD28, la redistribución de las balsas lipídicas y del citoesqueleto de actina permiten una coestimulación eficaz de linfocitos T “Naive”, que dependen de la interacción de CD28 con filamina-A (Tavano *et al.* 2006). En el caso de ICOS, no existe una conexión directa con el citoesqueleto de actina, ya que no presenta el motivo PYAPP necesario para la interacción con filamina-A; a pesar de esto puede promover la acumulación de balsas en el sitio de interacción con ligandos TCR/CD3. Además, nuestros resultados indican que ICOS produce cambios morfológicos en linfocitos T mediados por la activación de la subunidad catalítica p110 α de PI3-cinasa. Algunos trabajos han demostrado que la polimerización de actina y la formación de balsas lipídicas son procesos diferentes, ya que en células T con sobreexpresión de Vav-1 se induce polimerización de actina sin formación de balsas lipídicas (Villalba *et al.* 2001). Por lo anterior se puede decir que, ICOS induce polimerización de actina a través de Src, PI3-cinasa y Vav, pero necesita de mecanismos adicionales como la unión a filamina-A (Tavano *et al.* 2006) o a otras moléculas (Round *et al.* 2005) para asociarse a las balsas lipídicas. Es por esto que las diferencias en los motivos citoplasmáticos y en los patrones de expresión de ICOS y CD28 producen papeles no redundantes en la respuesta inmune.

5.5 PAPEL DE PI3-CINASA EN LA SUPERVIVENCIA DE LINFOCITOS T

La inhibición individual de isoformas de PI3-cinasa demuestra que las subunidades catalíticas p110 β y p110 δ no tienen un papel tan importante en la supervivencia de linfocitos T, como si lo tiene la subunidad catalítica p110 α . El uso de dos inhibidores de esta subunidad (A66, PIK-75)

a concentraciones muy bajas disminuye significativamente la viabilidad celular y bloquea la proliferación celular por inducción de apoptosis dependiente de caspasas en linfocitos T CD4⁺. De igual forma, el silenciamiento de la subunidad p110 α afecta la supervivencia celular.

Se ha visto en células Jurkat que las especies reactivas de oxígeno (ROS) intervienen en procesos apoptóticos independientes de la cascada de señalización de caspasas, que puede prevenirse con el uso de antioxidantes como N-acetil-L-cisteína (NAC), y la transición del estado apoptótico a necrótico está acompañado por la depleción de ATP (Eguchi *et al.* 1997, Sato *et al.* 2008). Nosotros observamos que ROS no está implicada en la muerte de las células SR.D10, ya que al tratarlas con el inhibidor de p110 α en presencia de NAC o ATP, no hay un efecto protector (no mostrado).

La muerte celular inducida por el inhibidor de la subunidad catalítica p110 α en las células SR.D10 es insensible al inhibidor de caspasas, y como pudimos comprobar esta muerte celular no se debe a un proceso autofágico. Podemos inferir que la muerte celular encontrada en esta línea celular puede ser un mecanismo similar a la apoptosis pero independiente de caspasas. Aunque en células T la apoptosis es un proceso típicamente dependiente de caspasas, se ha demostrado que la muerte en células Jurkat puede ser un fenómeno independiente de caspasas, ya que el uso del inhibidor general de caspasas ZVAD-fmk no tiene ningún efecto en la apoptosis (Lu *et al.* 2007). Al parecer el inhibidor PIK-75 genera una respuesta alternativa o vías alternas de muerte celular en función de la célula afectada.

Hemos demostrado que el inhibidor de la subunidad catalítica p110 α , bloquea la señalización de PI3-cinasa, produciendo una disminución de la fosforilación de Akt y de otros efectores. La apoptosis inducida en linfocitos T es dependiente de PI3-cinasa (p110 α), de Akt y de NF κ B. La activación de la vía PI3K/Akt tiene un efecto anti-apoptótico, Akt fosforila e inhibe la caspasa-9, una proteasa clave en la iniciación de la cascada de la apoptosis (Cardone *et al.* 1998). Akt también fosforila el promotor BAD en Ser136, y por lo tanto libera las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-X_L (Datta *et al.* 1997, del Peso *et al.* 1997). Akt además puede activar y fosforilar la cinasa I-kB. Esta cinasa, a su vez fosforila e inactiva el inhibidor I-kB, luego libera el factor de transcripción NF-kB. Como consecuencia, se transloca al núcleo y activa la transcripción de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-X_L (Ozes *et al.* 1999).

En conjunto, en este trabajo resaltamos la importancia de PI3-cinasa de clase IA en la coestimulación por ICOS. No solo destacamos la función primordial de la subunidad catalítica p110 δ , sino que también atribuimos un papel dominante a la subunidad catalítica p110 α ; esta subunidad demostró unirse preferencialmente a la subunidad reguladora y por tal razón a ICOS, siendo necesaria en la activación de efectores de PI3-cinasa como Akt, en la secreción de citocinas, en la elongación celular y en los cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por ICOS. Además, la señalización de PI3-cinasa mediada por p110 α , tiene un papel

importante en los mecanismos de supervivencia celular. El uso de inhibidores generales de PI3-cinasa está asociado a una gran toxicidad; no solo bloquean PI3-cinasa, también inhiben mTOR y otras cinasas (Marone *et al.* 2008). Es por esto que el uso de inhibidores selectivos para la subunidad catalítica p110 α podría proporcionar un beneficio como diana terapéutica para el control de la respuesta inmune. La investigación adicional de modelos de ratones transgénicos seguirá aportando pistas sobre los posibles beneficios y retos de una terapia dirigida a p110 α de PI3-cinasa.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

1. Las PI3-quinasas de clase IA son las únicas moléculas que se han identificado asociadas a secuencias fosforiladas del dominio citoplasmático de ICOS de ratón.
2. La subunidad catalítica p110 α de PI3-quinasa se une preferencialmente a péptidos fosforilados en el residuo de tirosina del motivo YMFM presente en el tallo citoplasmático de ICOS y a inmunoprecipitados de ICOS nativo fosforilado. Esto es debido a una unión preferencial de esta subunidad con la subunidad reguladora de PI3-quinasa.
3. La unión relativa de las isoformas reguladoras p50-55 α a péptidos de ICOS fosforilado, o a inmunoprecipitados de ICOS es mayor que la de las isoformas reguladoras p85 α .
4. La pérdida de expresión de las subunidades catalíticas p110 α o p110 δ de PI3-quinasa genera un desequilibrio en la actividad PI3-quinasa y en las señales diana de la coestimulación por ICOS.
5. La activación temprana de Akt fue bloqueada parcialmente al inhibir las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ de PI3-quinasa con siARN o con inhibidores farmacológicos, confirmando la importancia de estas subunidades en la activación de Akt.
6. La secreción de citocinas como IL-4 e IL1-10, es dependiente de la vía PI3-quinasa-Akt, ya que el inhibidor general de PI3-quinasa y de las subunidades catalíticas p110 α y p110 δ inhiben la secreción de estas citocinas inducida por la activación TCR/CD3 y por la coestimulación con ICOS en células SR.D10.
7. La síntesis de IFN- γ es especialmente sensible a la inhibición de la subunidad catalítica de p110 α en blastos de células T CD4 $^{+}$.
8. La inhibición de la subunidad catalítica p110 α disminuye significativamente la viabilidad celular y bloquea la proliferación celular por inducción de apoptosis dependiente de caspasas en linfocitos T CD4 $^{+}$ activados con anti-CD3 y CD28.
9. La interacción de ICOS con sus ligandos produce, por sí misma, un aumento de la superficie de contacto con el sustrato, elongación celular y polimerización de actina inducida que es independiente de las señales del TCR/CD3.

10. La elongación de células T inducida por ICOS requiere de la actividad de PI3-quinasa de clase IA, en especial de la subunidad catalítica p110 α .
11. La unión de ICOS con sus ligandos induce la formación de gránulos densos o puntos de actina polimerizada que se encuentran muy cerca de la superficie de contacto célula-cristal. Estos gránulos son dependientes de PI3-quinasa y específicamente de la subunidad catalítica p110 α .
12. Los cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por ICOS son dependientes de Vav, de las GTPasas Rac-1 y Cdc42, y de la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), pero independientes de la vía de Akt o de ROCK.
13. Existe un efecto sinérgico de ICOS con las señales del TCR/CD3 en la acumulación de balsas lipídicas en el sitio de contacto. Sin embargo, la polimerización de actina falló en la inducción de balsas lipídicas ya que la ligación con ICOS generó polimerización de actina en el sitio de contacto, pero ICOS no fue detectado en las balsas lipídicas.

BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Lichtman AH & Pober JS (1999) *Inmunología Celular y Molecular*. In *Interamericana-McGraw Hill*, Madrid.
- Acosta YY, Zafra MP, Ojeda G, Bernardone IS, Dianzani U, Portoles P & Rojo JM (2011): Biased binding of class IA phosphatidylinositol 3-kinase subunits to inducible costimulator (CD278). *Cell Mol Life Sci* 68, 3065-3079.
- Acuto O & Cantrell D (2000): T cell activation and the cytoskeleton. *Annu Rev Immunol* 18, 165-184.
- Acuto O & Michel F (2003): CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 3, 939-951.
- Aicher A, Hayden-Ledbetter M, Brady WA, Pezzutto A, Richter G, Magaletti D, Buckwalter S, Ledbetter JA & Clark EA (2000): Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J Immunol* 164, 4689-4696.
- Alarcon B, Gil D, Delgado P & Schamel WW (2003): Initiation of TCR signaling: regulation within CD3 dimers. *Immunol Rev* 191, 38-46.
- Alblas J, Ulfman L, Hordijk P & Koenderman L (2001): Activation of RhoA and ROCK are essential for detachment of migrating leukocytes. *Mol Biol Cell* 12, 2137-2145.
- Alcazar I, Cortes I, Zaballos A, Hernandez C, Fruman DA, Barber DF & Carrera AC (2009): p85beta phosphoinositide 3-kinase regulates CD28 coreceptor function. *Blood* 113, 3198-3208.
- Alcazar I, Marques M, Kumar A, Hirsch E, Wymann M, Carrera AC & Barber DF (2007): Phosphoinositide 3-kinase gamma participates in T cell receptor-induced T cell activation. *J Exp Med* 204, 2977-2987.
- Alessi DR & Cohen P (1998): Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* 8, 55-62.
- Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A & Bownes M (1997): 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr Biol* 7, 776-789.
- Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O & Caroni P (1998): Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805-809.
- Arcaro A, Volinia S, Zvelebil MJ, Stein R, Watton SJ, Layton MJ, Gout I, Ahmadi K, Downward J & Waterfield MD (1998): Human phosphoinositide 3-kinase C2beta, the role of calcium and the C2 domain in enzyme activity. *J Biol Chem* 273, 33082-33090.
- Arimura Y, Kato H, Dianzani U, Okamoto T, Kamekura S, Buonfiglio D, Miyoshi-Akiyama T, Uchiyama T & Yagi J (2002): A co-stimulatory molecule on activated T cells, H4/ICOS, delivers specific signals in T(h) cells and regulates their responses. *Int Immunol* 14, 555-566.
- Arimura Y, Shiroki F, Kuwahara S, Kato H, Dianzani U, Uchiyama T & Yagi J (2004): Akt is a neutral amplifier for Th cell differentiation. *J Biol Chem* 279, 11408-11416.
- August A & Dupont B (1994): CD28 of T lymphocytes associates with phosphatidylinositol 3-kinase. *Int Immunol* 6, 769-774.
- Baier-Bitterlich G, Uberall F, Bauer B, Fresser F, Wachter H, Grunicke H, Utermann G, Altman A & Baier G (1996): Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 16, 1842-1850.
- Baker JP & Titus MA (1998): Myosins: matching functions with motors. *Curr Opin Cell Biol* 10, 80-86.
- Barber DF, Alvarado-Kristensson M, Gonzalez-Garcia A, Pulido R & Carrera AC (2006): PTEN regulation, a novel function for the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Sci STKE* 2006, pe49.
- Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P & Crabtree GR (1997): Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275, 1930-1934.
- Beemiller P & Krummel MF (2010): Mediation of T-cell activation by actin meshworks. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002444.

- Beier KC, Hutloff A, Dittrich AM, Heuck C, Rauch A, Buchner K, Ludewig B, Ochs HD, Mages HW & Kroczeck RA (2000): Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur J Immunol* 30, 3707-3717.
- Bello R, Feito MJ, Ojeda G, Portoles P & Rojo JM (2007): Loss of N-terminal charged residues of mouse CD3 epsilon chains generates isoforms modulating antigen T cell receptor-mediated signals and T cell receptor-CD3 interactions. *J Biol Chem* 282, 22324-22334.
- Biggs WH, 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK & Arden KC (1999): Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7421-7426.
- Billadeau DD, Nolz JC & Gomez TS (2007): Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol* 7, 131-143.
- Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T & Thompson CB (2010): CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xL. *Immunity*. 1995. 3: 87-98. *J Immunol* 185, 3788-3799.
- Booker GW, Gout I, Downing AK, Driscoll PC, Boyd J, Waterfield MD & Campbell ID (1993): Solution structure and ligand-binding site of the SH3 domain of the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 73, 813-822.
- Boomer JS & Green JM (2010): An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002436.
- Borriello F, Sethna MP, Boyd SD, Schweitzer AN, Tivol EA, Jacoby D, Strom TB, Simpson EM, Freeman GJ & Sharpe AH (1997): B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 6, 303-313.
- Brennan P, Babbage JW, Thomas G & Cantrell D (1999): p70(s6k) integrates phosphatidylinositol 3-kinase and rapamycin-regulated signals for E2F regulation in T lymphocytes. *Mol Cell Biol* 19, 4729-4738.
- Brodie D, Collins AV, Iaboni A, Fennelly JA, Sparks LM, Xu XN, van der Merwe PA & Davis SJ (2000): LICOS, a primordial costimulatory ligand? *Curr Biol* 10, 333-336.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J & Greenberg ME (1999): Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Bruyns E, Marie-Cardine A, Kirchgessner H, Sagolla K, Shevchenko A, Mann M, Autschbach F, Bensussan A, Meuer S & Schraven B (1998): T cell receptor (TCR) interacting molecule (TRIM), a novel disulfide-linked dimer associated with the TCR-CD3-zeta complex, recruits intracellular signaling proteins to the plasma membrane. *J Exp Med* 188, 561-575.
- Buckler JL, Walsh PT, Porrett PM, Choi Y & Turka LA (2006): Cutting edge: T cell requirement for CD28 costimulation is due to negative regulation of TCR signals by PTEN. *J Immunol* 177, 4262-4266.
- Burr JS, Savage ND, Messah GE, Kimzey SL, Shaw AS, Arch RH & Green JM (2001): Cutting edge: distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-XL. *J Immunol* 166, 5331-5335.
- Burridge K & Wennerberg K (2004): Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167-179.
- Bustelo XR (2001): Vav proteins, adaptors and cell signaling. *Oncogene* 20, 6372-6381.
- Cahir McFarland ED, Hurley TR, Pingel JT, Sefton BM, Shaw A & Thomas ML (1993): Correlation between Src family member regulation by the protein-tyrosine-phosphatase CD45 and transmembrane signaling through the T-cell receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 1402-1406.
- Cain RJ, Vanhaesebroeck B & Ridley AJ (2010): The PI3K p110alpha isoform regulates endothelial adherens junctions via Pyk2 and Rac1. *J Cell Biol* 188, 863-876.
- Caplan S & Baniyash M (1995): Multisubunit receptors in the immune system and their association with the cytoskeleton: in search of functional significance. *Immunol Res* 14, 98-118.
- Caplan S, Zeliger S, Wang L & Baniyash M (1995): Cell-surface-expressed T-cell antigen-receptor zeta chain is associated with the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4768-4772.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S & Reed JC (1998): Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.
- Carreno BM & Collins M (2002): The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 20, 29-53.

- Carroll PE, Okuda M, Horn HF, Biddinger P, Stambrook PJ, Gleich LL, Li YQ, Tarapore P & Fukasawa K (1999): Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene* 18, 1935-1944.
- Cinek T & Horejsi V (1992): The nature of large noncovalent complexes containing glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane glycoproteins and protein tyrosine kinases. *J Immunol* 149, 2262-2270.
- Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, Stuart DI, van der Merwe PA & Davis SJ (2002): The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17, 201-210.
- Conley ME, Dobbs AK, Quintana AM, Bosompem A, Wang YD, Coustan-Smith E, Smith AM, Perez EE & Murray PJ (2012): Agammaglobulinemia and absent B lineage cells in a patient lacking the p85alpha subunit of PI3K. *J Exp Med* 209, 463-470.
- Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T & Gutkind JS (1995): The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81, 1137-1146.
- Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, Nguyen T, Burwell T, Schneider H, Gonzalo JA, Gosselin M, Owen LR, Rudd CE & Gutierrez-Ramos JC (2000): The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity* 13, 95-105.
- Crabtree GR & Clipstone NA (1994): Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* 63, 1045-1083.
- Craddock BL, Orchiston EA, Hinton HJ & Welham MJ (1999): Dissociation of apoptosis from proliferation, protein kinase B activation, and BAD phosphorylation in interleukin-3-mediated phosphoinositide 3-kinase signaling. *J Biol Chem* 274, 10633-10640.
- Crespo P, Schuebel KE, Ostrom AA, Gutkind JS & Bustelo XR (1997): Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* 385, 169-172.
- Chantry D, Vojtek A, Kashishian A, Holtzman DA, Wood C, Gray PW, Cooper JA & Hoekstra MF (1997): p110delta, a novel phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit that associates with p85 and is expressed predominantly in leukocytes. *J Biol Chem* 272, 19236-19241.
- Cherfils J & Chardin P (1999): GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 24, 306-311.
- Chi H (2012): Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *Nat Rev Immunol* 12, 325-338.
- Chong C, Tan L, Lim L & Manser E (2001): The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J Biol Chem* 276, 17347-17353.
- Chu DH, Morita CT & Weiss A (1998): The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development. *Immunol Rev* 165, 167-180.
- Damle NK, Klussman K, Leytze G, Myrdal S, Aruffo A, Ledbetter JA & Linsley PS (1994): Costimulation of T lymphocytes with integrin ligands intercellular adhesion molecule-1 or vascular cell adhesion molecule-1 induces functional expression of CTLA-4, a second receptor for B7. *J Immunol* 152, 2686-2697.
- Datta SR, Brunet A & Greenberg ME (1999): Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13, 2905-2927.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y & Greenberg ME (1997): Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Davis LS, Patel SS, Atkinson JP & Lipsky PE (1988): Decay-accelerating factor functions as a signal transducing molecule for human T cells. *J Immunol* 141, 2246-2252.
- Deane JA & Fruman DA (2004): Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* 22, 563-598.
- del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R & Nunez G (1997): Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- Delgado P, Cubelos B, Calleja E, Martinez-Martin N, Cipres A, Merida I, Bellas C, Bustelo XR & Alarcon B (2009): Essential function for the GTPase TC21 in homeostatic antigen receptor signaling. *Nat Immunol* 10, 880-888.

- Diez-Orejas R, Ballester S, Feito MJ, Ojeda G, Criado G, Ronda M, Portoles P & Rojo JM (1994): Genetic and immunochemical evidence for CD4-dependent association of p56lck with the alpha beta T-cell receptor (TCR): regulation of TCR-induced activation. *EMBO J* 13, 90-99.
- Dodson LF, Boomer JS, Deppong CM, Shah DD, Sim J, Bricker TL, Russell JH & Green JM (2009): Targeted knock-in mice expressing mutations of CD28 reveal an essential pathway for costimulation. *Mol Cell Biol* 29, 3710-3721.
- Dong C, Temann UA & Flavell RA (2001): Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions. *J Immunol* 166, 3659-3662.
- Downward J (1996): Control of ras activation. *Cancer Surv* 27, 87-100.
- Downward J (1998): Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10, 262-267.
- Downward J (1999): How BAD phosphorylation is good for survival. *Nat Cell Biol* 1, E33-35.
- Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M & Kirschner MW (2002): Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418, 790-793.
- Eguchi Y, Shimizu S & Tsujimoto Y (1997): Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57, 1835-1840.
- Etienne-Manneville S & Hall A (2002): Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Fayard E, Xue G, Parcellier A, Bozulic L & Hemmings BA (2010): Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway. *Curr Top Microbiol Immunol* 346, 31-56.
- Feito MJ, Vaschetto R, Criado G, Sanchez A, Chiocchetti A, Jimenez-Perianez A, Dianzani U, Portoles P & Rojo JM (2003): Mechanisms of H4/ICOS costimulation: effects on proximal TCR signals and MAP kinase pathways. *Eur J Immunol* 33, 204-214.
- Ferguson SE, Han S, Kelsoe G & Thompson CB (1996): CD28 is required for germinal center formation. *J Immunol* 156, 4576-4581.
- Finco TS, Kadlecsek T, Zhang W, Samelson LE & Weiss A (1998): LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 9, 617-626.
- Fischer KD, Tedford K & Penninger JM (1998): Vav links antigen-receptor signaling to the actin cytoskeleton. *Semin Immunol* 10, 317-327.
- Fos C, Salles A, Lang V, Carrette F, Audebert S, Pastor S, Ghiotto M, Olive D, Bismuth G & Nunes JA (2008): ICOS ligation recruits the p50alpha PI3K regulatory subunit to the immunological synapse. *J Immunol* 181, 1969-1977.
- Foukas LC, Berenjano IM, Gray A, Khwaja A & Vanhaesebroeck B (2010): Activity of any class IA PI3K isoform can sustain cell proliferation and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11381-11386.
- Franko JL & Levine AD (2009): Antigen-independent adhesion and cell spreading by inducible costimulator engagement inhibits T cell migration in a PI-3K-dependent manner. *J Leukoc Biol* 85, 526-538.
- Friend LD, Shah DD, Deppong C, Lin J, Bricker TL, Juehne TI, Rose CM & Green JM (2006): A dose-dependent requirement for the proline motif of CD28 in cellular and humoral immunity revealed by a targeted knockin mutant. *J Exp Med* 203, 2121-2133.
- Fruman DA (2007): The role of class I phosphoinositide 3-kinase in T-cell function and autoimmunity. *Biochem Soc Trans* 35, 177-180.
- Fruman DA, Cantley LC & Carpenter CL (1996): Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics* 37, 113-121.
- Genot E, Cleverley S, Henning S & Cantrell D (1996): Multiple p21ras effector pathways regulate nuclear factor of activated T cells. *EMBO J* 15, 3923-3933.
- Gingras D, Gauthier F, Lamy S, Desrosiers RR & Beliveau R (1998): Localization of RhoA GTPase to endothelial caveolae-enriched membrane domains. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 888-893.
- Gomez TS, Hamann MJ, McCarney S, Savoy DN, Lubking CM, Heldebrant MP, Labno CM, McKean DJ, McNiven MA, Burkhardt JK & Billadeau DD (2005): Dynamin 2 regulates T cell activation by controlling actin polymerization at the immunological synapse. *Nat Immunol* 6, 261-270.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM & Dustin ML (1999): The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.
- Green JM, Noel PJ, Sperling AI, Walunas TL, Gray GS, Bluestone JA & Thompson CB (1994): Absence of B7-dependent responses in CD28-deficient mice. *Immunity* 1, 501-508.

- Greenwald RJ, Freeman GJ & Sharpe AH (2005): The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23, 515-548.
- Gu H, Maeda H, Moon JJ, Lord JD, Yoakim M, Nelson BH & Neel BG (2000): New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Mol Cell Biol* 20, 7109-7120.
- Guillemet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A, Gonella C, Ramadani F, Bilancio A, Meek S, Smith AJ, Okkenhaug K & Vanhaesebroeck B (2008): The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8292-8297.
- Han J, Luby-Phelps K, Das B, Shu X, Xia Y, Mosteller RD, Krishna UM, Falck JR, White MA & Broek D (1998): Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* 279, 558-560.
- Harada Y, Ohgai D, Watanabe R, Okano K, Koiwai O, Tanabe K, Toma H, Altman A & Abe R (2003): A single amino acid alteration in cytoplasmic domain determines IL-2 promoter activation by ligation of CD28 but not inducible costimulator (ICOS). *J Exp Med* 197, 257-262.
- Harada Y, Tokushima M, Matsumoto Y, Ogawa S, Otsuka M, Hayashi K, Weiss BD, June CH & Abe R (2001): Critical requirement for the membrane-proximal cytosolic tyrosine residue for CD28-mediated costimulation in vivo. *J Immunol* 166, 3797-3803.
- Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattei MG, Luciani MF & Golstein P (1991): CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol* 147, 1037-1044.
- Hegedus Z, Chitu V, Toth GK, Finta C, Varadi G, Ando I & Monostori E (1999): Contribution of kinases and the CD45 phosphatase to the generation of tyrosine phosphorylation patterns in the T-cell receptor complex zeta chain. *Immunol Lett* 67, 31-39.
- Henning S & Cleverley S (1999): Small GTPases in lymphocyte biology: Rho proteins take center stage. *Immunol Res* 20, 29-42.
- Holdorf AD, Lee KH, Burack WR, Allen PM & Shaw AS (2002): Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. *Nat Immunol* 3, 259-264.
- Hu H, Rudd CE & Schneider H (2001): Src kinases Fyn and Lck facilitate the accumulation of phosphorylated CTLA-4 and its association with PI-3 kinase in intracellular compartments of T-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 573-578.
- Huang GN, Huso DL, Bouyain S, Tu J, McCorkell KA, May MJ, Zhu Y, Lutz M, Collins S, Dehoff M, Kang S, Whartenby K, Powell J, Leahy D & Worley PF (2008): NFAT binding and regulation of T cell activation by the cytoplasmic scaffolding Homer proteins. *Science* 319, 476-481.
- Huby RD, Carlile GW & Ley SC (1995): Interactions between the protein-tyrosine kinase ZAP-70, the proto-oncoprotein Vav, and tubulin in Jurkat T cells. *J Biol Chem* 270, 30241-30244.
- Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I & Kroczeck RA (1999): ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.
- Izquierdo Pastor M, Reif K & Cantrell D (1995): The regulation and function of p21ras during T-cell activation and growth. *Immunol Today* 16, 159-164.
- Jeong SJ, Kim SG, Yoo J, Han MY, Park JC, Kim HJ, Kang SS, Choi BD & Jeong MJ (2006): Increased association of dynamin II with myosin II in ras transformed NIH3T3 cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 38, 556-562.
- Ji H, Rintelen F, Waltzinger C, Bertschy Meier D, Bilancio A, Pearce W, Hirsch E, Wymann MP, Ruckle T, Camps M, Vanhaesebroeck B, Okkenhaug K & Rommel C (2007): Inactivation of PI3Kgamma and PI3Kdelta distorts T-cell development and causes multiple organ inflammation. *Blood* 110, 2940-2947.
- Jimenez-Perianez A, Ojeda G, Criado G, Sanchez A, Pini E, Madrenas J, Rojo JM & Portoles P (2005): Complement regulatory protein Crry/p65-mediated signaling in T lymphocytes: role of its cytoplasmic domain and partitioning into lipid rafts. *J Leukoc Biol* 78, 1386-1396.
- Jones RG, Parsons M, Bonnard M, Chan VS, Yeh WC, Woodgett JR & Ohashi PS (2000): Protein kinase B regulates T lymphocyte survival, nuclear factor kappaB activation, and Bcl-X(L) levels in vivo. *J Exp Med* 191, 1721-1734.

- Jou ST, Carpino N, Takahashi Y, Piekorz R, Chao JR, Wang D & Ihle JN (2002): Essential, nonredundant role for the phosphoinositide 3-kinase p110delta in signaling by the B-cell receptor complex. *Mol Cell Biol* 22, 8580-8591.
- June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA & Samelson LE (1990a): Increases in tyrosine phosphorylation are detectable before phospholipase C activation after T cell receptor stimulation. *J Immunol* 144, 1591-1599.
- June CH, Ledbetter JA, Linsley PS & Thompson CB (1990b): Role of the CD28 receptor in T-cell activation. *Immunol Today* 11, 211-216.
- Kaga S, Ragg S, Rogers KA & Ochi A (1998): Stimulation of CD28 with B7-2 promotes focal adhesion-like cell contacts where Rho family small G proteins accumulate in T cells. *J Immunol* 160, 24-27.
- Kaminski DA, Lee BO, Eaton SM, Haynes L & Randall TD (2009): CD28 and inducible costimulator (ICOS) signalling can sustain CD154 expression on activated T cells. *Immunology* 127, 373-385.
- Kane LP, Andres PG, Howland KC, Abbas AK & Weiss A (2001): Akt provides the CD28 costimulatory signal for up-regulation of IL-2 and IFN-gamma but not TH2 cytokines. *Nat Immunol* 2, 37-44.
- Karasuyama H & Melchers F (1988): Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *Eur J Immunol* 18, 97-104.
- Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M & Kaibuchi K (1999): Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol* 147, 1023-1038.
- Kaye J, Porcelli S, Tite J, Jones B & Janeway CA, Jr. (1983): 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* 158, 836-856.
- Kim HH, Tharayil M & Rudd CE (1998): Growth factor receptor-bound protein 2 SH2/SH3 domain binding to CD28 and its role in co-signaling. *J Biol Chem* 273, 296-301.
- Kong KF, Yokosuka T, Canonigo-Balancio AJ, Isakov N, Saito T & Altman A (2011): A motif in the V3 domain of the kinase PKC-theta determines its localization in the immunological synapse and functions in T cells via association with CD28. *Nat Immunol* 12, 1105-1112.
- Konig R (2002): Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. *Curr Opin Immunol* 14, 75-83.
- Krawczyk C & Penninger JM (2001): Molecular motors involved in T cell receptor clusterings. *J Leukoc Biol* 69, 317-330.
- Leevers SJ, Vanhaesebroeck B & Waterfield MD (1999): Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol* 11, 219-225.
- Lenschow DJ, Walunas TL & Bluestone JA (1996): CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14, 233-258.
- Leopoldt D, Hanck T, Exner T, Maier U, Wetzker R & Nurnberg B (1998): Gbetagamma stimulates phosphoinositide 3-kinase-gamma by direct interaction with two domains of the catalytic p110 subunit. *J Biol Chem* 273, 7024-7029.
- Lim DS, Kim SR, Choi BD, Jeong SJ, Wang G, Kim HK, Kim BH, Goo JH & Jeong MJ (2012): Dynamin II involves in cell migration and actin formation of NIH3T3 cells. *J Nanosci Nanotechnol* 12, 690-695.
- Lio CW, Dodson LF, Deppong CM, Hsieh CS & Green JM (2010): CD28 facilitates the generation of Foxp3(-) cytokine responsive regulatory T cell precursors. *J Immunol* 184, 6007-6013.
- Lohning M, Hutloff A, Kallinich T, Mages HW, Bonhagen K, Radbruch A, Hamelmann E & Kroczeck RA (2003): Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J Exp Med* 197, 181-193.
- Lowin-Kropf B, Shapiro VS & Weiss A (1998): Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J Cell Biol* 140, 861-871.
- Lu LH, Nakagawa R, Kashio Y, Ito A, Shoji H, Nishi N, Hirashima M, Yamauchi A & Nakamura T (2007): Characterization of galectin-9-induced death of Jurkat T cells. *J Biochem* 141, 157-172.

- Lukas TJ, Burgess WH, Prendergast FG, Lau W & Watterson DM (1986): Calmodulin binding domains: characterization of a phosphorylation and calmodulin binding site from myosin light chain kinase. *Biochemistry* 25, 1458-1464.
- Macian F, Lopez-Rodriguez C & Rao A (2001): Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20, 2476-2489.
- Mages HW, Hutloff A, Heuck C, Buchner K, Himmelbauer H, Oliveri F & Kroczeck RA (2000): Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand. *Eur J Immunol* 30, 1040-1047.
- Mandelbrot DA, McAdam AJ & Sharpe AH (1999): B7-1 or B7-2 is required to produce the lymphoproliferative phenotype in mice lacking cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4). *J Exp Med* 189, 435-440.
- Maravillas-Montero JL, Gillespie PG, Patino-Lopez G, Shaw S & Santos-Argumedo L (2011): Myosin 1c participates in B cell cytoskeleton rearrangements, is recruited to the immunologic synapse, and contributes to antigen presentation. *J Immunol* 187, 3053-3063.
- Marone R, Cmiljanovic V, Giese B & Wymann MP (2008): Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim Biophys Acta* 1784, 159-185.
- McAdam AJ, Chang TT, Lumelsky AE, Greenfield EA, Boussiotis VA, Duke-Cohan JS, Chernova T, Malenkovich N, Jabs C, Kuchroo VK, Ling V, Collins M, Sharpe AH & Freeman GJ (2000): Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cells. *J Immunol* 165, 5035-5040.
- McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, Freeman GJ & Sharpe AH (2001): ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 409, 102-105.
- McAdam AJ, Schweitzer AN & Sharpe AH (1998): The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Immunol Rev* 165, 231-247.
- Medema RH, Kops GJ, Bos JL & Burgering BM (2000): AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404, 782-787.
- Meier TI, Cook JA, Thomas JE, Radding JA, Horn C, Lingaraj T & Smith MC (2004): Cloning, expression, purification, and characterization of the human Class Ia phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Protein Expr Purif* 35, 218-224.
- Meiri KF (2005): Lipid rafts and regulation of the cytoskeleton during T cell activation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360, 1663-1672.
- Mesturini R, Nicola S, Chiochetti A, Bernardone IS, Castelli L, Bensi T, Ferretti M, Comi C, Dong C, Rojo JM, Yagi J & Dianzani U (2006): ICOS cooperates with CD28, IL-2, and IFN-gamma and modulates activation of human naive CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 36, 2601-2612.
- Michaely PA, Mineo C, Ying YS & Anderson RG (1999): Polarized distribution of endogenous Rac1 and RhoA at the cell surface. *J Biol Chem* 274, 21430-21436.
- Montixi C, Langlet C, Bernard AM, Thimonier J, Dubois C, Wurbel MA, Chauvin JP, Pierres M & He HT (1998): Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J* 17, 5334-5348.
- Montoya MC, Sancho D, Vicente-Manzanares M & Sanchez-Madrid F (2002): Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev* 186, 68-82.
- Murray JT, Panaretou C, Stenmark H, Miaczynska M & Backer JM (2002): Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *Traffic* 3, 416-427.
- Mustelin T & Tasken K (2003): Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem J* 371, 15-27.
- Nirula A, Ho M, Phee H, Roose J & Weiss A (2006): Phosphoinositide-dependent kinase 1 targets protein kinase A in a pathway that regulates interleukin 4. *J Exp Med* 203, 1733-1744.
- Nobes CD & Hall A (1995): Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Noel PJ, Boise LH, Green JM & Thompson CB (1996): CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J Immunol* 157, 636-642.
- Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A & Crabtree GR (1994): NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature* 369, 497-502.

- Nukada Y, Okamoto N, Konakahara S, Tezuka K, Ohashi K, Mizuno K & Tsuji T (2006): ALLIM/ICOS-mediated elongation of activated T cells is regulated by both the PI3-kinase/Akt and Rho family cascade. *Int Immunol* 18, 1815-1824.
- Nurieva RI, Duong J, Kishikawa H, Dinzani U, Rojo JM, Ho I, Flavell RA & Dong C (2003a): Transcriptional regulation of th2 differentiation by inducible costimulator. *Immunity* 18, 801-811.
- Nurieva RI, Mai XM, Forbush K, Bevan MJ & Dong C (2003b): B7h is required for T cell activation, differentiation, and effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14163-14168.
- Obermeier A, Ahmed S, Manser E, Yen SC, Hall C & Lim L (1998): PAK promotes morphological changes by acting upstream of Rac. *EMBO J* 17, 4328-4339.
- Ojeda G, Ronda M, Ballester S, Diez-Orejas R, Feito MJ, Garcia-Albert L, Rojo JM & Portoles P (1995): A hyperreactive variant of a CD4+ T cell line is activated by syngeneic antigen presenting cells in the absence of antigen. *Cell Immunol* 164, 265-278.
- Okamoto N, Tezuka K, Kato M, Abe R & Tsuji T (2003): PI3-kinase and MAP-kinase signaling cascades in ALLIM/ICOS- and CD28-costimulated T-cells have distinct functions between cell proliferation and IL-10 production. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 691-702.
- Okkenhaug K, Patton DT, Bilancio A, Garcon F, Rowan WC & Vanhaesebroeck B (2006): The p110delta isoform of phosphoinositide 3-kinase controls clonal expansion and differentiation of Th cells. *J Immunol* 177, 5122-5128.
- Okkenhaug K & Vanhaesebroeck B (2003): PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat Rev Immunol* 3, 317-330.
- Okkenhaug K, Wu L, Garza KM, La Rose J, Khoo W, Odermatt B, Mak TW, Ohashi PS & Rottapel R (2001): A point mutation in CD28 distinguishes proliferative signals from survival signals. *Nat Immunol* 2, 325-332.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM & Donner DB (1999): NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401, 82-85.
- Palacios EH & Weiss A (2004): Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene* 23, 7990-8000.
- Papakonstanti EA, Zwaenepoel O, Bilancio A, Burns E, Nock GE, Houseman B, Shokat K, Ridley AJ & Vanhaesebroeck B (2008): Distinct roles of class IA PI3K isoforms in primary and immortalised macrophages. *J Cell Sci* 121, 4124-4133.
- Parry RV, Reif K, Smith G, Sansom DM, Hemmings BA & Ward SG (1997): Ligation of the T cell co-stimulatory receptor CD28 activates the serine-threonine protein kinase protein kinase B. *Eur J Immunol* 27, 2495-2501.
- Parry RV, Rumbley CA, Vandenberghe LH, June CH & Riley JL (2003): CD28 and inducible costimulatory protein Src homology 2 binding domains show distinct regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, Bcl-xL, and IL-2 expression in primary human CD4 T lymphocytes. *J Immunol* 171, 166-174.
- Patino-Lopez G, Aravind L, Dong X, Kruhlak MJ, Ostap EM & Shaw S (2010): Myosin 1G is an abundant class I myosin in lymphocytes whose localization at the plasma membrane depends on its ancient divergent pleckstrin homology (PH) domain (Myo1PH). *J Biol Chem* 285, 8675-8686.
- Patton DT, Garden OA, Pearce WP, Clough LE, Monk CR, Leung E, Rowan WC, Sancho S, Walker LS, Vanhaesebroeck B & Okkenhaug K (2006): Cutting edge: the phosphoinositide 3-kinase p110 delta is critical for the function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 177, 6598-6602.
- Peach RJ, Bajorath J, Brady W, Leytze G, Greene J, Naemura J & Linsley PS (1994): Complementarity determining region 1 (CDR1)- and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1. *J Exp Med* 180, 2049-2058.
- Peck AB & Bach FH (1973): A miniaturized mouse mixed leukocyte culture in serum-free and mouse serum supplemented media. *J Immunol Methods* 3, 147-163.
- Pons S, Asano T, Glasheen E, Miralpeix M, Zhang Y, Fisher TL, Myers MG, Jr., Sun XJ & White MF (1995): The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 15, 4453-4465.
- Prasad KV, Janssen O, Kapeller R, Raab M, Cantley LC & Rudd CE (1993a): Src-homology 3 domain of protein kinase p59fyn mediates binding to phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7366-7370.

- Prasad KV, Kapeller R, Janssen O, Repke H, Duke-Cohan JS, Cantley LC & Rudd CE (1993b): Phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and PI 4-kinase binding to the CD4-p56lck complex: the p56lck SH3 domain binds to PI 3-kinase but not PI 4-kinase. *Mol Cell Biol* 13, 7708-7717.
- Qian D, Mollenauer MN & Weiss A (1996): Dominant-negative zeta-associated protein 70 inhibits T cell antigen receptor signaling. *J Exp Med* 183, 611-620.
- Qiu Y & Kung HJ (2000): Signaling network of the Btk family kinases. *Oncogene* 19, 5651-5661.
- Raab M, Cai YC, Bunnell SC, Heyeck SD, Berg LJ & Rudd CE (1995): p56Lck and p59Fyn regulate CD28 binding to phosphatidylinositol 3-kinase, growth factor receptor-bound protein GRB-2, and T cell-specific protein-tyrosine kinase ITK: implications for T-cell costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8891-8895.
- Raftopoulos M & Hall A (2004): Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265, 23-32.
- Rameh LE, Arvidsson A, Carraway KL, 3rd, Couvillon AD, Rathbun G, Crompton A, VanRenterghem B, Czech MP, Ravichandran KS, Burakoff SJ, Wang DS, Chen CS & Cantley LC (1997): A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* 272, 22059-22066.
- Redoglia V, Dianzani U, Rojo JM, Portoles P, Bragardo M, Wolff H, Buonfiglio D, Bonisconi S & Janeway CA, Jr. (1996): Characterization of H4: a mouse T lymphocyte activation molecule functionally associated with the CD3/T cell receptor. *Eur J Immunol* 26, 2781-2789.
- Reif K, Burgering BM & Cantrell DA (1997): Phosphatidylinositol 3-kinase links the interleukin-2 receptor to protein kinase B and p70 S6 kinase. *J Biol Chem* 272, 14426-14433.
- Reif K & Cantrell DA (1998): Networking Rho family GTPases in lymphocytes. *Immunity* 8, 395-401.
- Ridley AJ (2001): Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114, 2713-2722.
- Riley JL, Blair PJ, Musser JT, Abe R, Tezuka K, Tsuji T & June CH (2001): ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement. *J Immunol* 166, 4943-4948.
- Riley JL & June CH (2005): The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* 105, 13-21.
- Rodgers W, Crise B & Rose JK (1994): Signals determining protein tyrosine kinase and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein targeting to a glycolipid-enriched membrane fraction. *Mol Cell Biol* 14, 5384-5391.
- Rodriguez-Viciana P, Sabatier C & McCormick F (2004): Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol Cell Biol* 24, 4943-4954.
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T & Kirschner MW (1999): The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97, 221-231.
- Rojo JM, Bello R & Portoles P (2008a): T-cell receptor. *Adv Exp Med Biol* 640, 1-11.
- Rojo JM, Pini E, Ojeda G, Bello R, Dong C, Flavell RA, Dianzani U & Portoles P (2008b): CD4+ICOS+ T lymphocytes inhibit T cell activation 'in vitro' and attenuate autoimmune encephalitis 'in vivo'. *Int Immunol* 20, 577-589.
- Rojo JM, Portoles P, Yagi J & Dianzani U (2001): H4/ICOS: a costimulatory protein in the right place at the right time? *Inmunología* 20, 196-206.
- Rolf J, Bell SE, Kovessi D, Janas ML, Soond DR, Webb LM, Santinelli S, Saunders T, Hebeis B, Killeen N, Okkenhaug K & Turner M (2010): Phosphoinositide 3-kinase activity in T cells regulates the magnitude of the germinal center reaction. *J Immunol* 185, 4042-4052.
- Round JL, Tomassian T, Zhang M, Patel V, Schoenberger SP & Miceli MC (2005): Dlg1 coordinates actin polymerization, synaptic T cell receptor and lipid raft aggregation, and effector function in T cells. *J Exp Med* 201, 419-430.
- Rozdzial MM, Malissen B & Finkel TH (1995): Tyrosine-phosphorylated T cell receptor zeta chain associates with the actin cytoskeleton upon activation of mature T lymphocytes. *Immunity* 3, 623-633.
- Rudd CE (1996): Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function. *Immunity* 4, 527-534.
- Rudd CE (1999): Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling. *Cell* 96, 5-8.

- Rudd CE & Schneider H (2003): Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 3, 544-556.
- Saito K, Toliás KF, Saci A, Koon HB, Humphries LA, Scharenberg A, Rawlings DJ, Kinet JP & Carpenter CL (2003): BTK regulates PtdIns-4,5-P₂ synthesis: importance for calcium signaling and PI3K activity. *Immunity* 19, 669-678.
- Salim K, Bottomley MJ, Querfurth E, Zvelebil MJ, Gout I, Scaife R, Margolis RL, Gigg R, Smith CI, Driscoll PC, Waterfield MD & Panayotou G (1996): Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J* 15, 6241-6250.
- Sanchez-Madrid F & del Pozo MA (1999): Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J* 18, 501-511.
- Sanchez-Martin L, Sanchez-Sanchez N, Gutierrez-Lopez MD, Rojo AI, Vicente-Manzanares M, Perez-Alvarez MJ, Sanchez-Mateos P, Bustelo XR, Cuadrado A, Sanchez-Madrid F, Rodriguez-Fernandez JL & Cabanas C (2004): Signaling through the leukocyte integrin LFA-1 in T cells induces a transient activation of Rac-1 that is regulated by Vav and PI3K/Akt-1. *J Biol Chem* 279, 16194-16205.
- Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA & Collard JG (1999): Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* 147, 1009-1022.
- Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A & Penninger JM (2000): Function of PI3K γ in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* 287, 1040-1046.
- Sato T, Machida T, Takahashi S, Murase K, Kawano Y, Hayashi T, Iyama S, Takada K, Kuribayashi K, Sato Y, Kobune M, Takimoto R, Matsunaga T, Kato J & Niitsu Y (2008): Apoptosis supercedes necrosis in mitochondrial DNA-depleted Jurkat cells by cleavage of receptor-interacting protein and inhibition of lysosomal cathepsin. *J Immunol* 181, 197-207.
- Scharenberg AM, El-Hillal O, Fruman DA, Beitz LO, Li Z, Lin S, Gout I, Cantley LC, Rawlings DJ & Kinet JP (1998): Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P₃)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *EMBO J* 17, 1961-1972.
- Schneider H, Cai YC, Prasad KV, Shoelson SE & Rudd CE (1995): T cell antigen CD28 binds to the GRB-2/SOS complex, regulators of p21ras. *Eur J Immunol* 25, 1044-1050.
- Schneider H, Valk E, da Rocha Dias S, Wei B & Rudd CE (2005): CTLA-4 up-regulation of lymphocyte function-associated antigen 1 adhesion and clustering as an alternate basis for coreceptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12861-12866.
- Schweitzer AN & Sharpe AH (1998): Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. *J Immunol* 161, 2762-2771.
- Seder RA, Germain RN, Linsley PS & Paul WE (1994): CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in T cell priming for IL-4 and interferon gamma production. *J Exp Med* 179, 299-304.
- Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, Kawai K, Ohashi PS, Thompson CB & Mak TW (1993): Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261, 609-612.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O & Mann M (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.
- Smith-Garvin JE, Koretzky GA & Jordan MS (2009): T cell activation. *Annu Rev Immunol* 27, 591-619.
- Smith A, Bracke M, Leitinger B, Porter JC & Hogg N (2003): LFA-1-induced T cell migration on ICAM-1 involves regulation of MLCK-mediated attachment and ROCK-dependent detachment. *J Cell Sci* 116, 3123-3133.
- Soond DR, Bjorgo E, Moltu K, Dale VQ, Patton DT, Torgersen KM, Galleway F, Twomey B, Clark J, Gaston JS, Tasken K, Bunyard P & Okkenhaug K (2010): PI3K p110 δ regulates T-cell cytokine production during primary and secondary immune responses in mice and humans. *Blood* 115, 2203-2213.
- Sotsios Y & Ward SG (2000): Phosphoinositide 3-kinase: a key biochemical signal for cell migration in response to chemokines. *Immunol Rev* 177, 217-235.

- Straight AF, Cheung A, Limouze J, Chen I, Westwood NJ, Sellers JR & Mitchison TJ (2003): Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science* 299, 1743-1747.
- Suire S, Condliffe AM, Ferguson GJ, Ellson CD, Guillou H, Davidson K, Welch H, Coadwell J, Turner M, Chilvers ER, Hawkins PT & Stephens L (2006): Gbetagammagamma and the Ras binding domain of p110gamma are both important regulators of PI(3)Kgamma signalling in neutrophils. *Nat Cell Biol* 8, 1303-1309.
- Szczepanowska J (2009): Involvement of Rac/Cdc42/PAK pathway in cytoskeletal rearrangements. *Acta Biochim Pol* 56, 225-234.
- Tafari A, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, Boucher LM, Bouchard D, Chan VS, Duncan G, Odermatt B, Ho A, Itie A, Horan T, Whoriskey JS, Pawson T, Penninger JM, Ohashi PS & Mak TW (2001): ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 409, 105-109.
- Takenawa T & Miki H (2001): WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* 114, 1801-1809.
- Tavano R, Contento RL, Baranda SJ, Soligo M, Tuosto L, Manes S & Viola A (2006): CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nat Cell Biol* 8, 1270-1276.
- Thompson CB & Allison JP (1997): The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* 7, 445-450.
- Torres J & Pulido R (2001): The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* 276, 993-998.
- Tskvitaria-Fuller I, Rozelle AL, Yin HL & Wulfiging C (2003): Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization. *J Immunol* 171, 2287-2295.
- Tskvitaria-Fuller I, Seth A, Mistry N, Gu H, Rosen MK & Wulfiging C (2006): Specific patterns of Cdc42 activity are related to distinct elements of T cell polarization. *J Immunol* 177, 1708-1720.
- van Berkel ME, Schrijver EH, Hofhuis FM, Sharpe AH, Coyle AJ, Broeren CP, Tesselaar K & Oosterwegel MA (2005): ICOS contributes to T cell expansion in CTLA-4 deficient mice. *J Immunol* 175, 182-188.
- van Oers NS, Killeen N & Weiss A (1996): Lck regulates the tyrosine phosphorylation of the T cell receptor subunits and ZAP-70 in murine thymocytes. *J Exp Med* 183, 1053-1062.
- Vang KB, Yang J, Pagan AJ, Li LX, Wang J, Green JM, Beg AA & Farrar MA (2010): Cutting edge: CD28 and c-Rel-dependent pathways initiate regulatory T cell development. *J Immunol* 184, 4074-4077.
- Vanhaesebroeck B & Alessi DR (2000): The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346 Pt 3, 561-576.
- Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M & Bilanges B (2010): The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 329-341.
- Vanhaesebroeck B, Leevers SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ & Waterfield MD (2001): Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70, 535-602.
- Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, Stein R, Warne PH, Zvelebil MJ, Higashi K, Volinia S, Downward J & Waterfield MD (1997): P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4330-4335.
- Villalba M, Bi K, Rodriguez F, Tanaka Y, Schoenberger S & Altman A (2001): Vav1/Rac-dependent actin cytoskeleton reorganization is required for lipid raft clustering in T cells. *J Cell Biol* 155, 331-338.
- Villegas EN, Lieberman LA, Mason N, Blass SL, Zediak VP, Peach R, Horan T, Yoshinaga S & Hunter CA (2002): A role for inducible costimulator protein in the CD28- independent mechanism of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 169, 937-943.
- Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y & Lanzavecchia A (1999): T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science* 283, 680-682.
- Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB & Bluestone JA (1994): CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1, 405-413.
- Wang S & Chen L (2004): Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes Infect* 6, 759-766.

- Wange RL (2000): LAT, the linker for activation of T cells: a bridge between T cell-specific and general signaling pathways. *Sci STKE* 2000, re1.
- Ward SG & Cantrell DA (2001): Phosphoinositide 3-kinases in T lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 13, 332-338.
- Ward SG, June CH & Olive D (1996): PI 3-kinase: a pivotal pathway in T-cell activation? *Immunol Today* 17, 187-197.
- Warnatz K, Bossaller L, Salzer U, Skrabl-Baumgartner A, Schwinger W, van der Burg M, van Dongen JJ, Orłowska-Volk M, Knoth R, Durandy A, Draeger R, Schlesier M, Peter HH & Grimbacher B (2006): Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* 107, 3045-3052.
- Wassink L, Vieira PL, Smits HH, Kingsbury GA, Coyle AJ, Kapsenberg ML & Wierenga EA (2004): ICOS expression by activated human Th cells is enhanced by IL-12 and IL-23: increased ICOS expression enhances the effector function of both Th1 and Th2 cells. *J Immunol* 173, 1779-1786.
- Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T & Narumiya S (1999): Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol* 1, 136-143.
- Watanabe R, Harada Y, Takeda K, Takahashi J, Ohnuki K, Ogawa S, Ohgai D, Kaibara N, Koiwai O, Tanabe K, Toma H, Sugamura K & Abe R (2006): Grb2 and Gads exhibit different interactions with CD28 and play distinct roles in CD28-mediated costimulation. *J Immunol* 177, 1085-1091.
- Weaver AM, Young ME, Lee WL & Cooper JA (2003): Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Curr Opin Cell Biol* 15, 23-30.
- Wei B, da Rocha Dias S, Wang H & Rudd CE (2007): CTL-associated antigen-4 ligation induces rapid T cell polarization that depends on phosphatidylinositol 3-kinase, Vav-1, Cdc42, and myosin light chain kinase. *J Immunol* 179, 400-408.
- Welch HC, Coadwell WJ, Stephens LR & Hawkins PT (2003): Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett* 546, 93-97.
- Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, Malina A, Ray S, Kogan S, Cordon-Cardo C, Pelletier J & Lowe SW (2004): Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* 428, 332-337.
- Whitmire JK & Ahmed R (2000): Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Curr Opin Immunol* 12, 448-455.
- Woods YL & Rena G (2002): Effect of multiple phosphorylation events on the transcription factors FKHR, FKHL1 and AFX. *Biochem Soc Trans* 30, 391-397.
- Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C & Seed B (1998): Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8, 723-732.
- Yagi J, Arimura Y, Dianzani U, Uede T, Okamoto T & Uchiyama T (2003): Regulatory roles of IL-2 and IL-4 in H4/inducible costimulator expression on activated CD4+ T cells during Th cell development. *J Immunol* 171, 783-794.
- Yamada H, Abe T, Li SA, Masuoka Y, Isoda M, Watanabe M, Nasu Y, Kumon H, Asai A & Takei K (2009): Dynasore, a dynamin inhibitor, suppresses lamellipodia formation and cancer cell invasion by destabilizing actin filaments. *Biochem Biophys Res Commun* 390, 1142-1148.
- Yamasaki S & Saito T (2005): [Signaling pathway through T cell receptor]. *Nihon Rinsho* 63 Suppl 4, 335-340.
- Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P, Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliott GS, Hui A, McCabe SM, Scully S, Shahinian A, Shaklee CL, Van G, Mak TW & Senaldi G (1999): T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402, 827-832.
- Youngnak P, Kozono Y, Kozono H, Iwai H, Otsuki N, Jin H, Omura K, Yagita H, Pardoll DM, Chen L & Azuma M (2003): Differential binding properties of B7-H1 and B7-DC to programmed death-1. *Biochem Biophys Res Commun* 307, 672-677.
- Yu J, Zhang Y, McIlroy J, Rordorf-Nikolic T, Orr GA & Backer JM (1998): Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 18, 1379-1387.
- Zang X, Loke P, Kim J, Wojnoonski K, Kusdra L & Allison JP (2006): A genetic library screen for signaling proteins that interact with phosphorylated T cell costimulatory receptors. *Genomics* 88, 841-845.

- Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Tribble RP & Samelson LE (1998a): LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92, 83-92.
- Zhang W, Tribble RP & Samelson LE (1998b): LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9, 239-246.
- Zugaza JL, Lopez-Lago MA, Caloca MJ, Dosil M, Movilla N & Bustelo XR (2002): Structural determinants for the biological activity of Vav proteins. *J Biol Chem* 277, 45377-45392.